

**ANDRÉ FILIPE PEDRO CAMPOS**

**O RÁCIO NEUTRÓFILO/LINFÓCITO COMO  
FATOR DE PROGNÓSTICO PARA MELANOMAS  
DA CAVIDADE ORAL EM CÃES**

**Orientadores: Doutor Lénio Ribeiro  
Doutor Hugo Gregório**

**Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias**

**Faculdade de Medicina Veterinária**

**Lisboa, 2019**

**ANDRÉ FILIPE PEDRO CAMPOS**

**O RÁCIO NEUTRÓFILO/LINFÓCITO COMO  
FATOR DE PROGNÓSTICO PARA MELANOMAS  
DA CAVIDADE ORAL EM CÃES**

Dissertação defendida em provas públicas para a obtenção do Grau de Mestre em Medicina Veterinária no curso de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária, conferido pela Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, no dia 8 de Janeiro de 2019, perante o júri nomeado pelo Despacho Reitoral nº 407/2018 com a seguinte composição:

**Presidente do Júri:** Professora Doutora Laurentina Pedroso

**Arguente:** Professora Doutora Felisbina Queiroga

**Orientador:** Professor Doutor Lénio Ribeiro

**Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias**

**Faculdade de Medicina Veterinária**

**Lisboa, 2019**

## **Agradecimentos**

À faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, pela possibilidade da realização desta Dissertação de Mestrado, com um agradecimento inesquecível ao corpo docente em geral.

Ao Dr. João Requicha, o meu muito obrigado pela orientação durante o curso, e pelo desafio lançado quanto ao estágio, o qual me trouxe a melhor experiência académica até hoje.

Ao Dr. Hugo Gregório, pela orientação e apoio em todas as fases de realização desta dissertação. O meu muito obrigado pela partilha imensa de conhecimento e pela oportunidade de trabalhar este tema, sempre com novos desafios que me fizeram crescer enquanto pessoa e estudante de medicina veterinária.

Ao Dr. Lénio Ribeiro, um grande agradecimento por todo o conhecimento e experiência transmitidos durante o meu percurso universitário, e também pela disponibilidade imediata e indispensável quanto à orientação desta dissertação.

Um agradecimento incomparável ao Dr. Joaquim Henriques, pela oportunidade que me proporcionou de estagiar com a equipa fantástica e muito especial do Hospital Veterinário Berna, pelo conhecimento, aprendizagem e possibilidade de trabalhar na especialidade de Oncologia. Sem esta partilha de conhecimento não seria possível a realização desta dissertação, e por isso lhe ficarei eternamente grato.

À minha família um agradecimento muito especial e sentido, aos meus pais e avós, que são os pilares da minha vida e desde sempre me apoiaram incondicionalmente, não seria possível hoje ser quem sou nem realizar o que realizei sem a presença deles na minha vida, a eles o meu muito obrigado, por tornarem este sonho possível. A todo o resto da família um imenso obrigado por acreditarem em mim e por estarem presentes nesta caminhada.

A todos os colegas do Hospital Veterinário Berna, que durante seis meses foram os meus companheiros do dia-a-dia, proporcionando-me momentos fantásticos de aprendizagem,

de experiências únicas e privilegiadas. Ao corpo clínico, nomeadamente ao Doutor Rui Xavier Santos, à Doutora Anabelle Morais, à Doutora Patrícia Duarte, à Doutora Inês Fonseca, ao Doutor Ricardo Felisberto, à Doutora Marta Lemos, à Doutora Sónia Fonseca, à Doutora Sofia d'Orey, à Doutora Ingrid Isaac, ao Doutor Filipe Lebre e à Doutora Ana Rodrigues o meu muito obrigado por esta experiência inesquecível e pela vossa amizade.

À equipa de enfermagem, constituída por diversos elementos, mas que especialmente estes me marcaram, nomeadamente à Rita Pinto da Costa, Joana Farinha, Rita Filipe, Bruno Rosado, Flávio Almeida e Cátia Rodrigues, que foram os meus pilares de coragem e força durante toda esta experiência e me prepararam para enfrentar todas as adversidades no decorrer do dia-a-dia de um médico veterinário, o meu muito obrigado por toda a experiência e amizade vitalícia.

Ao meu companheiro de estágio, José Martins, e ao indispensável João Alves, o meu muito obrigado pela vossa amizade e apoio nesta aventura.

Um agradecimento muito especial aos meus colegas de curso e irmãos de armas para a vida, José Santana e Nuno Nunes, por todas as experiências e momentos vividos nestes últimos seis anos, sem vocês nada disto seria possível.

Por fim, o meu agradecimento eterno e ímpar a ti, Rita Pinto da Costa, porque surgiste de uma forma tão especial nesta aventura, e tornas-te tudo tão perfeito. O meu muito obrigado por sempre acreditares em mim e me apoiares com esse amor incondicional.

## Resumo

O melanoma é uma neoplasia dos melanócitos, células que estão presentes em diversas localizações, como a pele, mucosa oral e junções mucocutâneas do lábio e dos dígitos. Esta é a neoplasia oral mais comum em cães, tendo por norma um comportamento bastante agressivo.

Dada a natureza desta neoplasia, que na maioria dos casos apresenta um mau prognóstico associado a um tempo de sobrevida curto mesmo com recurso a tratamento, nasce a necessidade de dar uma resposta mais urgente no momento da sua suspeita quanto à previsibilidade do seu comportamento.

De forma a perceber quais os fatores de prognóstico mais importantes no melanoma e a sua relação com a sobrevida, realizou-se uma revisão sistemática da literatura, na qual se pôde verificar que os fatores de prognóstico com maior frequência de avaliação são o índice mitótico, o índice de Ki67 e a dimensão tumoral.

O presente trabalho tem como objetivo avaliar o significado prognóstico da resposta inflamatória e imunitária do organismo, através do cálculo do rácio neutrófilo/linfócito no momento do diagnóstico de melanoma oral, e perceber como se traduzem os resultados obtidos no prognóstico e sobrevida dos animais.

Avaliaram-se então, os hemogramas de 16 cães diagnosticadas com melanoma oral, obtendo-se assim uma mediana para o rácio neutrófilo/linfócito de 3,7. Esta mediana foi usada como valor ‘cut-off’, que quando avaliado em relação à sobrevida, permitiu concluir que os cães com um valor inferior a este, atingiram uma mediana de sobrevida de 13 meses, enquanto que os cães com um rácio superior a este apresentaram uma mediana de sobrevida de apenas 7 meses. Encontrando assim uma diferença estatisticamente significativa ( $p = 0,044$ ) na comparação entre os 2 grupos, e concluindo que o rácio neutrófilo/linfócito possui valor como indicador prognóstico neste estudo.

**Palavras-chave:** melanoma; cão; prognóstico; ratio neutrófilo/linfócito; sobrevida;

## **Abstract**

Melanoma is a neoplasm originating in menalocytes that are present in various locations, such as the skin, oral mucosa and mucocutaneous joints of the lip and digits. This is the most common oral neoplasia in dogs, with a very aggressive behavior.

Given the nature of this neoplasm, which in most cases is presented with a poor prognosis associated with a short survival time even with treatment, the need arises to give a more urgent response at the time of its suspicion of the predictability of its behavior.

In order to understand the most important prognostic factors in melanoma and its relation with survival, a systematic review of the literature was carried out, in which it was verified that the prognostic factors with higher frequency of evaluation are the mitotic index, Ki67 index and the tumor size.

The present study aims to evaluate the prognostic significance of the inflammatory and immune response of the organism by calculating the neutrophil / lymphocyte ratio at the time the oral melanoma is diagnosed and to understand how the results obtained in the prognosis and survival are translated for the animals.

Hemograms of 16 dogs diagnosed with oral melanoma were then evaluated, resulting in a median for the neutrophil / lymphocyte ratio of 3.7. This median was used as a cut-off value, which when evaluated in relation to survival, allowed to conclude that dogs with a lower value reached a median survival of 13 months, while dogs with a ratio higher than have a median survival of only 7 months. Finding a statistically significant difference ( $p = 0.044$ ) in the comparison between the 2 groups, and concluding that the neutrophil / lymphocyte ratio was a useful prognostic indicator in this study.

**Keywords:** melanoma; dog; prognosis; neutrophil / lymphocyte ratio; survival;

## Índice

<b>Agradecimentos</b> .....	i
<b>Resumo</b> .....	iii
<b>Abstract</b> .....	iv
<b>Índice</b> .....	v
<b>Índice de Tabelas</b> .....	i
<b>Índice de Figuras</b> .....	ii
<b>Índice de Gráficos</b> .....	iii
<b>Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos</b> .....	i
<b>1. Relatório de Estágio</b> .....	1
<b>1.1. Hospital Veterinário Berna</b> .....	1
<b>1.2. Atividades desenvolvidas</b> .....	2
<b>2. Introdução</b> .....	5
<b>3. Melanoma no cão</b> .....	6
<b>3.1. Generalidades</b> .....	6
<b>3.2. Epidemiologia</b> .....	7
<b>3.3. Etiologia</b> .....	7
<b>4. Classificação do melanoma</b> .....	8
<b>5. Diagnóstico</b> .....	11
<b>5.1. História e Sinais Clínicos</b> .....	12
<b>5.2. Diagnóstico citológico e histológico</b> .....	13
<b>5.3. Marcadores moleculares</b> .....	18
<b>6. Estadiamento</b> .....	20
<b>7. Tratamento</b> .....	24
<b>7.1. Cirurgia</b> .....	24
<b>7.2. Radioterapia</b> .....	26
<b>7.3. Quimioterapia</b> .....	28

<b>7.3.1. Combinação de quimioterapia com radioterapia</b> .....	28
<b>7.4. Imunoterapia</b> .....	29
<b>7.5. Outros tratamentos</b> .....	31
<b>8. Prognóstico</b> .....	31
<b>8.1. População</b> .....	31
<b>8.2. Localização e características morfológicas</b> .....	32
<b>8.3. Características clínico-patológicas</b> .....	33
<b>8.4. Tratamento</b> .....	41
<b>8.5. Rácio N/L</b> .....	42
<b>9. Revisão Sistemática</b> .....	43
<b>10. Avaliação do Rácio Neutrófilo/Linfócito no Melanoma oral</b> .....	65
<b>10.1. Objetivos</b> .....	65
<b>10.2. Materiais e Métodos</b> .....	65
<b>10.3. Resultados</b> .....	66
<b>10.4. Discussão</b> .....	70
<b>10.5. Conclusão</b> .....	74
<b>11. Bibliografia</b> .....	76

## Índice de Tabelas

Tabela 1 - Características de atipia nuclear.....	17
Tabela 2 - Sistema de classificação da OMS para o melanoma oral.....	21
Tabela 3 - Marcadores de imunohistoquímica utilizados em medicina veterinária e respetiva função no ciclo celular.....	37
Tabela 4 - Resumo das características dos estudos selecionados.....	50
Tabela 5 - Risco de enviesamento.....	52
Tabela 6 - Distribuição da amostra quanto ao estadio.....	67
Tabela 7 – Influência do RNL na sobrevida.....	69

## Índice de Figuras

Figura 1 - Melanoma gengival.....	9
Figura 2 - Melanoma lingual .....	9
Figura 3 – Melanoma interdigital.....	10
Figura 4 - Melanoma cutâneo.....	10
Figura 5 - Cão com melanoma ocular.....	11
Figura 6 - Imagem citológica de melanoma benigno com bastante pigmentação.....	14
Figura 7 - Citologia de melanoma maligno.....	14
Figura 8 - Citologia de melanoma maligno com pigmento de formato areia nas células neoplásicas.....	15
Figura 9 - Células neoplásicas com presença de pigmento grosseiro e redondo.....	15
Figura 10 - Células neoplásicas desprovidas de pigmentação numa citologia de melanoma amelanótico.....	15
Figura 11 - Melanoma melanótico oral.....	16
Figura 12 - Recomendações alternativas ao estadiamento de neoplasias em cães.....	22
Figura 13 - Padrão metastático difuso.....	23
Figura 14 - Biópsia excisional de linfonodo poplíteo metastático.....	25
Figura 15 - Melanoma lingual após biópsia incisional.....	25
Figura 16 - Sessão de radioterapia num cão.....	27
Figura 17 - Significância dos fatores de prognóstico em neoplasias melanocíticas.....	34
Figura 18 - Recomendação de parâmetros prognóstico mais relevantes.....	41
Figura 19 - Fluxograma PRISMA dos estudos selecionados.....	44

## Índice de Gráficos

Gráfico 1 - Comparação percentual da casuística observada nas diferentes especialidades..	
.....	3
Gráfico 2 - Distribuição da amostra quanto à Raça.....	66
Gráfico 3 - Distribuição da amostra quanto ao Género.....	67
Gráfico 4 - Distribuição do tempo de sobrevida no total da amostra.....	68
Gráfico 5 - Representação gráfica da influência do ‘cut-off’ na sobrevida.....	69

## **Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos**

ADN – Ácido desoxirribonucleico

APUD – Amine Precursor Uptake Descarboxilase

BRAF – Gene codificador da proteína B-RAF

CDKN2A – Inibidor da quinase dependente da ciclina 2A

C-kit – Proteína tirosina-quinase

COX – Cicloxigenase

ENE – Enolase neuro-específica

FCEV – Expressão de do fator de crescimento do endotélio vascular

ILD – Intervalo livre de doença

IM – Índice Mitótico

INK4a/ARF – locus codificador de duas moléculas supressoras tumorais

Ki67 – Proteína antigénica codificada pelo gene MKI67

MCC - Contagem de mastócitos

MITF – Fator de transcrição associado à melanogénese

MST – Mediana de Sobrevida

NEDD9 – Célula precursora neuronal expressa por regulação decrescente da proteína 9

NRAS – Oncogene viral RAS

OMS – Organização Mundial de Saúde

PI – Índice da fase do ciclo celular

p16 (ink-4a) – inibidor da quinase 2<sup>a</sup> dependente da ciclina

p21 (waf-1) – inibidor da quinase 1 dependente da ciclina

p53 – antigénio celular tumoral

PAAF – Punção aspirativa por agulha fina

PNC2 – Nucleotídeo peroxisomal transportador de adenina

PTEN – Homólogo da tensina e fosfatase

RAG – Rácio Albumina Globulinas

Rb – proteína do retinoblastoma

RM – Ressonância Magnética

RNL – Rácio Neutrófilo Linfócito

TC – Tomografia computadorizada

TS – Tempo de sobrevida

UV– Ultravioleta

# **1. Relatório de Estágio**

## **1.1. Hospital Veterinário Berna**

O estágio curricular no Hospital Veterinário Berna foi realizado durante 6 meses, sob a orientação e supervisão do Dr. Joaquim Henriques e da Dr.<sup>a</sup>. Patrícia Duarte, maioritariamente ao serviço da Oncologia, Medicina Interna e Cirurgia. Iniciou-se no dia 1 de setembro de 2017 e terminou dia 3 de março de 2018, sempre num esquema de 4 semanas rotativas, que permitiu presenciar os diferentes turnos diurnos. Este esquema de horário consistiu em 8 horas de trabalho diárias, incluindo fins de semana, com duas folgas semanais, perfazendo um total de cerca de 1056 horas.

O Hospital Veterinário Berna pertence à OneVet Group desde 2012 e está localizado na Avenida de Berna, N<sup>o</sup>35C. Contempla diversas áreas dentro da medicina veterinária, sendo o hospital de referência em Oncologia, com recurso a métodos avançados de diagnóstico e tratamento, como é o caso da tomografia computadorizada e eletroquimioterapia, respetivamente.

Este hospital é contemplado por uma equipa multidisciplinar, constituído por médicos veterinários com experiência em todas as áreas da medicina veterinária de animais de companhia, aberto todo o ano, 24 horas por dia com serviço de urgência garantido por um enfermeiro e um médico veterinário.

No Hospital Veterinário Berna podemos ter acesso a especialidades como a acupunctura, dermatologia, medicina interna, oncologia, alimentação e nutrição, medicina preventiva, medicina felina, oftalmologia, cardiologia, hematologia, ortopedia, e ainda, medicina dentária. Dentro destas especialidades podemos ter acesso a todo o tipo de serviços como os meios de diagnóstico de imagem, raio x digital, ecografia, ecocardiografia e tomografia computadorizada. Neste hospital existe também um banco de sangue, bloco operatório, laboratório de análises e internamento para os animais de companhia 24 horas por dia.

## **1.2. Atividades desenvolvidas**

Durante o estágio foi possível acompanhar as diversas especialidades e serviços do hospital.

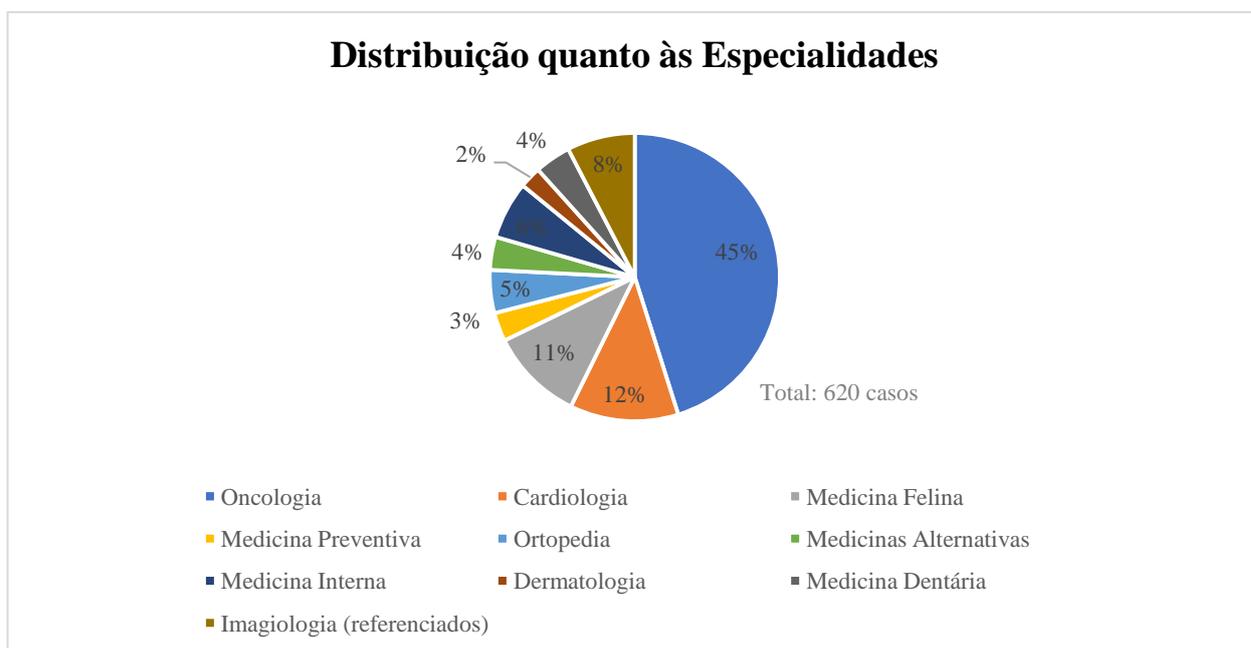
No primeiro turno, de cirurgia, baseou-se na preparação do paciente, desde a chegada, ao exame clínico básico, preparação pré-cirúrgica, anestesia, cirurgia e recobro. Posto isto, foi possível adquirir conhecimentos gerais sobre Anestesia e Cirurgia ao longo de todo o estágio, mais especificamente, no acompanhamento do paciente, realizando-se procedimentos como a colocação de cateter, entubação endotraqueal, tricotomia, desinfecção e limpeza da zona de incisão, auxílio ao cirurgião durante os procedimentos, registo da monitorização anestésica e realização de cirurgias eletivas de castração de gatos e ovariectomias em cadelas. Por fim, foi ainda possível assistir a procedimentos de mínima invasão, como endoscopias, broncoscopias, rinoscopias e laparoscopias. Para além disso, realizaram-se diversos procedimentos orais, no que toca à extração de dentes ou higiene profissional da cavidade oral.

A semana seguinte dedicou-se maioritariamente ao serviço de internamento. O internamento deste hospital é separado em cães, gatos e infecciosas, dando a hipótese de poder assistir a todo o tipo de tratamentos efetuados, como recolhas de sangue, transfusões, recobro pós-cirúrgico e cuidados intensivos. Realizaram-se procedimentos como a manutenção de higiene, alimentação, monitorização dos sinais vitais, administração de medicamentos pelas diversas vias de administração, medições da pressão arterial e colheitas de sangue para seguimento. Durante este turno, nas horas mais leves, foi também possível assistir a consultas de todo o tipo de especialidades, como a medicina preventiva, medicina felina, cardiologia, medicina interna, ortopedia, oftalmologia e consultas de seguimento de oncologia.

Na terceira semana, a de Oncologia, baseia-se na presença em consultas de oncologia com o Dr. Joaquim Henriques, planeamento de tratamentos, estadiamento e também diversos conhecimentos foram adquiridos no que toca a conceitos éticos e de preparação do cliente para o paciente oncológico. Procedimentos como a punção aspirativa por agulha fina de massas suspeitas de neoplasias, assim como a sua preparação laboratorial e interpretação microscópica foram realizados. Nesta semana também foi possível auxiliar em sessões de quimioterapia, obtendo conhecimentos quanto à preparação dos fármacos citotóxicos e regras essenciais para a execução deste tipo de terapia, realizando mesmo a preparação e

administração destes fármacos. Ainda durante este período foi possível assistir ao tratamento de pacientes oncológicos com outras terapias, nomeadamente a eletroquimioterapia, imunoterapia e crioterapia.

A quarta, e última semana deste esquema rotativo, gira à volta da Imagiologia. Visto que o hospital apresenta diversos meios de diagnóstico imagiológico foi possível assistir, auxiliar e adquirir conhecimentos quanto à radiografia, ecografia, ecocardiografia e tomografia computadorizada.



**Gráfico 1** – Comparação percentual da casuística observada nas diferentes especialidades.

O gráfico 1 ilustra a distribuição, relativamente às diferentes especialidades, dos cerca de 620 casos acompanhados no Hospital Veterinário de Berna. Como seria de esperar, a grande maioria são casos oncológicos dado este hospital ser um centro de referência, com 280 casos observados, 75 na cardiologia, 65 em medicina felina, 47 casos seguidos apenas em imagiologia, maioritariamente na tomografia computadorizada, por referência de outros hospitais ou clínicas, 40 de medicina interna, 30 casos em ortopedia, 25 em medicina dentária, 23 em medicinas alternativas, maioritariamente sessões de acupuntura, 20 em medicina preventiva, no aconselhamento cirúrgico quanto à esterilização, planos vacinais e de desparasitação e, por fim, 15 casos acompanhados pela dermatologia.

Em geral, foi possível adquirir diversos conhecimentos em diversas áreas, mas para além disso também se criou oportunidades para realizar tarefas no contexto prático de um

médico veterinário. Tarefas essas que incluem a realização de anamneses, consultas, colheitas de sangue e urina com a realização das técnicas de laboratório e interpretação das mesmas. Foi também possível, no tratamento de diversos pacientes, realizar a venopunção para colocação de cateter e sistema de venóclise, medição de glicémia, drenagem de líquidos de derrames cavitários, colocação ou substituição de pensos, eletrocardiogramas e remoção de pontos.

Por fim, procedimentos de ressuscitação num contexto de urgência foram também auxiliados, tanto em pacientes neonatos como em adultos, no que diz respeito à colocação de cateteres intraósseos em neonatos, ou à colocação de tubo endotraqueal, administração de fármacos de ressuscitação e manobras respetivas.

Uma vez por semana é realizado um *Journal Club*, que consiste numa apresentação de uma hora, todas as semanas, por uma pessoa diferente, abordando diversos temas da medicina veterinária em contexto prático. Durante esta hora apresenta-se, discute-se e reflete-se sobre esse mesmo tema, que fica ao encargo de um médico veterinário ou estagiário. No âmbito de contribuir para a realização desta tarefa, foi possível ficar a cargo da responsabilidade de dinamização de uma das semanas, realizando uma apresentação sobre o Melanoma em cães e gatos.

## 2. Introdução

O cancro é uma doença do genoma, resultado de alterações no ácido desoxirribonucleico (ADN) que desregulam a estrutura genética e a sua função. Em todas as neoplasias existe um fator comum, ou a sua expressão genética foi alterada, ou então o genoma celular foi modificado. Existe então um erro inerente à taxa de replicação do ADN, sendo que todos os organismos multicelulares são suscetíveis ao desenvolvimento de uma neoplasia se sobreviverem tempo suficiente, pois as mutações necessárias para o desenvolvimento de uma neoplasia ocorrerão eventualmente (Donald, 2016).

Segundo Withrow, Vail & Page (2012), ao longo de várias décadas tornou-se claro que o cancro é uma doença com forte componente genética. As novas tecnologias permitem investigar ao certo como é que a componente hereditária desta doença se deixa influenciar pela epigenética do organismo e pelo seu ambiente envolvente.

Ora para compreender isto é necessário ter bem assente que o cancro não é uma doença simples. O termo ‘cancro’ descreve um grande número de doenças cujo único fator comum é um crescimento e proliferação celular descontrolado. Um conceito bem aceite universalmente é de que esta doença é uma doença genética, mas que nem sempre é hereditária. Os tumores resultam de uma acumulação de mutações que eliminam os contornos normais de proliferação e integridade genética das células somáticas.

O melanoma é um tumor que surge dos melanócitos, células geradoras de melanina através do melanossoma, por uma série de glicoproteínas melanosomáticas (Withrow, Vail, & Page, 2012).

Este tumor é uma neoplasia maligna que ocorre em diversas espécies animais, sendo o tumor oral mais frequentemente diagnosticado em cães (Bergman, Kent, & Farese, 2012). É localmente agressivo e com grande potencial metastático. Fatores como o estadiamento e classificação histopatológica são de extrema importância como fatores de prognóstico, embora os tempos de sobrevivência inconsistentes se relacionem com a imprevisibilidade desta doença (Ottner et al., 2013).

O melanoma em cães é uma neoplasia com um comportamento biológico muito variável, existindo muitos estudos que definem marcadores de prognóstico para esta neoplasia, mas poucos são os que os avaliam. Para além disso, não existe um critério universalmente aceite pela comunidade científica no que diz respeito aos critérios de prognóstico para estes tumores, complicando assim as conclusões que se poderiam tirar dos poucos estudos que existem (Smedley, Spangler, et al., 2011).

A natureza agressiva do melanoma em humanos e animais, com tempos de sobrevivência curtos e benefícios mínimos obtidos através do tratamento cirúrgico e terapias adjuvantes, reforça a importância da realização de novos estudos para obtenção de uma modalidade de tratamento eficaz, prevenção de metastização e definição de fatores de prognóstico fidedignos para esta neoplasia (Nishiya et al., 2016).

Diversos estudos reportam que um rácio neutrófilo linfócito (RNL) elevado está associado a um pior prognóstico em vários tipos de cancro na medicina humana (Lino-Silva, Salcedo-Hernández, García-Pérez, Meneses-García, & Zepeda-Najar, 2017).

O RNL apresenta também resultados positivos em humanos como fator prognóstico em eventos cardíacos, nomeadamente na insuficiência cardíaca aguda descompensada (Uthamalingam et al., 2011), em endocardites infecciosas (Bozbay & Uyarel, 2015), ou após intervenções coronárias, em pacientes com enfartes de miocárdio (Park et al., 2013).

A sua significância está também a ser investigada como fator preditivo e prognóstico, em pacientes humanos, com perda de audição neurosensorial secundária a diabetes mellitus (Ulu et al., 2014)

As interações entre os tumores e a resposta inflamatória é bastante complexa, mas a evidência demonstra que a resposta inflamatória apresenta um papel bastante importante na progressão tumoral. As mudanças na resposta inflamatória sistémica refletem-se na medição de alguns parâmetros sanguíneos, tais como, o RNL, a proteína c-reativa, contagem plaquetária e o valor basal de neutrófilos (Lino-Silva et al., 2017).

### **3. Melanoma no cão**

#### **3.1. Generalidades**

O melanoma é um tipo de tumor relativamente comum em cães, especialmente naqueles com níveis significativos de pigmentação da pele, sendo relativamente raro em gatos (Withrow et al., 2012).

Os melanócitos podem dar origem a um diverso grupo de neoplasias com variada distribuição anatómica, apresentação clínica, classificação histopatológica e comportamento biológico. Embora sejam essencialmente abundantes na pele, onde exibem um papel crítico na pigmentação da pele e proteção contra a exposição solar, também poderão estar presentes noutros locais do organismo onde apresentam funções adicionais ainda não inteiramente compreendidas. A maioria das neoplasias surge dos melanócitos na pele, embora possam

ocorrer de melanócitos autóctones de inúmeros órgãos internos, incluindo o sistema nervoso central (Bastian, 2014).

### **3.2.Epidemiologia**

Num estudo retrospectivo acerca de neoplasias em animais domésticos, foram diagnosticadas 2154 neoplasias entre 2000 e 2006, na Universidade de São Paulo, Brasil. As neoplasias melanocíticas compreendiam 8,9% das neoplasias registadas, sendo que em 193 casos, 186 ocorreram em cães (96,4%) e apenas 7 em gatos (3,6%), (Haass et al., 2010).

Em cães, dois terços dos melanomas cutâneos são benignos, denominados melanocitomas, e apenas um terço é maligno. Embora, ocasionalmente, possa ocorrer a transformação de benigno em maligno (Blackwood, 2011).

A maioria dos casos de melanoma maligno desenvolve-se na cavidade oral e nas junções mucocutâneas dos lábios e dígitos. Aproximadamente 10% dos melanomas malignos origina-se na pele coberta por pelo, existindo uma predileção pela pele da cabeça e do escroto. Em gatos, a maioria dos melanomas malignos surge na pele, comparando com melanomas da mucosa.

A maior incidência dá-se em cães entre os 6 e os 15 anos, com o pico de incidência entre os 10 e os 13 anos de idade. As raças com maior risco de ocorrência de doença são o schnauzer, o schnauzer miniatura, o schnauzer gigante, o chow chow, o shar pei e o scottish terrier, por ordem de maior probabilidade. Existem, ainda assim, outras raças bastante descritas na literatura, como o dobermann pinscher, o golden retriever e o cocker spaniel. Não parecendo existir uma predisposição quanto ao género no cão (Goldschmidt & Goldschmidt, 2016).

### **3.3.Etiologia**

Em humanos, o melanoma maligno é considerado como a neoplasia de pele mais agressiva, resistente à terapia e mortal conhecida (Haass et al., 2010).

O melanoma pode surgir da ocorrência de mutações por repetida e intensa exposição aos raios ultravioleta (UV), sendo considerado como a neoplasia com maior evolução de incidência atualmente. Diversos estudos sugerem que a etiologia do melanoma é multifatorial e não apenas relacionada com a mutação devido à exposição aos raios UV. Visto que a maioria das raças de cães tem a pele protegida por pelo, a probabilidade de a causa primária ser esta é bastante baixa. Ainda assim, os melanócitos danificam-se e dividem-se sempre que

existe um evento traumático na pele, ou se existir um trauma constante, como no caso da lambadura crônica ou queimaduras (Bergman et al., 2012).

Diversos fatores etiológicos parecem estar correlacionados com o aparecimento desta neoplasia em cães, incluindo a consanguinidade, traumas, exposição a químicos, hormonas e suscetibilidade genética (Modiano, Ritt, & Wojcieszyn, 1999).

As modificações genéticas e epigenéticas nos melanócitos, que levam a alterações na expressão e função dos genes e proteínas envolvidos no ciclo do controlo celular e apoptose, estão certamente envolvidas no desenvolvimento de melanomas (Nishiya et al., 2016).

A divisão celular desempenha um papel bastante importante na função normal de diversas células. Existem diversas reações genéticas e bioquímicas que controlam o ciclo mitótico celular, no qual uma célula se divide em duas. Cada célula terá um destino diferente no seu ciclo celular, saindo do mesmo ou submetendo-se à morte celular, apoptose, que é, em última instância, determinada pela ação de sinais proliferativos e antiproliferativos (Weinberg, 1995).

Os genes supressores tumorais são responsáveis pela verificação e controlo da proliferação celular, codificando proteínas que inibem ou previnem a progressão e proliferação celular, às custas da sobrevivência individual celular (Levine, 1997; Wynford-Thomas, 1997). Já os protooncogenes encarregam-se de codificar proteínas que promovem a progressão e proliferação celular, sendo que, mutações em qualquer um destes poderá resultar na proliferação de células neoplásicas (Hunter, 1997).

Ainda assim, não existe consenso internacional quanto à etiologia desta neoplasia (Smith, Goldschmidt, & McManus, 2002).

#### **4. Classificação do melanoma**

Os melanoblastos são células neuroectodérmicas na sua origem e, durante o seu desenvolvimento fetal, migram para a pele e folículos pilosos. As células maduras produtoras de pigmento denominam-se então melanócitos, que são células dendríticas encontradas entre a camada basal dos queratinócitos da epiderme e os folículos pilosos, mas também, segundo Smith et al. (2002), nas membranas mucosas e olhos.

A melanina produzida pelos melanócitos é armazenada nos melanossomas, sendo feita a sua progressão para os queratinócitos por um processo conhecido como citocentria. Os melanossomas que se acumulam no citoplasma dos queratinócitos têm como propósito a proteção da pele contra efeitos nefastos como a radiação UV. As neoplasias melanocíticas

podem ser classificadas em benignas ou malignas, sendo que os melanomas malignos são considerados como neoplasias malignas originários dos melanócitos, enquanto que os melanocitomas são a sua forma benigna (Goldschmidt & Goldschmidt, 2016).

O melanoma é a neoplasia oral mais comum em cães (Bergman, 2007), podendo ocorrer em gatos e humanos, mas com muito menor frequência (Brønden, Eriksen, & Kristensen, 2009; Liptak & Withrow, 2013). O local mais comum de ocorrência desta neoplasia na cavidade oral é a mucosa gengival (figura 1), (Ramos-Vara et al., 2000), afetando também outros locais, como a língua (figura 2), onde é considerado como o diagnóstico diferencial mais comum, principalmente em raças como o chow chow e o shar pei (Dennis, Ehrhart, Duncan, Barnes, & Ehrhart, 2006).



**Figura 1:** Melanoma gengival. Imagem gentilmente cedida pelo Dr. Hugo Gregório.



**Figura 2:** Melanoma lingual na língua de um cão bastante pigmentada (Withrow et al., 2012).

O melanoma oral maligno é uma doença localmente agressiva, com invasão do osso em 57% das lesões, metastização para os linfonodos proximais em 30,3% a 74% e, metastização para os pulmões e outros órgãos em 14% a 92% dos casos (Liptak & Withrow, 2013).

A segunda neoplasia do dígito mais comum em cães é o melanoma (figura 3), (Smith et al., 2002), com grande componente de invasão local associada a lise óssea bastante evidente (Henry et al., 2005).



**Figura 3:** Melanoma interdigital entre o dígito nº3 e 4 (Withrow et al., 2012).

Para além da invasão local, frequentemente ocorre metastização regional para os linfonodos e distante para outros órgãos (Smith et al., 2002).

Já os melanomas cutâneos (figura 4) apresentam-se tipicamente com um comportamento benigno em cães, à exceção de melanomas que se desenvolvem nas junções mucocutâneas (Spangler & Kass, 2006). Esta neoplasia é mais frequente em cães com a pele muito pigmentada, com uma incidência de 0,8% a 2% de todas as neoplasias cutâneas em cães (Williams & Packer, 2003). Os locais mais comuns de ocorrência da sua vertente benigna são a face, junto às pálpebras, no tronco e extremidades. Já a sua forma maligna é mais frequentemente observada na cabeça, abdómen ventral e no escroto (Smith et al., 2002).



**Figura 4:** Melanoma cutâneo. Imagem gentilmente cedida pelo Dr. Hugo Gregório.

Os tumores melanocíticos oculares, benignos ou malignos, podem ocorrer tanto em humanos como nos nossos animais domésticos (figura 5), afetando as pálpebras, conjuntiva, a órbita, o limbo e a úvea. Têm geralmente um comportamento pouco agressivo, comparado ao do melanoma oral, sendo o melanoma da úvea mais agressivo do que o melanoma epibulbar. Por vezes, principalmente os mais pigmentados, podem ter um comportamento agressivo, com invasão local e desenvolvimento de metástases regionais e distantes (Dubielzig, Ketring, McLellan, & Albert, 2010).



**Figura 5:** Cão com melanoma ocular juntamente à íris e projeção extraocular (Nishiya et al., 2016).

## 5. Diagnóstico

Os melanomas em cães têm um comportamento biológico bastante diverso, dependendo de uma grande variedade de fatores (Withrow et al., 2012). Os fatores primários que determinam o comportamento biológico são a localização anatômica, o estadiamento e os parâmetros histológicos (Spangler & Kass, 2006).

Diversos tipos de lesões e tumores pigmentados poderão assemelhar-se a tumores melanocíticos, tanto do ponto de vista clínico, como citologicamente e histologicamente. Uma árvore de decisão diagnóstica baseada na execução de técnicas imunohistoquímicas que reconheçam anticorpos específicos para linhagens restritas de antígenos irá, progressivamente, direcionar estes casos para um diagnóstico definitivo de melanoma, tendo em conta a apresentação clínica e morfológica da neoplasia como guia para a seleção dos testes imunológicos (Modiano et al., 1999).

## 5.1. História e Sinais Clínicos

Diversos sintomas estão correlacionados com a presença de uma neoplasia oral. Poderá existir halitose, hipersialia, disfagia, hemorragia, dentes ausentes ou deslocados, edema facial, anorexia, perda de peso ou linfadenopatia regional. Os tutores frequentemente trazem o seu cão ou gato ao médico veterinário por denotarem a presença de uma massa oral (Donald, 2016).

Os tumores da pele são das neoplasias mais comuns em medicina veterinária, tanto por serem fáceis de identificar pelos tutores, como por chamarem à atenção do médico veterinário em consulta. São, geralmente, fáceis de remover e enviados para histopatologia (Goldschmidt & Goldschmidt, 2016).

O melanocitoma é um tumor benigno dos melanócitos que pode ser encontrado na epiderme, derme ou na adnexa, mais concretamente, na camada externa da raiz dos folículos pilosos. A maioria dos melanocitomas são fáceis de diagnosticar devido à presença de melanina, que é geralmente abundante e fácil de visualizar. No entanto, não é possível distinguir um melanoma maligno de um melanocitoma apenas ao exame macroscópico, sendo que, um melanoma maligno pode apresentar-se muito pigmentado ou ausente de pigmentação. Ainda assim, se o tumor tem um comportamento agressivo, invadindo o tecido subcutâneo e os planos fasciais adjacentes, deve ser considerado maligno e confirmado através da histopatologia (Goldschmidt & Goldschmidt, 2016).

Nas espécies domésticas, o melanoma cutâneo, oral e ocular é bastante variável na sua aparência morfológica e histológica, assim como na quantidade de melanina que apresentam (Smith et al., 2002). A relação entre o tipo de células que apresenta e a malignidade ainda não está corretamente estabelecida, não sendo ainda possível correlacionar um diagnóstico histopatológico de malignidade com o comportamento biológico do tumor (Bolon, Mays, Hall, Calderwood Mays, & Hall, 1990).

Apesar dos tumores do olho em animais de companhia serem relativamente raros, assumem um papel crucial devido à importância da visão e do efeito prejudicial à função do olho, até mesmo em tumores de pequenas dimensões (Dubielzig, 2016).

A apresentação clínica é bastante variável e pode incluir, para além da presença de uma lesão proliferativa, glaucoma, hifema e uveíte (Rovesti, Guandalini, & Peiffer, 2001). Na maioria das vezes, a lesão começa por apresentar um aumento da pigmentação da íris, progredindo para invasão da esclera e até mesmo das estruturas intraoculares (Enache, Ionascu, Boydell, & Scase, 2013).

Num estudo comparativo, que englobou 64 cães com tumores do dígito, a apresentação clínica mais comum foi a de uma massa digital, em 73% dos casos, sendo que 42% se apresentava apenas com claudicação do membro afetado e 26,5% com ambas. A ulceração do dígito estava presente em 28% dos casos e a fratura da unha ou do dígito afetava 12,5% dos cães. É também de importante ênfase que a grande maioria dos tumores ocorreram nos membros torácicos e igualmente distribuídos entre todos os dígitos, sendo o primeiro dígito o menos afetado (Henry et al., 2005).

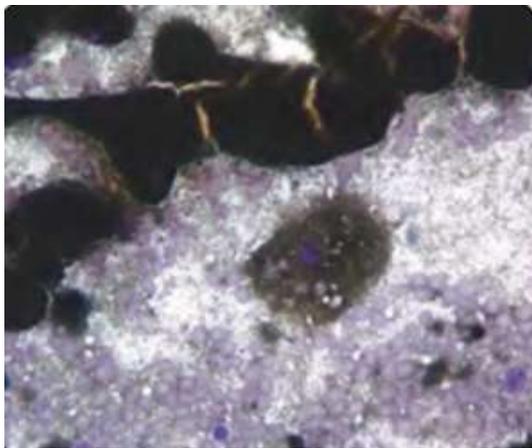
## **5.2. Diagnóstico citológico e histológico**

A citologia é uma ferramenta rápida, fácil e barata para diagnóstico de múltiplas patologias, incluindo processos neoplásicos. Apresenta diversos benefícios, o risco da técnica de punção aspirativa por agulha fina (PAAF) é mínimo, anestesia ou sedação não são geralmente necessárias e não é preciso processar a amostra, podendo esta ser avaliada muito mais depressa comparando com a histopatologia. Ainda assim, apresenta as suas limitações devido à falta de arquitetura dos tecidos e da variabilidade celular que pode apresentar. Obtendo assim, por vezes, diagnósticos inconclusivos ou mal interpretados. É por esta razão que a citologia deve ser sempre acompanhada de outros exames complementares, como a biópsia para histopatologia ou imunohistoquímica, obtendo um diagnóstico mais fidedigno e completo (Barger, 2012).

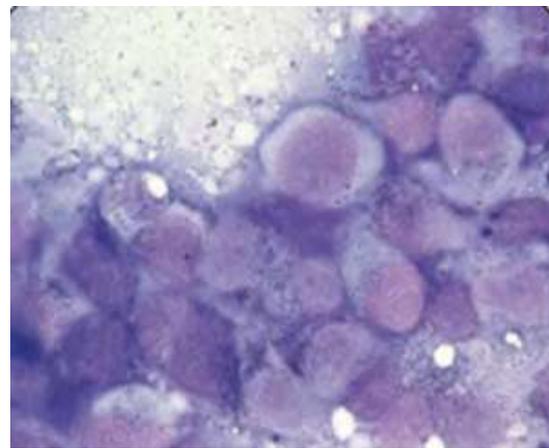
Em medicina veterinária, o exame microscópico das citologias é uma ferramenta de diagnóstico de valor inquestionável e aplicável a diversos sistemas orgânicos. Uma amostra colhida por PAAF é sem dúvida o método de eleição para obtenção de amostras de massas superficiais (Ghisleni et al., 2006), tanto em humanos (Daskalopoulou et al., 1998), como em animais (Griffiths, Lumsden, & Valli, 1984).

Ghisleni et al. (2006) realizaram um estudo em que tinham como objetivo comparar a citologia com a histopatologia numa série de massas cutâneas e subcutâneas no cão e no gato. Obtiveram então 292 amostras de ambos os tipos de massas, todas palpáveis, obtidas por PAAF para citologia e biópsia cirúrgica para histopatologia. Desse total de amostras, 176 eram correspondentes com processos neoplásicos, sendo que 90,9% foram compatíveis entre a citologia e a histopatologia. No geral, a citologia apresentou ser um método de diagnóstico de confiança, para o diagnóstico de massas cutâneas e subcutâneas na prática clínica de animais de companhia.

O melanoma é classificado por alguns autores como uma neoplasia de células redondas. Mas a verdade é que existe dificuldade na sua caracterização microscópica, visto que as suas células podem apresentar-se do tipo epitelial, mesenquimatoso ou redondo. Os melanomas benignos contêm, geralmente, tanto pigmento no seu citoplasma que se torna difícil avaliar as suas células em detalhe, como podemos observar na figura 6. Quanto ao melanoma maligno, este apresenta frequentemente muito menos pigmentação que o benigno, tornando mais fácil a identificação de critérios de malignidade, como o nucléolo bastante proeminente, representado na figura 7 (Barger, 2012).

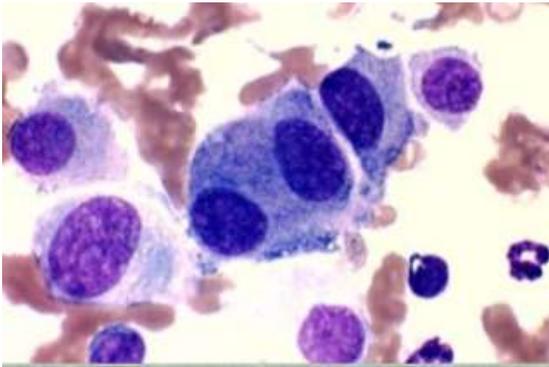


**Figura 6:** Imagem citológica de melanoma benigno com bastante pigmentação (Barger, 2012).

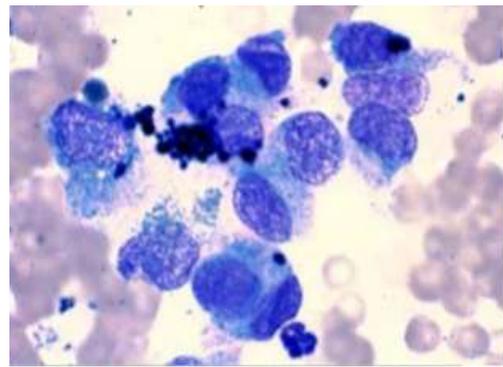


**Figura 7:** Citologia de melanoma maligno (Barger, 2012).

A aparência citológica desta neoplasia poderá incluir anisocitose e anisocariose demarcadas, assim como células multinucleadas com menor frequência. As células neoplásicas apresentam um núcleo redondo a oval, proeminente e de grandes dimensões. O nucléolo proeminente e de coloração pálida apresenta quantidades variáveis de citoplasma acinzentado. A maior parte das células apresenta uma quantidade variável de melanina com diversas apresentações, como se pode verificar na figura 8 e 9.

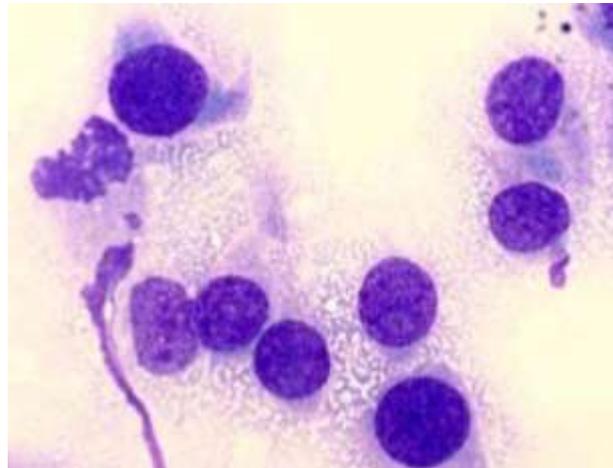


**Figura 8:** Citologia de melanoma maligno com pigmento de formato tipo areia nas células neoplásicas (Patterson & Latimer, 2001).



**Figura 9:** Células neoplásicas com presença de pigmento grosseiro e redondo (Patterson & Latimer, 2001).

Com menor frequência, o melanoma poderá tratar-se de um melanoma amelanótico ou desprovido da formação de pigmento (figura 10), com variado número de mitoses e presença de células inflamatórias acompanhadas de necrose (Patterson & Latimer, 2001).



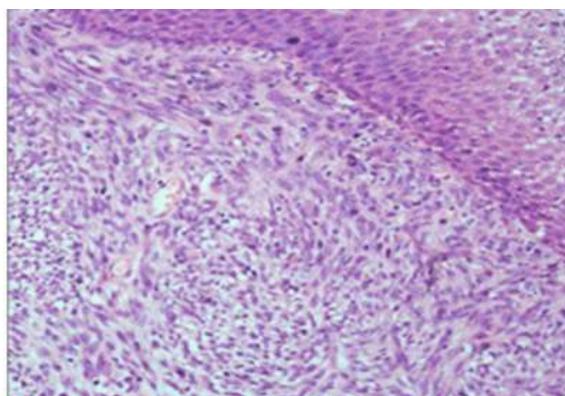
**Figura 10:** Células neoplásicas desprovidas de pigmentação numa citologia de melanoma amelanótico (Patterson & Latimer, 2001).

A primeira classificação histológica do melanoma foi proposta por Weiss e Frese em 1947, cuja divisão foi feita em melanoma benigno, melanoma benigno da derme e melanoma maligno, com os subtipos do tipo epitelióide, fusiforme, epitelióide e fusiforme, e também do tipo dendrítico.

Mais tarde, em 1979, Bostock decidiu avaliar a significância prognóstica desta classificação em 34 cães, concluindo que o sistema proposto por Weiss e Frese era de grande valor como guia morfológico e que permitia identificar as diversas categorias histopatológicas tanto para as lesões benignas como malignas. Mas ainda assim, a sua relevância quanto ao prognóstico era muito baixa, isto porque no estudo realizado pelo mesmo, 10% dos melanomas caracterizados histologicamente como benignos apresentaram comportamento maligno, e em que 5% dos cães com diagnóstico de melanoma maligno ficaram completamente curados apenas com a excisão cirúrgica do tumor. Nesse estudo, Bostock comparou melanomas da pele com diferentes índices mitóticos, sendo que o índice mitótico se revelou de grande importância como fator de prognóstico. Posto isto, decidiu que seria mais fácil diferenciar os melanomas em ‘bem-diferenciados’ e ‘pouco-diferenciados’, sem qualquer subtipo.

Mais tarde, a Organização Mundial de Saúde (OMS) reviu este sistema e introduziu o conceito de ‘melanocitoma’ para classificar todas as variantes congênitas ou adquiridas de neoplasias originárias dos melanócitos, classificando todas as suas vertentes malignas de, apenas, ‘melanoma’ (Ihrke, Walder, & Affolter, 2005).

Histologicamente, o melanoma maligno pode apresentar-se como sendo do tipo altamente melanótico ou do tipo altamente amelanótico a anaplásico. Os melanócitos anaplásicos formam, com frequência, ninhos na submucosa numa estrutura mista de células epiteliais e fusiformes, juntamente com infiltração juncional entre as células basais e a submucosa. Estas células anaplásicas apresentam-se com citoplasma abundante e, um ou mais núcleos de forma oval e alongada, e um nucléolo bastante evidente, como podemos observar na figura 11 (Head, Else, & Dubielzig, 2016).



**Figura 11:** Melanoma amelanótico oral (Nishiya et al., 2016)

O diagnóstico histopatológico do melanoma é, por vezes, um grande desafio, principalmente se o tumor não contém melanina. Estima-se que os melanomas amelanóticos representem um terço de todos os casos de melanoma em cães, sendo que o seu aspeto microscópico poderá ser semelhante a carcinomas, sarcomas, linfomas e a tumores osteogénicos (Nishiya et al., 2016).

A classificação histológica das neoplasias em benignas e malignas é geralmente associada ao prognóstico e tempo de sobrevivência, mas não é o suficiente, pois em diversas publicações obtemos classificações morfológicas distintas que por si só dificultam a avaliação e previsão final (R. Smedley, 2012).

Em termos de previsão de comportamento destas neoplasias, a atipia nuclear e o índice mitótico são os fatores que apresentam maior valor preditivo nos variados locais anatómicos, tendo sempre em conta que nenhum parâmetro deve ser usado isoladamente para obter uma apreciação de prognóstico. Os critérios histológicos apresentados na tabela 1 são os descritos para melhor caracterizar o núcleo em muito ou pouco diferenciado, para que as categorias subjetivas de médio, moderado ou severo possam ser mais exatas na definição do grau de atipia. Em casos de leve atipia nuclear o prognóstico poderá ser favorável, enquanto que em casos com atipia demarcada o prognóstico é menos favorável. E em situações de atipia moderada o prognóstico é indeterminado (Spangler & Kass, 2006).

**Tabela 1 – Características de atipia nuclear**

<b>Bem diferenciado ou células melanocíticas típicas</b>	<b>Células neoplásicas atípicas ou indiferenciadas</b>
Núcleo pequeno	Nucléolo de grandes dimensões ou formato irregular, excentricamente posicionado no núcleo
Nucléolo simples e centrado	Múltiplos nucléolos
Pequeno aglomerado de cromatina	
Vertentes de cromatina nuclear a estender-se do nucléolo até à membrana nuclear (pode ou não existir)	Em alguns casos existem múltiplos nucléolos que estão aleatoriamente ligados à superfície interna da membrana nuclear porque finas vertentes de cromatina e que dão a aparência de um núcleo grosseiramente vacuolar
Condensação da cromatina ao logo da superfície interior da membrana	
Células que não apresentam nucléolo contêm uma fina e dispersa cromatina na periferia do núcleo	

(Spangler & Kass, 2006)

Quanto ao índice mitótico, este deve ser determinado através da contagem de figuras mitóticas em 10 campos consecutivos de 400x de ampliação num microscópio óptico, começando na zona com maior concentração de figuras mitóticas, no caso dos melanomas orais ou do lábio (Spangler & Kass, 2006), e em campos aleatórios no caso de melanomas cutâneos (Laprie et al., 2001).

A avaliação de uma amostra histopatológica consiste na conjugação de todos estes fatores para que seja possível classificar e categorizar as neoplasias melanocíticas em maligna ou benigna, obtendo assim uma melhor compreensão do prognóstico associado. Caso isso não seja possível, o resultado histopatológico deve ser correlacionado com outros fatores, como o local anatómico, a apresentação clínica e exame do paciente, mas também através de marcadores imunohistoquímicos (R. Smedley, 2012).

### **5.3. Marcadores moleculares**

O melanoma é um tumor que pode ser difícil de diagnosticar patologicamente em algumas situações, principalmente no que diz respeito aos melanomas amelanóticos, que se podem mascarar como sarcomas dos tecidos moles ou tumores de células redondas (Smedley, Lamoureux, Sledge, & Kiupel, 2011; Choi & Kusewitt, 2003).

O melanoma em humanos origina-se em melanócitos que sofrem diversos eventos moleculares que levam à sua transformação (Nishiya et al., 2016). As alterações genéticas que estão envolvidas nesta progressão ainda estão a ser estudadas, mas diversos genes e mecanismos genéticos têm vindo a ser identificados em medicina humana, revelando a sua importância como diagnóstico, estabelecimento de prognóstico e tratamento. O locus CDKN2A, os genes BRAF, NRAS, INK4a/ARF, PTEN, c-kit, NEDD9 e MITF são os genes e mecanismos genéticos estudados em medicina humana que fazem parte do aparecimento do melanoma (Fisher, Kwong, & Chin, 2008).

Gillard et al. (2014), compararam a histopatologia e alterações genéticas descritas em humanos com a do melanoma canino. Foi possível observar que, citologicamente, os melanomas caninos e humanos apresentam características muito semelhantes, sugerindo uma nova classificação do mesmo. Estudaram também os genes BRAF, NRAS; PTEN, KIT, GNAQ e CDK4, sendo que não foram registadas mutações, à exceção de 3 casos positivos para mutação do gene NRAS e 2 casos em que ocorreu mutação do gene PTEN, em que um dos casos foi positivo para ambas.

O melanoma em humanos e cães partilha diversas semelhanças imunohistoquímicas, como o gene KIT, PTEN e versões fosforiladas de AKT e ERK1/2, particularmente em alguns subtipos de melanoma humano, como o melanoma das mucosas, do dígito e ungular, curiosamente com predisposição para um crescimento rápido e comportamento agressivo (Khanna et al., 2006).

O índice de Ki67 é uma proteína nuclear expressa em todas as fases do ciclo celular, exceto nas células em repouso (Gardner & Greiner, 2006), sendo a sua expressão usada como uma medição de crescimento tumoral (Bergin, Smedley, Esplin, Spangler, & Kiupel, 2011). O índice de Ki67 é usado em humanos como fator de prognóstico em diversos tipos de cancro (Bergin et al., 2011), assim como acontece no mastocitoma em cães (Webster, Yuzbasiyan-Gurkan, Miller, Kaneene, & Kiupel, 2007). Para o melanoma canino existem alguns estudos muito limitados, tais como no estudo realizado por Laprie et al. (2001), em que um índice de Ki67 de pelo menos 15% estava correlacionado com um pior prognóstico. Noutro artigo, em cães com melanoma cutâneo e oral, valores de Ki67 maiores do que a mediana correlacionaram-se com um aumento de probabilidade de morte um ano após remoção cirúrgica (Millanta et al., 2002).

Dada a incoerência de resultados e necessidade de obter um valor padrão deste índice que possa ser aplicado a vários tipos de melanoma, foi realizado um estudo no qual correlacionaram este índice com outros fatores de prognóstico, como o índice mitótico, atipia nuclear e a pigmentação em melanomas orais caninos. Visto que em alguns casos o valor do índice foi incoerente com a progressão clínica da doença, não foi possível obter um valor ‘cut-off’, mas sim um valor limite. Para além disso a atribuição de uma decisão dicotómica a uma variável contínua é também questionável. Recomendam então que um índice de Ki67 superior ou igual a 19,5 é indicativo de um tempo médio de sobrevivência de 1 ano, devendo ser acompanhado pela avaliação de outros parâmetros prognósticos anteriormente descritos (Bergin et al., 2011).

O Melan-A é um produto do gene MART-1, que é reconhecido como antigénio em melanócitos neoplásicos, pelos linfócitos T citotóxicos autólogos (Ohsie, Sarantopoulos, Cochran, & Binder, 2008).

Num estudo realizado por Smedley et al. (2011), no qual avaliaram a significância, como fatores de diagnóstico, para diversos marcadores imunohistoquímicos, o Melan A, assim como o PNL2, TRP-1 e TRP-2, demonstraram-se altamente sensíveis e 100% específicos para a deteção de melanomas amelanóticos orais e do lábio.

Ramos-Vara et al. (2000), realizaram uma revisão imunohistoquímica de 122 melanomas orais caninos e 7 melanomas metastáticos sem localização do tumor primário conhecida, no qual 92% foram positivos para o Melan-A, tendo em conta que 32% não eram pigmentados, assumiram que uma grande proporção seriam melanomas amelanóticos que reagiram ao Melan-A. Obtiveram também casos positivos para outros tumores não melanocíticos, embora numa percentagem muito baixa, concluindo assim que o Melan-A é um marcador bastante útil para tumores com derivação melanocítica de linhagem incerta.

A enzima cicloxigenase (COX) apresenta duas isoformas, a COX-1, que é expressada em variados tecidos e participa ativamente na regulação de funções fisiológicas normais, como a citoproteção da mucosa gástrica, controlo da agregação plaquetária, função renal e na reprodução. Já a COX-2, ausente em células normais, pode ser induzida por fatores de crescimento, reações inflamatórias, promotores tumorais e oncogenes (Williams & DuBois, 1996).

No estudo realizado por Pires, Garcia, Prada, & Queiroga. (2010), a expressão de ambas as COX-1 e COX-2 foi avaliada ao determinar a percentagem de células positivas, definição da sua intensidade e atribuindo uma pontuação de reatividade. No geral, a expressão de ambas foi positiva para os melanomas da pele, oral e ocular. A expressão de COX-1, como seria de esperar, foi observada na grande maioria das amostras de tumores, assim como em amostras de tecido cutâneo e oral ausentes de neoplasia. Já a COX-2, não foi expressada em tecidos normais, ou nos melanomas benignos, mas sim numa grande porção dos melanomas malignos.

## **6. Estadiamento**

O estadiamento de cães com melanoma é bastante objetivo. Os exames clínicos base para completar um estadiamento incluem a história clínica e exame físico, com exames complementares como o hemograma e bioquímicas séricas, e também urianálise. Do ponto de vista imagiológico exigem-se três projeções radiográficas do tórax e, para concluir, citologia de linfonodos, mesmo que linfadenomegália não esteja presente (Bergman et al., 2012). Apesar de a radiografia ser o método mais comum de diagnóstico imagiológico para tumores primários ou na identificação de metástases, a tomografia computadorizada (TC) proporciona uma informação mais completa e detalhada, tanto na região torácica como abdominal, devendo ser considerada consoante os casos e a localização do tumor (Forrest & Kraft, 2012).

Num estudo que pretendia avaliar a associação entre a linfadenomegália e a metastização em melanomas da cavidade oral conclui-se que, 40% dos cães já teriam invasão metastática dos linfonodos sem a presença de linfadenomegália, e que 70% dos cães com melanoma oral já apresentavam metastização dos linfonodos locais no momento de diagnóstico (Williams & Packer, 2003).

Deverá ser também incluído estadiamento da cavidade abdominal, visto que os melanomas podem metastizar para os linfonodos abdominais, fígado, glândulas adrenais ou outros locais, com recurso a ecografia abdominal ou TC (Bergman et al., 2012).

O primeiro sistema de classificação para estadiamento do melanoma foi criado pela OMS em 1980 (Tabela 2), cujo objetivo foi de categorizar os tumores quando ao tamanho e à presença de metástases locais e distantes (Owen, 1980).

**Tabela 2** – Sistema de classificação da OMS para o melanoma oral, aplicável a outros locais.

Estadio	Tumor (T)	Linfonodo (N)	Metástases (M)
<b>I</b>	< 2 cm	-	-
<b>II</b>	2-4 cm	-	-
<b>III</b>	> 4 cm ou envolvimento ósseo	Sim	-
<b>IV</b>	Qualquer dimensão	Sim ou Não	Sim

(Owen, 1980)

Este sistema de classificação generalista indica que cães com estadio I apresentam tumores com menos de 2 cm de diâmetro, enquanto que os cães com estadio II apresentam entre 2 a 4 cm de diâmetro e no estadio III com diâmetro superior a 4 cm, sendo que para o estadio IV podem apresentar qualquer dimensão. Os cães em que esteja presente metastização nos linfonodos classificam-se como estadio III e, no caso dos cães com metástases distantes, classificam-se no estadio IV (Owen, 1980).

Em 1994, foi proposto um sistema alternativo de estadiamento para o melanoma oral maligno. Apesar de diversas características clínicas e histopatológicas apresentarem grande importância como fatores de prognóstico em diversos estudos, apenas a dimensão do tumor, juntamente com o índice mitótico e a localização do tumor são comuns a todos os artigos. Daí que, foi então proposto um novo sistema de classificação conforme representado na figura 12.

**Figura 12** – Recomendações alternativas ao estadiamento de neoplasias orais em cães.

<b>T: Primary tumour</b>			
T1	Tumour in situ or $\leq 2$ cm maximum diameter (volume $\leq 8$ cm <sup>3</sup> )		
T2	Tumour 2-4 cm maximum diameter (volume 8-64 cm <sup>3</sup> )		
T3	Tumour $> 4$ cm maximum diameter (volume $> 64$ cm <sup>3</sup> )		
<b>Mitotic index</b>			
(a)	$\leq 3$ per high power field		
(b)	$> 3$ per high power field		
Oral cavity or oropharyngeal location			
(1)	Rostral mandible/caudal maxilla		
(2)	Other		
<b>N: Regional lymph nodes</b>			
N0	No evidence of regional node involvement		
N1	Histological evidence of regional node involvement		
N2	Fixed nodes		
<b>M: Distant metastasis</b>			
M0	No evidence of distant metastasis		
M1	Distant metastasis (including distant nodes)		
<b>Stage grouping</b>			
	<b>T</b>	<b>N</b>	<b>M</b>
I	T1a'	N0	M0
II	T1a', any T1b, T2a'	N0	M0
	Any T	N1	M0
III	T2a', any T2b or T3	N0	M0
	Any T	N2	M0
	Any T	Any N	M1

(Hahn et al., 1994)

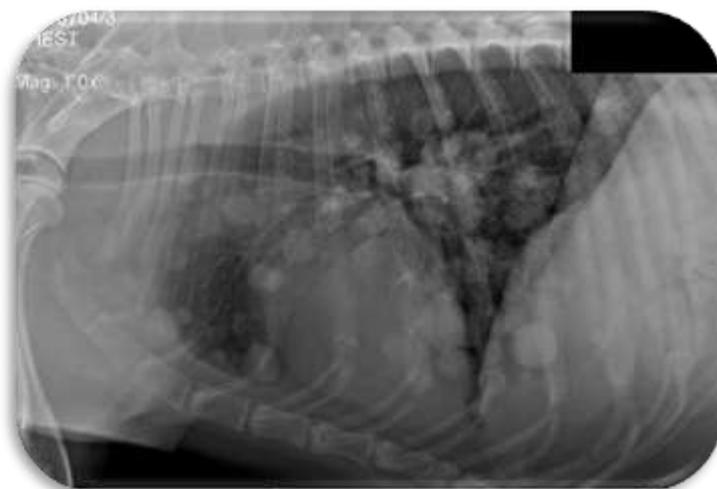
O objetivo do estadiamento é proporcionar detalhadamente a extensão clínica, anatômica e patológica do tumor, classificando-o para cada paciente. O primeiro sistema de classificação da OMS não preenchia todos esses requisitos, visto que o estadiamento necessita de ser específico para o tumor e sua localização. Este novo sistema provou ser de elevada significância não só, no que toca aos tempos de remissão e sobrevivência, mas também proporciona uma indicação quanto à necessidade de terapia adjuvante após a excisão cirúrgica do tumor (Hahn, DeNicola, Richardson, & Hahn, 1994).

O exame físico é um dos parâmetros de estadiamento críticos, principalmente no que toca à localização do tumor. Os tumores da pele são normalmente benignos, enquanto que os tumores das junções mucocutâneas, lábios, do dígito e oral são frequentemente malignos. Acompanhado da localização, outro fator bastante importante é quanto à dimensão, que dá também uma indicação prognóstica ainda relevante. Hemograma completo, bioquímica séricas gerais e urianálise fazem também parte do estadiamento do melanoma, tendo a sua maior importância no que toca à necessidade do paciente de realizar cirurgia, quimioterapia

ou radioterapia. Quanto aos linfonodos, para qualquer localização, os linfonodos mais próximos devem ser avaliados por palpação, citologia e, em caso de dúvida, biópsia. Até mesmo para aqueles que se apresentem de tamanho normal à palpação (Moore, 2008).

A histopatologia é um requisito necessário para o diagnóstico definitivo de melanoma. Tipicamente é feito o seu diagnóstico pela presença de grânulos de melanina no citoplasma usando um microscópio ótico. Ainda assim, poderão existir melanomas amelanóticos em que não seja possível identificar melanina, o que faz com que seja necessário adicionar marcadores imunohistoquímicos para o seu diagnóstico (Moore, 2008).

Quanto às radiografias torácicas, estas poderão indicar a ocorrência de metastização distante no momento de diagnóstico (Moore, 2008), revelando a sua importância, visto que, a metastização pulmonar ocorre numa fase mais tardia da doença (Hahn et al., 1994).



**Figura 13** – Padrão metastático difuso, adaptado de <http://www.vetfolio.com/oncology/canine-prostatic-carcinoma-compendium>, acessado em 30-03-2018.

A radiografia local do tumor, no que toca aos tumores do dígito e orais é bastante importante, fornecendo informação quanto ao tamanho e invasão do tumor. Sempre que não for possível determinar quanto às margens ou envolvimento ósseo do tumor, deve ser considerada a TC e a ressonância magnética (RM) como meios imagiológicos mais avançados (Moore, 2008).

Existe também evidência que suporta a ocorrência de metastização sistemática para outros locais, nomeadamente o rim, miocárdio e cérebro (Bostock, 1979b). Caso exista

suspeita deste tipo de metastização pela história, exame físico ou análises sanguíneas, deverá então realizar-se estadiamento da cavidade abdominal e sistema nervoso central, através de ecografia abdominal, TC ou RM (Moore, 2008).

Segundo o estadiamento alternativo proposto por Hahn et al. (1994), cães incluídos no estadio I obtiveram uma mediana de sobrevida (MST) de cerca de 66 meses, enquanto que para o estadio II a MST foi de cerca de 33 meses, e por fim, cerca de 23 meses para os cães incluídos no estadio III.

## 7. Tratamento

### 7.1. Cirurgia

A cirurgia continua a ser o método de eleição para o tratamento do melanoma oral (Boston et al., 2014), ocular (Dubielzig et al., 2010), cutâneo e do dígito (Wobeser et al., 2007), que associada a um diagnóstico precoce poderá ser o suficiente para um sucesso terapêutico (Bergman et al., 2012).

Os tumores da porção caudal da cavidade oral são, mais frequentemente, diagnosticados com maiores dimensões comparado aos da porção rostral, que são mais fáceis de identificar. Esta característica torna mais difícil a excisão cirúrgica de tumores mais caudais devido à sua dimensão e estadio avançado. Os melanomas cutâneos, com menos de 2 cm, bem circunscritos e de crescimento lento são, na maioria das vezes, benignos e fáceis de remover cirurgicamente com margens de 1 cm à volta do tumor e com um plano fascial profundo. Melanomas da pele que se apresentem com grandes dimensões, mal definidos, ulcerados e de rápido crescimento são geralmente malignos e mais difíceis de remover cirurgicamente, devendo ser acompanhados de biópsia incisional e imunohistoquímica para confirmação de diagnóstico. Nos casos em que a citologia dos linfonodos se revele dúbia, estes devem ser excisionados e submetidos para histopatologia (Bergman et al., 2012).



**Figura 14** – Biópsia excisional de linfonodo poplíteo metastático (Bergman et al., 2012).

Quanto aos melanomas orais, mandibulectomia ou maxilectomia parcial são geralmente efetuadas, principalmente para os que advêm da gengiva ou da mucosa oral proximal ao osso (Wallace, Matthiesen, Patnaik, Matthiesen, & Patnaik, 1992).

Deverá ser acompanhada de técnicas imagiológicas como a TC ou RM para perceber, não só, qual a extensão do tumor e o potencial envolvimento ósseo, mas também detetar a presença de linfonodos reativos que são mais difíceis de palpar, como os linfonodos retrofaríngeos mediais. Alguns melanomas ocorrem em zonas da mucosa que não estão adjacentes ao osso, ou no lábio, ou na língua (figura 15), sendo mais fáceis de excisionar pelo simples facto de ser uma excisão de tecidos moles apenas.



**Figura 15** – Melanoma lingual após biópsia incisional. Estes tumores podem ser removidos com margens de 1-2 cm e uma fásia muscular profunda, sem que esta perca a sua arquitetura ou função (Bergman et al., 2012). Imagem retirada de <http://www.mypetsdentist.com/canine-tongue-tumors-retrospective-review.pml>, acedido em 16-04-2018.

A excisão completa de tumores orais comprovou ter um impacto bastante significativo no prognóstico. Para tumores de grandes dimensões que demonstram evidência de extensão intramedular, deve ser considerada uma total ou subtotal hemimandibulectomia (Bergman et al., 2012), mas ainda assim, 22% das mandibulectomias e 48% das

maxilectomias recidivam localmente (Wallace et al., 1992; Kosovsky, Matthiesen, Marretta, & Patnaik, 1991).

Existe pouca evidência quanto ao tipo de margens a utilizar nestas cirurgias. Bergman et al., 2012 sugerem que margens de 1 a 2 cm são, geralmente, suficientes para a excisão de melanomas malignos com margens bem definidas. Nos tumores orais estas margens são mais difíceis de obter e devem ser auxiliadas por meios de diagnóstico imagiológico. Quanto aos melanomas do dígito, as margens são normalmente maiores, visto que, a amputação do dígito é a cirurgia de eleição para este tipo de melanoma. Cirurgias não planeadas ou com limites mal definidos não devem ser efetuadas, pois a primeira cirurgia é a melhor oportunidade para se obter uma excisão do tumor com margens limpas. Para os tumores em que não é possível realizar cirurgia, ou cuja histopatologia revele margens incompletas, deve ser considerada uma terapia coadjuvante como a radioterapia, quimioterapia ou imunoterapia (Bergman et al., 2012).

A cirurgia não é recomendada em tumores cujo estadiamento revele metastização, mas estudos recentes em medicina humana revelam o papel importante da cirurgia citoreductiva em conjunto com a quimioterapia ou imunoterapia (Tafra, Dale, Wanek, Ramming, & Morton, 1995).

## **7.2. Radioterapia**

A radioterapia pode desempenhar um papel importante em melanomas malignos nos cães, no controlo da doença local e linfonodos regionais (Proulx et al., 2003), podendo ser uma terapia primária ou adjuvante, com protocolos hipofracionados e definitivos a serem realizados nestes tumores (Freeman, Hahn, Harris, & King, 2003)

O melanoma é considerado como um tumor radioresistente em que é necessário utilizar doses mais altas de radioterapia em cada fração para alcançar o controlo da doença local (Bergman et al., 2012), mas diversos estudos demonstram que a radioterapia desempenha um papel importante no tratamento do melanoma (Khan, Khan, Almasan, Singh, & MacKlis, 2011).

A maioria dos protocolos procura utilizar uma maior dose por fração, de acordo com o tipo de melanoma. Os protocolos hipofracionados contemplam a vantagem de que são necessários menos procedimentos anestésicos, menores custos e menor tempo que os tutores perdem. Estes protocolos resultam também, na maioria dos casos, em efeitos adversos muito menos agudos. A grande desvantagem de utilizar os protocolos hipofracionados é de que,

muitas vezes, não atingem o controlo da doença local e apresentam um risco aumentado para efeitos secundários a longo prazo mais adversos (Bergman et al., 2012).

A quimioterapia como terapia única apresenta poucos benefícios em termos de prognóstico clínico e controlo da doença local. Já a combinação com radioterapia pode atrasar a progressão local do tumor e melhorar os tempos de sobrevivência (Nishiya et al., 2016).

Existem estudos que demonstram os benefícios da terapia conjunta, como é o caso do estudo realizado por Cancedda et al, (2016), que demonstra que a utilização de quimioterapia com temozolamida pós-radioterapia melhorou os tempos de sobrevivência, comparando com a utilização de apenas radioterapia, de 6,8 meses para 3,6 meses, respetivamente (Cancedda et al., 2016).

Noutro estudo, em cães com ressecção incompleta de melanoma oral, foram tratados com cisplatina ou carboplatina, uma vez por semana, uma hora antes da radioterapia. Neste estudo, a mediana de sobrevivência atingiu os 11,9 meses, que é o maior tempo de sobrevivência atingido, comparando com estudos anteriores (Freeman et al., 2003).

O plano de tratamento com radioterapia pode ser feito manualmente ou através do computador, permitindo uma distribuição mais homogénea da dose de radiação, com melhor separação entre os tecidos. A maioria dos estudos reporta a utilização de margens de 2 cm à volta do limite do tumor ou da cicatriz cirúrgica (Bergman et al., 2012).



**Figura 16** – Sessão de radioterapia num cão, retirado de <http://veterinarymedicine.dvm360.com/meningioma-9-year-old-chocolate-lab-radiation-oncology-perspective>, acedido em 31-03-2018.

### **7.3. Quimioterapia**

Apesar do sucesso de tratamento com cirurgia ou radioterapia, a principal causa de morte em cães com melanoma, principalmente no que toca ao melanoma oral, é a metastização. Posto isto, recomenda-se a utilização de terapias sistémicas, nomeadamente a quimioterapia, cujos protocolos têm vindo a ser estudados, mas nos quais não tem sido obtida melhoria nos tempos de sobrevivência, aquando comparada com o tratamento local (Nishiya et al., 2016).

Diversos estudos foram realizados no sentido de perceber até que ponto a quimioterapia apresenta melhorias nos tempos de sobrevivência. Rassnick et al. (2001), utilizou um esquema de carboplatina antes de realizar cirurgia em melanomas orais e cutâneos, com uma taxa de resposta ao tratamento de apenas 28%.

Noutro estudo, em melanomas orais, foi efetuado um protocolo de cisplatina em combinação com piroxicam, no qual se obteve uma taxa de remissão de 18% e MST de 119 dias (Boria et al., 2004).

Num estudo mais recente, foi avaliada os efeitos da carboplatina em 63 cães com diagnóstico de melanoma oral, cutâneo e do dígito, no qual não existiu qualquer tipo de melhoria nos tempos de sobrevivência (Brockley, Cooper, & Bennett, 2013).

Boston et al. (2014) realizou um estudo no qual tratou 152 cães com melanoma oral, não obtendo qualquer diferença entre a MST de cães apenas tratados com cirurgia e cães que foram tratados com cirurgia e terapia adjuvante, como é o caso da quimioterapia ou imunoterapia. Tanto a carboplatina, como a lomustina, dacarbazina, doxorubicina, metronómica, ou a vacina do melanoma comercial não apresentaram diferenças estatisticamente significativas. Ainda assim, a radioterapia no pós-operatório demonstrou uma melhoria nos tempos de sobrevivência, embora não significativa devido à análise multifatorial utilizada neste estudo.

#### **7.3.1. Combinação de quimioterapia com radioterapia**

Existem diversos estudos cujos resultados se demonstraram inconclusivos ou contrários no que toca à combinação destas duas terapias, não havendo uma evidência clara de que diminui o risco de metastização ou recidiva local, ou até mesmo que estenda a MST (Bergman et al., 2012).

Um dos estudos, realizado por Proulx et al. (2003), que se baseava num estudo retrospectivo de cães com variadíssimos protocolos de radioterapia, em que uns receberam

quimioterapia e outros não, conclui-se que a quimioterapia não teve um impacto significativo no tempo de sobrevivência. Deve ter-se em conta que neste estudo foi utilizada uma dose de carboplatina inferior à dose recomendada para a maioria das espécies, podendo esse ser o fator que contribuiu para que não existissem diferenças estatísticas (Proulx et al., 2003).

Murphy et al. (2005) realizou um estudo semelhante, no qual os cães que foram apenas tratados com radioterapia atingiram os 307 dias de MST, e os cães tratados com radioterapia e quimioterapia atingiram apenas os 286 dias, não havendo novamente evidência de benefício na utilização de ambas as terapias. Neste estudo as doses de carboplatina foram escolhidas para que fosse diminuída a sua toxicidade, visto que na literatura já existia evidência desta toxicidade para as doses geralmente utilizadas.

Além disso, estudos recentes como o de Hume, Johnson, & Williams (2009), têm reportado bastantes efeitos adversos sistêmicos, como é o caso de neutropenias, trombocitopenias e toxicidade gastrointestinal, levando a que muitos dos cães que recebem ambas as terapias não as consigam terminar ou tenham que as interromper devido a esses mesmos efeitos (Hume et al., 2009).

#### **7.4. Imunoterapia**

Tanto os estudos em medicina veterinária como em medicina humana referem cada vez mais a resistência à quimioterapia neste tumor (O'Day & Boasberg, 2006), levando a querer que outras opções terão de ser tomadas (Bergman et al., 2012).

A imunoterapia representa uma terapêutica sistêmica bastante lógica para o melanoma, sendo que em medicina veterinária têm sido usadas vacinas autólogas das células tumorais (MacEwen, Patnaik, Harvey, Hayes, & Matus, 1986), vacinas transfectadas com interleucina 2 de células tumorais alogênicas (Alexander et al., 2006), ou até vacinas de células dendríticas carregadas de antígenos melanossomais diferenciados (von Euler et al., 2008).

Apesar de estas abordagens produzirem respostas anti-tumorais, a metodologia para a sua criação é dispendiosa, dependendo também das amostras do tumor e outros fatores que possam afetar a sua produção (Horiuchi et al., 2010).

A vacinação com ADN supera as outras terapias previamente estudadas no que toca ao desenvolvimento de vacinas. O ADN é pouco dispendioso e simples de purificar em grandes quantidades. O procedimento consiste no isolamento do gene que codifica o antígeno de interesse, clonando-o num plasmídeo de expressão bacteriana com um promotor

constitutivamente ativo. O plasmídeo é então introduzido na pele ou músculo do paciente através de uma injeção intradérmica ou intramuscular. As células dendríticas no local de injeção vão apresentar o antígeno transcrito e traduzido num contexto de um complexo de histocompatibilidade e moléculas co-estimulatórias. Apesar de estas vacinas com ADN causarem respostas imunitárias a proteínas virais, a vacinação contra um antígeno específico para os tecidos de células cancerígenas é muito mais complexa. Para isto, existe a vacinação com um antígeno ou ADN xenogénico que seja homólogo para o antígeno cancerígeno (Guevara-Patiño, Turk, Wolchok, & Houghton, 2003).

Foi criada, para cães com melanoma oral de estadio II ou III, uma vacina xenogénica com a proteína tirosinase de ADN humano, a Oncept (Bergman & Wolchok, 2008). Esta vacina é geralmente bem tolerada, sem registo de reações adversas sistémicas e apenas com pequenas reações no local de injeção (Grosenbaugh et al., 2011). A tirosinase é uma glicoproteína melanosomal, essencial na síntese de melanina, encontrada frequentemente em sobreexpressão nos melanomas (Ramos-Vara et al., 2000). A imunização utilizando esta vacina induz a produção de anticorpos e células T citotóxicas contra células B16 do melanoma (Weber et al., 1998). Esta vacina pode então quebrar a tolerância contra a diferenciação antigénica do tumor e a proliferação de antígenos, anticorpos, células T e respostas anti-tumorais (Bergman et al., 2012).

No primeiro estudo, que avaliou e comprovou a eficácia da vacina, existiu um grande limitação do desenho desse mesmo estudo por este se basear na utilização de uma população de controlo histórica (Grosenbaugh et al., 2011). Já no estudo realizado por Ottnod et al. (2013), a população escolhida foi de apenas um centro, o que poderá ter condicionado as conclusões do mesmo.

Ainda assim, este estudo retrospectivo mais recente, reporta a utilização da Oncept em 30 cães com melanoma de estadio II e III, cujos resultados demonstram que não foi possível obter um tempo de sobrevivência ou intervalo livre de doença superiores, ou um aumento da MST, comparando com cães que não receberam a vacina (Ottnod et al., 2013).

O papel das células dendríticas como um adjuvante biológico contra o melanoma maligno, através da indução de uma resposta imunitária no paciente oncológico, tem vindo a ser explorado. Estas células são células apresentadoras de antígeno com a capacidade de iniciar uma resposta imunitária, qualificando-se assim para o princípio de estratégia vacinal no tratamento do melanoma (Nishiya et al., 2016).

Existem poucos estudos em medicina veterinária que comprovem a eficácia desta vacina devido aos seus custos elevados e estratégias de produção pouco desenvolvidas, mas ainda assim, alguns estudos como o de (Gyorffy et al., 2005), que se baseou na utilização de células dendríticas com um vetor do adenovírus que codificava um xenoantígeno, o antígeno gp100 do melanoma humano, como terapia coadjuvante da radioterapia num pequeno número de cães com melanoma. Um dos cães tinha presença de atividade de linfócitos T citotóxicos com antígeno específico para o melanoma em circulação, sem sinais clínicos, sistêmicos ou locais, recidivando do melanoma 48 meses após a primeira injeção. Noutro cão, que tinha essa mesma atividade negativa em circulação, saiu de remissão apenas 22 meses após a primeira vacinação.

Apesar de a imunoterapia pela abordagem das células dendríticas apresentar resultados promissores, ainda acarreta algumas desvantagens que impossibilitam a sua aplicação, para além de que carece de mais estudos que comprovem a sua eficácia (Nishiya et al., 2016).

## **7.5. Outros tratamentos**

Outras modalidades terapêuticas têm sido investigadas para o controlo da doença local nestes tumores, como é o caso da utilização de implantes intralesionais de cisplatina (Kitchell et al., 1994), eletroquimioterapia com bleomicina intralesional (Spugnini et al., 2006) e muitos outros que ainda não produziram resultados significativos (Bergman et al., 2012).

## **8. Prognóstico**

### **8.1. População**

Existe pouca literatura no que toca à correlação entre as características físicas dos cães e a sua significância como fatores de prognóstico (Smedley, Spangler, et al., 2011).

Apenas existe um estudo que pretende avaliar a relevância da raça como fator prognóstico, referindo que 75% das neoplasias melanocíticas exibem comportamento benigno em raças como o doberman pinscher e schnauzer miniatura, ao contrário de raças como o poodle miniatura, em que 85% das neoplasias melanocíticas eram malignas (Bolon et al., 1990). Ainda assim, outro estudo sobre o estadiamento de melanomas orais, não reporta

diferenças estatisticamente significativas entre raças, embora algumas raças sejam mais comuns, como o golden e o labrador retriever, e também o cocker spaniel (Hahn et al., 1994).

Quanto ao gênero, também não parece haver qualquer tipo de predisposição, seja qual for a localização da neoplasia, embora inicialmente fosse reportada uma maior predisposição em machos (Smith et al., 2002), atualmente diversos estudos contrariam essa mesma hipótese (Smedley, Spangler, et al., 2011).

A idade é um fator de prognóstico difícil de avaliar, visto que animais mais velhos correm maiores riscos de sofrer complicações nas cirurgias e no pós-operatório, com menos capacidade de recuperação que animais mais jovens. Para além disso, a probabilidade de apresentarem doenças concomitantes que compliquem o seu tratamento é bastante maior em animais mais velhos (Smedley, Spangler, et al., 2011).

Alguns artigos reportam que os melanomas orais malignos são mais comuns em cães mais velhos (Millanta et al., 2002; Schultheiss, 2006), mas ainda assim, na grande maioria não é possível correlacionar a idade com o tempo de sobrevivência nestes tumores (Smedley, Spangler, et al., 2011).

Apenas um artigo refere que a idade influencia negativamente a sobrevivência em cães com neoplasias melanocíticas, originárias da pele, dígito e lábios (Spangler & Kass, 2006).

Quanto ao peso, nenhum dos estudos realizados até agora sugerem que exista correlação com o prognóstico (Hahn et al., 1994; Proulx et al., 2003).

## **8.2. Localização e características morfológicas**

A localização do melanoma como fator preditivo do comportamento biológico do tumor é um dos parâmetros mais estudados e comprovados em diversos estudos, embora ainda não seja consensual (Smedley, Spangler, et al., 2011).

Num estudo que comparou as diferentes localizações, as neoplasias melanocíticas da cavidade oral compreendiam uma MST de 147 dias, enquanto que as do dígito e lábios compreendiam 676 dias, e da pele compreendiam 725 dias. Ainda assim, apesar de 92% das neoplasias orais ter sido diagnosticada como maligna, apenas em 59% dos casos ocorreu metastização ou recidiva local (Spangler & Kass, 2006).

Na grande maioria dos artigos, as neoplasias melanocíticas da cavidade oral e lábios apresentam um pior prognóstico, quando comparadas com as neoplasias da pele, que apresentam geralmente um prognóstico mais favorável (Bostock, 1979; Bolon et al., 1990;

Hahn et al., 1994; Ramos-Vara et al., 2000; Smith et al., 2002; Bergman, 2007). Apesar de um grande número destes estudos reportar que as neoplasias da cavidade oral são geralmente malignas e de pior prognóstico (Bostock, 1979; Bolon et al., 1990; Millanta et al., 2002; Mukaratirwa, Chikafa, Dliwayo, & Moyo, 2006), estudos mais recentes contrariam esta definição pela identificação de diversos casos de neoplasias melanocíticas e do lábio com prognóstico bem mais favorável, ainda assim, uma minoria, não sendo possível generalizar estes casos para a grande maioria da população (Schultheiss, 2006; Spangler & Kass, 2006; Bergin, Smedley, Esplin, Spangler, & Kiupel, 2011; Esplin, 2008).

No geral, a localização anatômica é, de facto, um indicador relevante e integral como fator prognóstico. As neoplasias orais são então as que exibem um comportamento geralmente mais agressivo, ao contrário das neoplasias de outras localizações, como as da pele, que padecem ainda de uma classificação histológica mais assertiva no que toca à distinção entre benigno e maligno, não havendo assim um consenso entre os diversos estudos (Smedley, Spangler, et al., 2011).

O tamanho do tumor é também um fator que é muitas vezes associado ao prognóstico, existindo um estudo que reporta que um maior tamanho e volume da neoplasia, em qualquer localização, teve um impacto negativo quanto ao tempo de sobrevivência dos pacientes (Spangler & Kass, 2006). Embora existem também dois artigos que correlacionaram esse mesmo fator e no qual não encontraram qualquer correlação entre o tamanho e volume da neoplasia com o tempo de sobrevivência (Hahn et al., 1994; Proulx et al., 2003).

Devido ao conflito entre diferentes estudos, ainda não é possível avaliar o valor prático desta característica como indicador prognóstico (Smedley, Spangler, et al., 2011).

### **8.3. Características clínico-patológicas**

O estadiamento clínico do paciente está fortemente associado com o prognóstico clínico e de sobrevivência destes animais, principalmente em melanomas orais malignos (Hahn et al., 1994; Harvey et al., 1981; MacEwen et al., 1999).

Hahn et al. (1994) reportou que não existe uma diferença estatisticamente significativa quanto ao tempo de remissão e sobrevivência no estadiamento inicial da OMS, criando assim um novo sistema no qual se baseiam no tamanho da neoplasia, a localização na cavidade oral e o índice mitótico, obtendo assim diferenças significativas nos diferentes estadios criados para este sistema.

A figura 17 é uma representação dos diferentes fatores que completam o estadiamento e o seu nível de significância como prognóstico em cães.

**Figura 17** – Significância dos fatores de prognóstico em neoplasias melanocíticas.

Prognostic Factor	Oral Neoplasms	Lip Neoplasms	Digit Neoplasms	Other Cutaneous Neoplasms
Signalment	No	No	No	No
Weight of dog	No	No	No	No
Stage of disease	Yes	NE	NE	NE
Lymph node metastasis	No <sup>c</sup>	NE	NE	NE
Distant metastasis	Yes	Yes	Yes	Yes
Size of neoplasm	Possible	Possible	Possible	Possible
Symmetry of neoplasm	IN	IN	IN	IN
Morphologic classification (benign vs malignant)	Variable <sup>b</sup>	Variable <sup>b</sup>	Variable <sup>b</sup>	Variable <sup>b</sup>
Nuclear atypia	Yes	Yes	Yes <sup>a</sup>	Yes
Mitotic index	Yes	Yes	Yes <sup>a</sup>	Yes
Cell type	No	No	No	No
Cellular pleomorphism	No	No	No	No
Degree of pigmentation	Yes	Yes	Yes <sup>a</sup>	Yes
Junctional activity	No	Yes	Yes	Uncertain
Intraepithelial neoplastic cells	No	No	No	No
Ulceration	No	NE	Yes <sup>a</sup>	Yes
Level of infiltration/invasion	Possible	NE	Yes <sup>a</sup>	Yes
Lymphatic invasion	Yes	NE	NE	Yes
Necrosis	Possible	Possible	Possible	Possible
Inflammation	Possible	Possible	Possible	Possible
Completeness of excision	IN	IN	IN	IN
Ki67 index	Yes	Yes	Yes <sup>a</sup>	Yes
Proliferation index	IN	IN	IN	IN
Expression of Melan-A, S-100, vimentin, NSE	No	No	No	No
DNA ploidy	Possible	NE	NE	Possible
MCC and MVD	IN	IN	IN	IN
Plasma VEGF	IN	IN	IN	IN
Response to treatment	IN	IN	IN	IN

<sup>a</sup> Only 12-digit neoplasms were included in the Laprie et al. study, and they were grouped together with the other cutaneous neoplasms.

<sup>b</sup> Dependent on which classification system used.

<sup>c</sup> Only limited data available.

Abbreviations: IN, insufficient data available; NE, site not specifically examined; Possible, limited data support that this factor has prognostic significance for this location.

(Smedley, Spangler, et al., 2011)

Parece bastante óbvio que a metastização é um fator indicativo de pior prognóstico (Smedley, Spangler, et al., 2011), sendo reportado em diversos estudos como um fator significativo na sobrevivência do paciente (Spangler & Kass, 2006) e maiores tempos de remissão (Hahn et al., 1994).

Apenas dois artigos estudaram a metastização nos linfonodos regionais como fator de prognóstico, que ao contrário da metastização distante não apresenta qualquer valor prognóstico, padecendo de um grupo de controlo nestes estudos realizados em cães com melanomas orais malignos (Hahn et al., 1994; Proulx et al., 2003).

Posto isto, é possível concluir que a metastização visceral do melanoma é um fator de prognóstico significativo, embora ainda seja necessário realizar mais estudos em

neoplasias benignas e malignas, de variados locais, para concluir quanto ao nível de significância da metastização regional nos linfonodos (Smedley, Spangler, et al., 2011).

No que diz respeito às características histológicas das neoplasias melanocíticas, definidas pela OMS em 1974, em benignas e malignas (Weiss & Frese, 1974), os primeiros estudos reportavam uma lacuna na correlação entre a classificação histopatológica e o prognóstico (Smedley, Spangler, et al., 2011), sendo que alguns reportavam uma grande correlação entre ambas (Todoroff & Brodey, 1979; Bolon et al., 1990; Roels, Tilmant, & Ducatelle, 1999; Laprie et al., 2001), outros em que não existiu qualquer correlação (Harvey et al., 1981), e alguns em que os resultados foram muito variáveis (Bostock, 1979; Schultheiss, 2006).

Diversos estudos tentaram utilizar as características morfológicas para classificar as neoplasias em benignas ou malignas, na tentativa de prever um prognóstico com base nestas características, como a atipia nuclear ou o pleomorfismo celular. O grande entrave foi o facto de que as diferenças entre esquemas de classificação histológica tornou muito difícil a comparação de resultados (Smedley, Spangler, et al., 2011).

Visto que a classificação da atipia nuclear depende da observação e erro humano, delinear um critério específico para a sua classificação é bastante importante. Quando isto acontece, a atipia nuclear está altamente correlacionada com o prognóstico, independentemente da origem anatómica da neoplasia (Spangler & Kass, 2006).

O índice mitótico é outro dos fatores que mais tem vindo a ser estudado de forma a perceber a sua relevância como indicador prognóstico, sendo aparentemente um bom indicador em melanomas da pele, cavidade oral e lábios (Bostock, 1979; Hahn et al., 1994; Millanta et al., 2002; Spangler & Kass, 2006; Sánchez et al., 2007; Bergin et al., 2011), mas não tão útil como a atipia nuclear ou a fração de crescimento (Millanta et al., 2002; Spangler & Kass, 2006; Bergin et al., 2011).

As neoplasias melanocíticas são maioritariamente constituídos ou por células epitelioides ou poligonais, fusiformes ou fibromatosas, ou ainda um misto de ambas. Diversos estudos tentam correlacionar o tipo de células predominantes como fator de prognóstico, mas em nenhum foi possível obter uma correlação estatisticamente significativa (Bostock, 1979; Hahn et al., 1994; Millanta et al., 2002; Spangler & Kass, 2006; Sánchez et al., 2007; Bergin et al., 2011).

Quanto ao grau de pigmentação, poderá ser difícil de diagnosticar um melanoma amelanótico, tornando difícil também objetivar quanto aos graus de pigmentação em

melanomas (Smedley, Spangler, et al., 2011). Apenas num estudo foi possível concluir, com significância estatística, que os melanomas altamente pigmentados, pelo menos em 50% das células, estão relacionados com um pior prognóstico (Bergin et al., 2011).

Diversas neoplasias orais sofrem ulceração devido a trauma na cavidade oral, independentemente da origem celular (Smedley, Spangler, et al., 2011). Um estudo que pretendia avaliar a correlação entre a ulceração e o prognóstico dos pacientes concluiu que não existia qualquer tipo de influência no tempo de remissão e sobrevivência (Hahn et al., 1994). Já noutro estudo, foi possível obter essa correlação, sendo associado a um pior prognóstico com menor tempo de sobrevivência e ainda se provou ser um fator de prognóstico independente (Laprie et al., 2001).

O nível de infiltração e invasão do tumor, quando avaliado numa série de neoplasias melanocíticas benignas e malignas, demonstrou estar associado ao tempo de sobrevivência, sendo que uma infiltração profunda do tumor mostrou ser um fator de pior prognóstico independente (Laprie et al., 2001), e que o comportamento invasivo estará associado negativamente ao tempo de sobrevivência (Roels et al., 1999).

Num estudo, com uma amostra de 389 casos de neoplasias melanocíticas benignas e malignas, em que foi avaliada a presença de necrose, esta demonstrou estar negativamente correlacionada com a sobrevivência dos pacientes (Spangler & Kass, 2006), ainda assim, noutro artigo, com uma amostra de apenas 38 melanomas malignos, concluiu-se que esta correlação era inexistente, independentemente do local do tumor (Millanta et al., 2002). Aparentemente, a necrose é um indicador de prognóstico negativamente correlacionado com o tempo de sobrevivência, tendo em conta o estudo realizado com uma maior amostra (Smedley, Spangler, et al., 2011).

Quanto à presença de inflamação, mais uma vez, os resultados dos estudos são contraditórios, tornando difícil qualificar esta característica como fator de prognóstico (Hahn et al., 1994; Millanta et al., 2002; Spangler & Kass, 2006). Embora a inflamação profunda intratumoral ter sido negativamente correlacionada com o tempo de sobrevivência (Spangler & Kass, 2006), a sua significância padece da realização de mais estudos prospectivos, e com valores padrão para a sua avaliação (Smedley, Spangler, et al., 2011).

A completa excisão cirúrgica de todas as neoplasias melanocíticas é sempre recomendada, apesar de existir pouca literatura que suporte esta recomendação (Wallace et al., 1992). Com base na mais recente literatura não é possível concluir quanto à importância deste parâmetro como fator prognóstico, mas sempre que possível devem ser removidos

completamente com margens de segurança, todas as neoplasias melanocíticas (Smedley, Spangler, et al., 2011).

O melanoma em humanos parece surgir de melanócitos normais que sofrem um número indefinido de eventos moleculares que resultam na sua transformação (Nishiya et al., 2016). Atualmente em patologia veterinária começam a surgir novas ferramentas de imunohistoquímica para melhor apurar um prognóstico destes tumores (Lacroux et al., 2012).

Diversos parâmetros moleculares que são rotineiramente utilizados como fatores de prognóstico em diferentes neoplasias, utilizados em medicina humana, especialmente com acesso à imunohistoquímica, têm sido testados em neoplasias caninas. Os seguintes parâmetros moleculares (tabela 3) têm sido estudados na mais recente literatura veterinária com o objetivo de perceber qual o seu papel como fatores de prognóstico (Smedley, Spangler, et al., 2011).

**Tabela 3** – Marcadores de imunohistoquímica utilizados em medicina veterinária e respetiva função no ciclo celular.

<b>Função no organismo</b>	<b>Marcador</b>
Fração de crescimento	Ki67
Índice da fase do ciclo celular	Bromodeoxyuridine (BrdU) ou Antígeno nuclear de células em proliferação (PCNA)
Proteína responsável pela apresentação do melanoma ao sistema imunitário (células T)	Melan A/MART-1
Anticorpo anti-melanoma (PNL2); Enzima catalisadora da oxidação de fenóis, controladora da produção de melanina	PNL2 e tirosinase
Proteína de baixo peso molecular, que entre outras funções está presente no crescimento e diferenciação celular	S-100
Filamento proteico do tipo III expressado em células mesenquimatosas, responsável pelo suporte e ancoragem dos organelos no citosol	Vimentina
Elevada nos neurónios e em inúmeras células do sistema APUD (Amine Precursor Uptake Descarboxilase) ao qual se julga que os melanócitos pertencam	Enolase neuro-específica (ENE)
Gene supressor tumoral (p53); Proteína codificada pelo gene PTEN (homólogo da fosfatase e tensina) cuja mutação está associada ao desenvolvimento de vários tumores; Proteína supressora tumoral (Rb); Proteína reguladora da transição da fase G1 para S no ciclo celular (p21); Proteína supressora tumoral importante na regulação do ciclo celular (p16)	Expressão de p53, PTEN, Rb, p21 (waf-1) e p16 (ink-4a)

Número de segmentos de cromossoma numa célula	Sets de ADN
Angiogénese	Contagem de mastócitos e densidade microvascular (DM)
Vascularização tumoral	Fator de crescimento do endotélio vascular (FCEV)
Fatores de crescimento, reações inflamatórias, promotores tumorais, protooncogenes	COX-2

(Smedley, Spangler, et al., 2011)

O objetivo das últimas investigações é poder aumentar a precisão de identificação de melanomas, predominantemente através da imunohistoquímica. Esta identificação pode ser obtida através da análise de tecidos em casos suspeitos de melanoma ou através da utilização de um conjunto de anticorpos, sempre com recurso à imunohistoquímica. A utilização da PNL2 e tirosinase, em vez das tipicamente utilizadas Melan A e S100 têm apresentado resultados promissores (Bergman et al., 2012).

A fração de crescimento tumoral, avaliada pela marcação do índice de Ki67 através de imunohistoquímica, tem sido avaliada como fator de prognóstico em diversos estudos recentes. O índice de Ki67 revelou ser um parâmetro com bastante significância, em termos de prognóstico, para as neoplasias melanocíticas caninas, mesmo que nos diversos estudos retrospectivos tenham sido utilizadas diferentes técnicas imunohistoquímica para obtenção do índice (Smedley et al., 2011; Millanta et al., 2002; Roels, Tilmant, & Ducatelle, 1999; Sánchez et al., 2007; Bergin, Smedley, Esplin, Spangler, & Kiupel, 2011).

Diversos estudos sugerem que o índice de Ki67 é, estatisticamente, um marcador de prognóstico válido para as neoplasias melanocíticas caninas (Smedley, Spangler, et al., 2011), sendo que o índice para os melanomas cutâneos deve ser calculado segundo o método de Laprie et al., que se baseia na contagem de 500 células e registo da percentagem de células positivas (Laprie et al., 2001). Já para as neoplasias melanocíticas orais ou do lábio o método mais consensual é o de Bergin et al. (2011), em que é considerada a média de células neoplásicas positivas por milímetro quadrado, numa ampliação de 400x ao microscópio ótico.

Este índice é bastante útil, tanto em neoplasias melanocíticas que exibem indicadores de prognóstico favoráveis, como nas que exibem indicadores menos favoráveis, acrescendo a importância da sua utilização em melanomas com parâmetros histológicos difíceis de definir (Smedley, Spangler, et al., 2011). Posto isto, neoplasias que exibem critérios histológicos de malignidade com baixa fração de crescimento tumoral apresentam tempos de sobrevivência

mais longos do que o esperado, do que se apenas fosse tido em conta a avaliação histopatológica (Laprie et al., 2001; Bergin et al., 2011).

O índice de Ki67 é bastante mais objetivo e menos sujeito a variação entre observadores do que as atipias histológicas ou do que o índice mitótico, apesar de que todos estes parâmetros devam ser tidos em consideração e comparação para que se possa obter um prognóstico mais fidedigno (Smedley, Spangler, et al., 2011).

Apenas dois estudos foram realizados para avaliar a significância do índice da fase do ciclo celular (PI), em que nenhum dos dois métodos utilizados foram fáceis de aplicar como ferramenta de diagnóstico (Roels et al., 1999; Yoshida et al., 1999). O PI parece apresentar alguma significância como fator de prognóstico nestas neoplasias, embora a falta de estudos não permitam obter uma conclusão quanto à sua relevância em relação a outros fatores (Smedley, Spangler, et al., 2011).

Koenig, Wojcieszyn, Weeks, & Modiano (2001), realizaram um estudo para avaliar o valor prognóstico da expressão de Melan A/MART-I, S-100, da vimetina e da ENE. Tanto a vimetina como a ENE e a S-100 não parecem ter qualquer tipo de correlação entre a sua expressão e o comportamento das neoplasias melanocíticas. Já a expressão de Melan A/MART-1 foi correlacionada com um prognóstico favorável (Koenig et al., 2001), embora noutro estudo não tenha sido obtida essa relação entre a expressão da Melan A e o comportamento benigno do tumor (Ramos-Vara et al., 2000).

O PNL2 é um anticorpo monoclonal direcionado contra um antígeno melanocitário fixo. A análise imunohistoquímica deste anticorpo num variado conjunto de tecidos saudáveis e lesões melanocíticas humanas revelou a sua especificidade (Rochaix et al., 2003).

Noutro estudo, que pretende comparar a reatividade da PNL2 comparando-a à Melan A, em neoplasias melanocíticas com recurso a diferentes técnicas, foi possível verificar que a PNL2 deteta uma grande percentagem de células neoplásicas, em que 75% das células foram marcadas. Infelizmente, tanto uma como a outra marcaram mais frequentemente células epitelioides do melanoma, do que células fusiformes (Giudice, Ceciliani, Rondena, Stefanello, & Grieco, 2010). Concluíram então que a alta especificidade e sensibilidade da PNL2 enriquece um estudo como fator de prognóstico, devendo então ser incluída no painel de anticorpos anti-melanoma para as neoplasias melanocíticas caninas (Giudice et al., 2010).

Quanto à expressão de p53, PTEN, Rb, p21 (waf-1) e p16 (ink-4a), apenas dois estudos foram realizados em cães, com neoplasias melanocíticas em diferentes locais anatómicos. Os dois examinaram a expressão de p53, em que ambos concluíram que não

existe uma diferença significativa entre neoplasias benignas e malignas (Koenig et al., 2001; Roels, Tilmant, & Ducatelle, 2001). Quanto às restantes proteínas, Koenig et al. (2001), retirou exatamente a mesma conclusão, não existem diferenças significativas entre neoplasias benignas e malignas, para além de que não existe correlação entre as neoplasias malignas e o tempo de sobrevivência.

Nos estudos realizados por Bolon, Mays, & Hall (1990) e Roels, Van Daele, Van Marck, & Ducatelle (2000), avaliaram-se os segmentos de ADN e outros parâmetros morfométricos que se pensava influenciarem a diferenciação entre neoplasias melanocíticas benignas e malignas. Concluíram que existe uma variação entre neoplasia benigna e maligna, mas que não existia correlação com o tempo de sobrevivência. Para além disso, a técnica de realização e interpretação destes histogramas são bastante difíceis e complexas, o que em termos de diagnóstico e prognóstico na prática clínica se torna incomportável, devido ao tempo e custos associados (Bolon et al., 1990; Roels et al., 2000).

Existe apenas um estudo que avaliou a densidade microvascular e o número de mastócitos no melanoma como fator de prognóstico. Este estudo conclui que ambos estão significativamente correlacionados, e ambos afetam negativamente o prognóstico dos animais em que a sua contagem seja alta (Mukaratirwa et al., 2006).

Os níveis de FCEV, em medicina humana, estão correlacionados com agravamento de prognóstico (Hyodo et al., 1998; Jin-no et al., 1998). Apenas um estudo foi efetuado em medicina veterinária, com diversos tipos de neoplasias benignas e malignas, mas no qual foi possível concluir que os níveis mais baixos estavam presentes em epúlides e os níveis mais altos em neoplasias melanocíticas (Wergin & Kaser-Hotz, 2004) Apesar disso, não foi efetuada nenhuma correlação destes níveis com o tempo de sobrevivência, não sendo por isso possível de concluir à cerca da significância deste indicador como fator de prognóstico (Smedley, Spangler, et al., 2011).

Num estudo realizado por (Martínez et al., 2011), um ‘score’ COX-2 alto correlacionou-se com uma MST inferior, concluindo também que a COX-2 é um indicador de prognóstico independente.

Com base na revisão da literatura, Smedley et al. (2011) criaram uma tabela (figura 18), na qual reúnem os parâmetros de prognóstico estatisticamente mais relevantes, relacionados com os tempos de sobrevivência para os melanomas do dígito, oral e do lábio em cães.

**Figura 18** – Recomendação de parâmetros prognóstico mais relevantes (Smedley, Spangler, et al., 2011)

Location	Oral/Lip Melanocytic Neoplasms		Cutaneous/Digit Melanocytic Neoplasms	
Distant metastasis	Poor prognosis		Poor prognosis	
Lymphatic invasion	Poor prognosis		Poor prognosis <sup>a</sup>	
Mitotic index	10 consecutive fields starting in area w/highest mitotic activity		10 random fields	
	Avoid areas of ulceration for both methods			
	< 4/10 hpf	Favorable prognosis	< 3/10 hpf	
	≥ 4/10 hpf	Poor prognosis	≥ 3/10 hpf	
Nuclear atypia <sup>b</sup>	% atypical nuclei in 200 cells counted		Subjective assessment	
	< 30%	Favorable prognosis	< 20%	
	≥ 30%	Poor prognosis	≥ 20%	
Degree of pigmentation	Subjective assessment			
	% Pigmented cells		Scale 0 (no pigment) to 2 (high pigment)	
	≥ 50%	Favorable prognosis	2	
	< 50%	Uncertain prognosis	0 to 1	
Presence of ulceration	No prognostic significance		Poor prognosis	
Level of infiltration/invasion	Shallow w/no bone lysis	Favorable prognosis	Limited to dermis	
	Deep w/possible bone lysis	Poor prognosis	Extends beyond dermis	
Ki67 index	Average number of positive nuclei per grid (5 hpf grid areas counted)		% of positive nuclei in 500 cells counted	
	Avoid areas of ulceration and inflammation and assess highest staining areas for both methods			
	< 19.5	Favorable prognosis	< 15%	
	≥ 19.5	Poor prognosis	≥ 15%	

<sup>a</sup> Parameter was not specifically examined for neoplasms of the digit.

<sup>b</sup> Parameter should be assessed in epithelioid predominant neoplasms and in spindle neoplasms with sufficiently observable nuclear detail.

O ‘cut-off’ para a distinção entre prognóstico favorável e prognóstico desfavorável assenta num tempo de sobrevivência de um ano, ou seja, cães com prognóstico favorável sobreviveram um ano ou mais tempo, enquanto que os cães com prognóstico desfavorável sobreviveram menos de um ano após o diagnóstico de melanoma (C. Smedley, Spangler, et al., 2011).

## 8.4. Tratamento

As diferentes modalidades de tratamento para os vários tipos de melanoma tornam bastante difícil retirar conclusões quanto à sua influência no prognóstico das neoplasias melanocíticas caninas, tanto por existirem poucos estudos que padeçam de uma adequada avaliação histopatológica dos melanomas como malignos, não se podendo assim interpretar os tempos de sobrevivência, como pelo facto de que muitos caracterizam os melanomas em benignos e malignos apenas pela sua localização e tamanho, de acordo com o estadiamento da

OMS, que, como já referido anteriormente, não exhibe diferenças estatisticamente significativas como prognóstico (Smedley, Spangler, et al., 2011).

Por estas razões, ainda não existem estudos prospectivos bem delineados que incluam um estadiamento clínico, diagnóstico histopatológico, protocolos de tratamento, seguimento e avaliação estatística padrão, para que seja possível avaliar cuidadosamente a significância prognóstica das diferentes modalidades terapêuticas (Todoroff & Brodey, 1979).

## **8.5.Rácio N/L**

A inflamação desempenha um papel muito importante no desenvolvimento de uma neoplasia, sendo que é aceite que as células inflamatórias e citoquinas associadas estimuladas ou libertadas pelas células neoplásicas contribuem para o crescimento tumoral e imunossupressão (Balkwill & Mantovani, 2001).

O RNL é um parâmetro bastante simples e fácil de obter, de forma a avaliar a presença de um processo inflamatório num paciente (Forget et al., 2017). Está provada a sua utilidade na estratificação da mortalidade em eventos cardíacos (Gibson et al., 2007; Azab, Chainani, Shah, & McGinn, 2013), como um forte fator prognóstico em diversos tipos de cancro (Forget et al., 2017), como marcador de diversas patologias inflamatórias ou infecciosas, ou até mesmo como deteção de complicações pós-cirúrgicas (Kahramanca et al., 2014; Ishizuka, Shimizu, & Kubota, 2012).

Existe, cada vez mais, a necessidade de identificar parâmetros de prognóstico que sejam rápidos, baratos, pouco invasivos e seguros (Macfarlane, Macfarlane, Scase, Parkin, & Morris, 2016). O RNL é bastante útil como parâmetro diagnóstico e prognóstico em diversos tipos de sistemas de classificação e tumores em medicina humana (Kim et al., 2010; Guthrie et al., 2013).

Poucos estudos foram realizados no sentido de apurar a sua utilidade em medicina veterinária. No caso do linfoma canino, não foi possível correlacionar o RNL com a MST, embora o estudo tenha sido realizado com uma pequena amostra (Mutz et al., 2015).

Já num estudo realizado por Macfarlane et al. (2016), o RNL apresentou capacidade discriminatória para a distinção entre mastocitomas de baixo e alto grau, embora seja duvidosa a sua conclusão visto que os mastócitos pertencem aos leucócitos, podendo criar uma resposta inflamatória marcada, por sua vez, influenciando o valor do RNL.

A relação entre o RNL e o melanoma ainda não foi estudada em humanos para o estadios I, II e III do melanoma, apenas para o melanoma metastático tratado com

ipilimumab, em que não foi possível associar uma elevação do RNL a um pior prognóstico. Ainda assim, nestes estudos obtiveram um ‘cut-off’ de RNL >3 e RNL>4, que relacionaram com uma diminuição da MST antes do início do tratamento (Ferrucci et al., 2016; Zaragoza et al., 2016).

O ‘cut-off’ apropriado para o RNL no melanoma é controverso, variando na literatura entre 2 a 5, com uma mediana de 4, em humanos (Templeton et al., 2014).

## 9. Revisão Sistemática

O melanoma em cães é, cada vez mais, uma doença oncológica frequentemente diagnosticada na prática clínica. Para o médico veterinário é bastante importante saber mais sobre esta doença, como diagnosticá-la e tratá-la, mas para o proprietário a resposta mais urgente é, na maioria das vezes, saber quanto tempo de vida resta ao seu animal. Existe então a necessidade do cruzamento de várias informações, os fatores de prognóstico, que darão uma melhor perspectiva de como a doença irá progredir, e em quanto tempo.

A necessidade de recorrer aos fatores de prognóstico para dar esta resposta implica a existência de estudos que comprovem o seu papel teórico na prática clínica. Posto isto, a presente revisão sistemática tem como objetivo fazer o ponto da situação quanto aos fatores de prognóstico para o melanoma em cães.

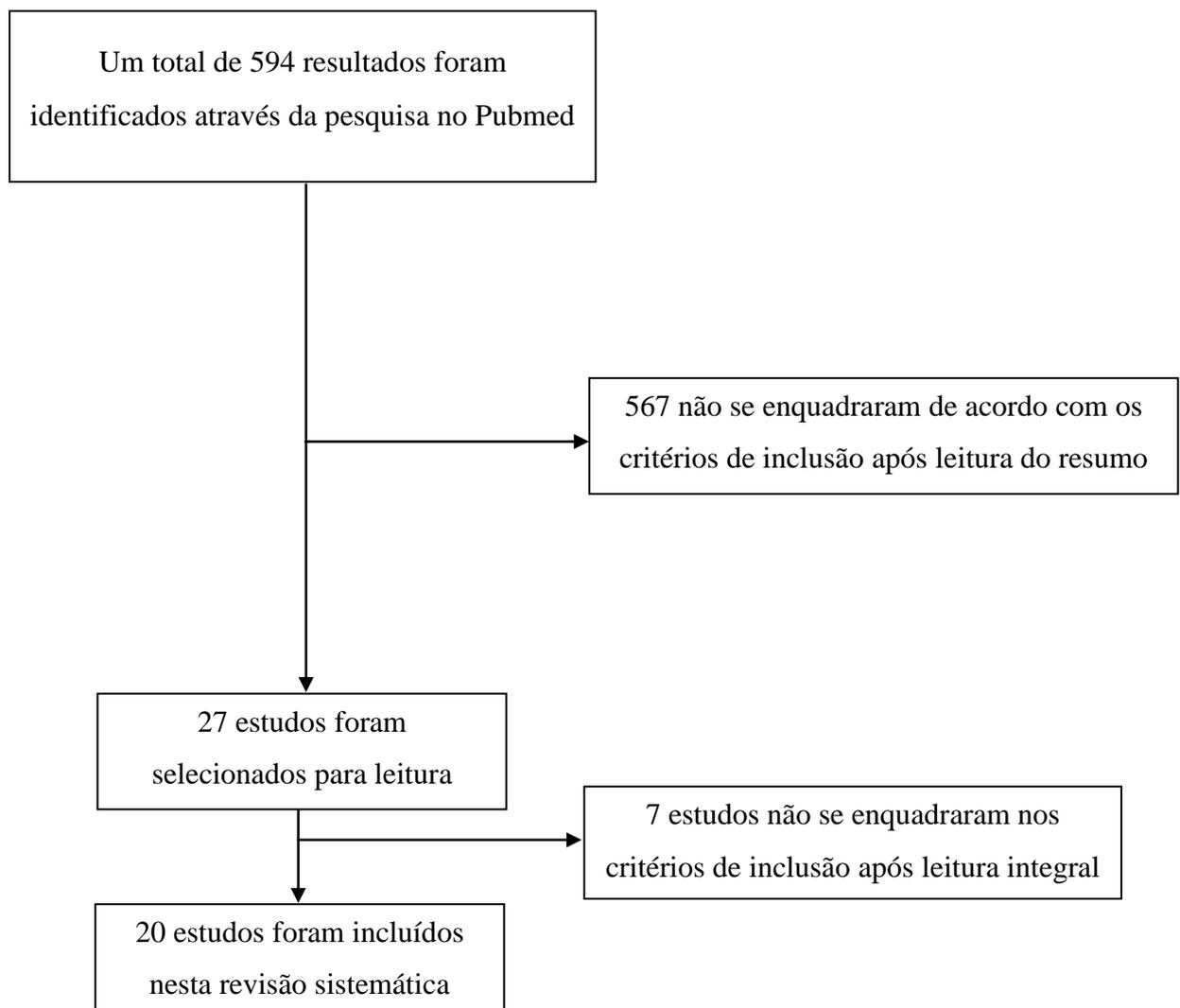
A última pesquisa foi efetuada no dia 15 de Maio de 2018, na plataforma online PubMed. Os termos “melanoma”, “melano”, “dog” e “cani”, foram incluídos nesta pesquisa como termos livres ou termos MeSH.

Os critérios de inclusão para os estudos apresentados na pesquisa foram: 1) Estudos em Inglês, Português, Francês ou Espanhol; 2) Estudos em cães; 3) Estudos prognósticos; 4) Estudos observacionais; 5) Estudos que avaliem a sobrevida.

Numa primeira fase, o título e ‘abstract’ de todos os estudos foi lido e, posteriormente, selecionados os estudos que coincidiam com os critérios de inclusão. Numa segunda fase, os estudos selecionados foram lidos na íntegra e selecionados, novamente, de acordo com os critérios de inclusão. Ambas as fases foram realizadas por dois autores de forma independente, o autor da presente dissertação e pela Dr.<sup>a</sup> Luísa Oliveira, do Centro Hospitalar Veterinário do Porto. Em caso de desacordo, e na ausência de um consenso entre os dois autores iniciais, um terceiro autor, Dr. Hugo Gregório, tomou a decisão final.

Dos estudos foram recolhidos dados como o tipo de estudo, a população, mais concretamente a espécie estudada, o tipo de neoplasia, os fatores de prognóstico apresentados e os tempos de sobrevida apresentados para os fatores de prognóstico.

A pesquisa efetuada na base de dados do PubMed apresentou 594 resultados. Após a leitura do título e respetivo resumo, foram considerados 27 estudos como relevantes, sendo que, após leitura completa dos artigos, foram excluídos 7 estudos, de acordo com os critérios de inclusão, restando assim 20 artigos para a revisão final (Figura 19). Na tabela 6 apresentamos um resumo dos estudos selecionados.



**Figura 19** – Fluxograma PRISMA dos estudos selecionados.

Ano / Autor	Estudo	Tumor (localização)	Fatores de prognóstico	Relevância
1979 Bostock	Prospetivo 134 amostras Avaliação do prognóstico após excisão cirúrgica do tumor	59 melanocitomas 33 cutâneos 29 orais 13 labiais	Localização Classificação histológica Comportamento biológico Dimensão do tumor Índice mitótico	Taxa de sobrevida aos 2 anos superior nos melanocitomas vs melanomas ( $p < 0,01$ ); Menor tempo de sobrevida ( $p < 0,01$ ) para melanomas orais do que para os melanomas cutâneos; Melanocitomas orais têm uma taxa de morte aos 2 anos mais elevada do que nas restantes localizações ( $p = 0,05$ ), mas sem diferença na mediana de sobrevida; Associação entre Índice Mitótico superior a 2 e menor tempo de sobrevida em melanomas cutâneos ( $p < 0,01$ ), mas sem associação em melanomas orais; Ausência de diferença na sobrevida entre melanomas do dígito e outros melanomas cutâneos; Ausência de diferença na sobrevida entre melanomas labiais e orais; Volume da lesão sem relação com a sobrevida tanto em melanomas orais como cutâneos
1999 Roels, Tilmant, & Ducatelle	Retrospectivo 20 cães Índice proliferativo do PCNA e Ki67 como fatores de prognóstico, associando ao comportamento clínico da neoplasia em cães que realizaram cirurgia	8 melanomas do dígito 4 melanomas orais 4 melanomas labiais 4 melanomas oculares 2 melanomas cutâneos	Ki67 PCNA Grau de Invasão	A fração de crescimento (Ki67) foi significativamente associada com a sobrevida ( $p = 0,027$ ), assim como o grau de invasão ( $p = 0,024$ ) e a classificação citológica ( $p < 0,001$ ); Já na PCNA ( $p = 0,445$ ), no tamanho do tumor ( $p = 0,178$ ) e no tipo de célula predominante ( $p = 0,160$ ) não foi possível obter associação com a sobrevida
2001 Laprie et al,	Retrospectivo 68 amostras histopatológicas Avaliação da fração de crescimento através da marcação imunohistoquímica com recurso ao MIB-1 e sua relevância como fator prognóstico	Cutâneo	Género Atividade juncional Índice mitótico Pigmentação Grau de invasão Ulceração MIB-1	Menor sobrevida nos melanomas histologicamente malignos ( $p < 0,0001$ ); Índice mitótico igual ou superior a 3 foi associado com menor sobrevida ( $p < 0,0001$ ); Menor sobrevida nos casos com índice proliferativo de Ki67 superior ou igual a 15% ( $p < 0,0001$ ); Maior pigmentação ( $p < 0,0001$ ), atividade juncional ( $p = 0,0046$ ) e posição estritamente dérmica ( $p < 0,0001$ ) foram associadas a maior tempo de sobrevida; Lesões ulceradas ( $p = 0,0023$ ) ou células neoplásicas com anisocariose demarcada ( $p < 0,0001$ ) foram associadas a menor tempo de sobrevida; A análise multivariada concluiu que os índice mitótico e índice proliferativo de MIB-1 são fatores de prognóstico estatisticamente significativos ( $p < 0,0001$ ), no que toca à sua relação com a sobrevida, assim como, o grau de invasão ( $p < 0,0012$ ), ulceração ( $p < 0,0065$ ), pigmentação ( $p < 0,0007$ ) e atividade juncional ( $p < 0,0239$ )

Ano / Autor	Estudo	Tumor (localização)	Fatores de prognóstico	Relevância
2002 Millanta et al.	Retrospectivo  62 cães  Avaliação da precisão prognóstica fornecida pelo índice MIB-1, quando comparado com a classificação histológica e localização	10 melanocitomas (cutâneos)  52 melanomas malignos (29 cutâneos, 20 na cavidade oral, 2 na pálpebra e 1 no dígito)	Índice MIB-1  Localização  Classificação histológica  Grau de invasão	Cães com um índice proliferativo ( $p < 0,0489$ ) inferior a 0,45 tiveram um prognóstico mais favorável; índice de MIB-1 menor que 0,45 foi associado a maior sobrevida, ao contrário de índices superiores a 12,35 ( $p = 0,0489$ ) comparando com os que se inseriram no intervalo entre ambos; Melanomas orais com menor tempo de sobrevida do que os melanomas cutâneos ( $p = 0,001$ ); Menor tempo de sobrevida para os tumores com invasão de vasos linfáticos ( $p = 0,0144$ ); Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas quanto à classificação histológica dos tumores
2003 Proulx et al.	Retrospectivo  140 cães  Comparação da eficácia da radioterapia com 3 protocolos diferentes, avaliação de fatores prognóstico e avaliação da eficácia da quimioterapia sistêmica no tratamento	Oral	Lise Óssea  Dimensão do tumor  Sublocalização na cavidade oral	Análise univariada: a sublocalização do tumor ( $p < 0,001$ ), lise óssea ( $p < 0,001$ ) e volume do tumor ( $p = 0,002$ ) foram todos correlacionados com a sobrevivência; Esses mesmos fatores, sublocalização do tumor ( $p < 0,001$ ), lise óssea ( $p < 0,001$ ) e volume do tumor ( $p = 0,05$ ), foram também fatores preditivos quanto à sobrevivência, na análise multivariada
2006 Mukaratirwa, Chikafa, Dliwayo, & Moyo	Retrospectivo  80 cães  Investigação da correlação entre a contagem de mastócitos, densidade microvascular e as características clínicas	56 malignos  43 melanomas cutâneos 19 melanomas orais 18 melanomas oculares	Pigmentação  Grau de invasão  Contagem de Mastócitos  Densidade Microvascular	Tanto a contagem de mastócitos como a densidade microvascular ( $p < 0,01$ ) revelaram-se como fatores de prognóstico independentes, sendo o seu aumento relacionado com um prognóstico menos favorável, ao contrário dos resultados para o grau de pigmentação e invasão do tumor; Estes fatores não foram associados com a sobrevida dos pacientes
2006 Spangler & Kass	Retrospectivo  384 cães  Características Epidemiológicas e Histológicas como fatores de prognóstico em melanomas removidos cirurgicamente, em que um pequeno número de casos recebeu terapia adjuvante (<10)	73 melanomas orais  32 melanomas do dígito 41 melanomas do lábio 227 melanomas cutâneos 11 melanomas oculares	Idade  Gênero  Metastização  Índice Mitótico  Atipia nuclear  Dimensão do tumor  Inflamação  Necrose	Melanomas orais com taxa de mortalidade mais elevada e, conseqüentemente, uma mediana de sobrevida inferior (não está mencionada a significância estatística); Para os melanomas orais os fatores prognóstico estudados que apresentaram significado estatístico quanto à sobrevida foram: índice mitótico, atipia nuclear, 'score' tumoral, metastização ( $p < 0,001$ ), dimensão do tumor ( $p = 0,008$ ) e necrose ( $p = 0,05$ ); Para os melanomas labiais e do dígito foram: índice mitótico, atipia nuclear, 'score' tumoral, metastização, ( $p < 0,001$ ), dimensão do tumor ( $p = 0,005$ ), inflamação ( $p = 0,033$ ) e necrose ( $p = 0,001$ ); Para os melanomas cutâneos foram: índice mitótico, atipia nuclear, 'score' tumoral, dimensão do tumor, metastização, inflamação, necrose ( $p < 0,001$ ) e idade ( $p = 0,002$ )

Ano / Autor	Estudo	Tumor (localização)	Fatores de prognóstico	Relevância
2011 Bergin, Smedley, Esplin, Spangler, & Kiupel	Retrospectivo 79 cães Avaliação da utilidade da marcação imunohistoquímica recorrendo ao Ki67 como fator prognóstico	Oral	Índice de Ki67 Classificação histológica (Atipia nuclear) Índice Mitótico Pigmentação Idade Género Sublocalização	Na comparação entre o grupo de cães que sobreviveu 1 ano após diagnóstico e o grupo em que morreram ou foram eutanasiados menos de 1 ano após diagnóstico, apenas a idade não foi estatisticamente significativa; Quando avaliados individualmente como fatores de risco para uma sobrevida inferior a 1 ano, tanto o Ki67, como a atipia nuclear, índice mitótico e pigmentação foram relevantes estaticamente, mas na análise multivariada em grupo destes fatores, apenas a atipia nuclear foi estatisticamente relevante (p<0,0001)
2011 Martínez et al.	Retrospectivo 57 cães Relação entre a expressão da COX-2 e a localização do tumor, índice mitótico e proliferativo, grau de infiltração linfocitária de T CD3+ e a sobrevida em geral	25 melanomas orais 32 melanomas cutâneos	COX-2 Ki67 Índice mitótico Localização	A análise estatística dos parâmetros: índice mitótico (p=0,004), localização do tumor (p=0,001), índice Ki67 (p<0,0001), expressão da COX-2 (p=0,001) mostrou que todos estão relacionados com a sobrevida, de forma individual, embora a expressão da COX-2 estivesse mais fortemente correlacionada com o desfecho clínico do que os restantes parâmetros (Odds ratio = 5,362); Já a análise multivariada permitiu perceber que apenas o índice Ki67 (p=0,001) e a expressão da COX-2 (p=0,004) apresentavam um valor preditivo independente estatisticamente significativo quando associados com a sobrevida
2011 Murakami et al.	Retrospectivo 39 cães Análise da mutação do exão 11 KIT e expressão KIT em melanomas malignos orais	Oral	KIT (Recetor transmembranar de tirosina-kinase)	Não foi encontrada associação entre a expressão do KIT e o teor em melanina do tumor, o estadiamento (OMS) do tumor (p=0,375e a sobrevida (p=0,948) em melanomas orais malignos
2012 Cuitiño, Massone, & Idiart	Retrospectivo Avaliação de 119 amostras histológicas Significado prognóstico da angiogénese no desenvolvimento tumoral	36 melanocitomas da pele 40 melanomas da pele 43 melanomas orais	Densidade microvascular Área endotelial	Não foi possível associar um aumento ou decréscimo da densidade microvascular e da área endotelial com os tempos de sobrevida
2012 Newman, Jankovsky, Rohrbach, & LeBlanc	Retrospectivo 60 cães Avaliação da expressão C-kit em melanomas da mucosa	58 melanomas orais 3 melanomas conjuntivais	C-kit	Cães com expressão KIT em qualquer das secções representativas do seu melanoma obtiveram tempos de sobrevida significativamente mais longos (p=0,01)

Ano / Autor	Estudo	Tumor (localização)	Fatores de prognóstico	Relevância
2012 Yamada et al.	Retrospectivo 56 cães Avaliação da expressão da Fascina-1 como fator de prognóstico em melanomas orais e cutâneos	47 melanomas orais 9 melanomas cutâneos	Fascina-1	Foi possível a associação negativa entre a expressão da Fascina 1 e a sobrevida (p=0,0136), que quanto mais forte é a sua marcação imunohistoquímica menor é a sobrevida;
2013 Brockley, Cooper, & Bennett	Retrospectivo 63 cães Comparação do efeito da quimioterapia (carboplatina) em cães que realizaram controlo loco-regional ou apenas tratamento quimioterápico	30 melanomas orais 24 melanomas cutâneos 9 melanomas do dígito	Localização Índice Mitótico Estadiamento Carboplatina Cirurgia + Carboplatina	Localização oral apresentou menor sobrevida, seguida dos melanomas do dígito e, com a maior mediana de sobrevida, os melanomas cutâneos (p=0,02). Obtiveram-se os mesmo resultado na análise multivariada, evidenciando ainda mais as diferenças de sobrevida entre as diferentes localizações; Não existiram diferenças estatisticamente significativas, entre as diferentes as localizações, com ou sem recurso ao tratamento com a carboplatina; Não se verificou associação entre o índice mitótico e o estadiamento com a sobrevida; Apenas 2 casos responderam positivamente à carboplatina, aumentando significativamente o seu tempo de sobrevida (p=0,039), mas, dado o seu baixo número, tornou-se irrelevante para a análise multivariada
2013 Noguchi et al.	Retrospectivo 26 cães MicroRNAs como supressor tumoral e fator prognóstico	Oral	Estadiamento MicroRNAs	A mediana de sobrevida para o grupo em estado inicial foi significativamente menor do que para o grupo em estadio avançado (p=0,0009); Foi possível associar a expressão do miR-23 com a sobrevida, sendo que, quanto menor a sua expressão menor é a sobrevida (p=0,042), não se verificando os mesmos resultados para os outros microRNAs estudados; Não foi encontrada associação entre os níveis de expressão dos miRNAs testados e o estadiamento clínico
2014 Boston et al.	Retrospectivo 151 cães Avaliação da eficácia das terapias sistêmicas adjuvantes após excisão cirúrgica de melanomas orais	Oral	Idade Dimensão do tumor Peso Sublocalização Terapia adjuvante Vacinação Metastização	Análise univariada: idade superior a 12 anos (p=0,002), dimensão tumoral superior a 4 cm (p<0,001), cirurgia intralesional foram associadas a menor sobrevida (p=0,011); A quimioterapia metronómica (p=0,001) e a radioterapia (p=0,013) foram, isoladamente, associadas a maior sobrevida; Análise multivariada: apenas a idade (p=0,005), a dimensão tumoral (p=0,007) e a excisão incompleta do tumor (p=0,015) produziram, novamente, resultados estatisticamente significativos na associação com a sobrevida;

Ano / Autor	Estudo	Tumor (localização)	Fatores de prognóstico	Relevância
2014 Tuohy, Selmic, Worley, Ehrhart, & Withrow	Retrospectivo 70 cães Avaliação da progressão clínica em termos de intervalo livre de doença (ILD) e tempo de sobrevida (TS), após cirurgia curativa de melanomas orais	Oral	Tratamento Metastização Estadiamento Dimensão do tumor Gênero Tipo de resseção (envolvendo osso ou apenas tecidos moles) Sublocalização Margens completas Terapia adjuvante	A administração de terapia adjuvante (ILD: p=0,005; TS: p=0,03), metastização (ILD: p=0,002; TS: p<0,001), estadiamento III (ILD: p=0,017; TS: p=0,001) ou IV (ILD: p=0,002); TS: p=0,0009), tamanho do tumor superior a 3 cm (ILD: p=0,046); TS: não foi significativo), fêmeas inteiras (ILD: p=0,007; TS: p=0,026), são os fatores associados a menores tempos de ILD e sobrevida; Não foi possível associar o tipo de lesão, a sublocalização na cavidade oral e a resseção com margens incompletas com o ILD e o TS
2015 Bongiovanni et al.	Retrospectivo 21 amostras Significado prognóstico da expressão imunohistoquímica da survinina e $\beta$ -catenina	Cutâneos 10 melanocitomas 11 melanomas	Survivina $\beta$ -catenina	A expressão elevada de $\beta$ -catenina nuclear foi associada com a presença de metastização e morte se considerarmos os melanocitomas e melanomas em conjunto (p<0,01), havendo uma tendência estatística mas sem significância quando se considerou apenas os melanomas (p=0,063) A expressão da survivina nuclear foi significativamente mais elevada nos melanomas do que nos melanocitomas (p<0,01), sendo o aumento da sua expressão associado à presença de metastização e morte do animal, tanto nos casos em geral (p<0,01), como nos casos de melanoma (p<0,05); Não existiu evidência estatística significativa na associação entre a expressão da survivina e da $\beta$ -catenina nuclear, não tendo sido feita uma associação destes dois fatores com o tempo de sobrevida
2017 Iussich et al.	Retrospectivo 48 cães Expressão dos PDGRs (receptores dos fatores de crescimento derivados das plaquetas) e correlação com prognóstico em cães com melanoma oral	Oral	PDGRs $\alpha$ e $\beta$ Índice Ki67 Estadiamento Margens completas	Os cães com ambas as categorias de PDGRs apresentaram um intervalo livre de doença e sobrevida menor, do que os restantes que apresentavam apenas uma das categorias ou nenhuma; Um índice de Ki67 elevado foi também associado a um menor intervalo livre de doença e sobrevida (p<0,05); Quanto aos restantes parâmetros, nenhum dos resultados foi estatisticamente significativo
2017 Piras et al.	Prospetivo 42 cães Resseção cirúrgica e Eletrovacinação neoadjuvante (antigénio CSPG4)	Oral	Excisão com margens completas Índice de Ki67 Índice mitótico Atipia nuclear Peso	Nos diferentes grupos o Peso corporal foi estatisticamente significativo na análise univariada (p= 0,01), sendo que utilizando um 'cut-off' de 20 kg, os cães, independentemente do tratamento, com peso inferior a este 'cut-off' sobreviveram mais tempo (<20 kg - 300 dias; >20kg - 100 dias).

Ano / Autor	Estudo	Tumor (localização)	Fatores de prognóstico	Relevância
2017 Verganti et al.	Retrospectivo 69 cães Administração da vacina Oncept (sem grupo de controlo)	Oral	Dimensão do tumor Metastização Tempo de administração da vacina após diagnóstico Pigmentação Índice mitótico Excisão com margens completas	Não foi possível obter significância estatística quanto aos fatores de prognóstico avaliados;

**Tabela 4** – Resumo das características dos estudos selecionados.

Dos 20 estudos selecionados, 19 eram retrospectivos (Bostock, 1979; S. Roels et al., 1999; Laprie et al., 2001; Millanta et al., 2002; Proulx et al., 2003; Mukaratirwa et al., 2006; Spangler & Kass, 2006; Bergin et al., 2011; Martínez et al., 2011; Murakami et al., 2011; Cuitiño, Massone, & Idiart, 2012; Newman, Jankovsky, Rohrbach, & LeBlanc, 2012; Yamada et al., 2012; Brockley, Cooper, & Bennett, 2013; Noguchi et al., 2013; Boston et al., 2014; Tuohy, Selmic, Worley, Ehrhart, & Withrow, 2014; Bongiovanni et al., 2015; Iussich et al., 2017; Verganti et al., 2017), e apenas 1 estudo era prospetivo (Piras et al., 2017). Todos os estudos foram realizados em cães, de acordo com os critérios de inclusão, num total de 1828 cães. Neste total reúnem-se também os números de estudos em que apenas se avaliariam as amostras histológicas, perfazendo um total de 382 amostras em 4 estudos diferentes. De acordo com os critérios, todos os estudos incluem apenas melanomas, sendo que em 9 estudos, apenas são estudados os melanomas orais, 1 estudo que avalia apenas os melanomas cutâneos, e os restantes avaliam melanomas de várias localizações: orais, cutâneos, do dígito, conjuntivais, oculares e labiais.

Quantos à frequência dos fatores de prognóstico nos 20 estudos, o índice de Ki67 e o índice mitótico foram os fatores de prognóstico avaliados com maior frequência, num total de 7 estudos, seguidos da dimensão do tumor avaliada em 6 estudos. A localização, metastização, estadiamento, pigmentação, género, sublocalização na cavidade oral e grau de invasão foram avaliados em 4 estudos, seguidos pela idade e a atipia nuclear avaliadas 3 estudos. Para além disso, a classificação histológica, o c-kit, o peso e a densidade microvascular foram considerados como fatores de prognóstico a avaliar em 2 estudos. Já o PCNA, a atividade juncional, a ulceração, a lise óssea, os mastócitos, o grau de inflamação, a

COX-2, a Fascina-1, a survivina, e a  $\beta$  – catenina, os PDGRs  $\alpha$  e  $\beta$ , os MicroRNA's, o comportamento biológico e área endotelial apenas foram avaliados num estudo.

Alguns estudos apresentaram alguns problemas, como o baixo número de casos estudados. A tabela 7 representa o risco de enviesamento para os diferentes estudos.

<b>Ano / Autor</b>	<b>A amostra foi representativa e bem definida?</b>	<b>O seguimento foi suficientemente longo e completo?</b>	<b>Os critérios foram utilizados de forma objetiva e imparcial?</b>	<b>Houve um ajuste para outros fatores de prognóstico mais importantes?</b>
1979 Bostock	(+)	(+)	(+)	(-)
1999 Roels, Tilmant, & Ducatelle	(-)	(-)	(-)	(+)
2001 Laprie et al,	(+)	(+)	(-)	(+)
2002 Millanta et al.	(-)	(-)	(+)	(-)
2003 Proulx et al.	(+)	(+)	(-)	(+)
2006 Mukaratirwa, Chikafa, Dliwayo, & Moyo	(-)	(-)	(-)	(+)
2006 Spangler & Kass	(+)	(+)	(+)	(+)
2011 Bergin, Smedley, Esplin, Spangler, & Kiupel	(+)	(+)	(-)	(+)
2011 Martínez et al.	(-)	(+)	(-)	(+)
2011 Murakami et al.	(-)	(+)	(-)	(-)
2012 Cuitiño, Massone, & Idiart	(+)	(-)	(-)	(-)

<b>Ano / Autor</b>	<b>A amostra foi representativa e bem definida?</b>	<b>O seguimento foi suficientemente longo e completo?</b>	<b>Os critérios foram utilizados de forma objetiva e imparcial?</b>	<b>Houve um ajuste para outros fatores de prognóstico mais importantes?</b>
2012 Newman, Jankovsky, Rohrbach, & LeBlanc	(+)	(-)	(-)	(-)
2012 Yamada et al.	(+)	(-)	(-)	(-)
2013 Brockley, Cooper, & Bennett	(-)	(+)	(-)	(+)
2013 Noguchi et al.	(-)	(-)	(-)	(-)
2014 Boston et al.	(-)	(+)	(-)	(+)
2014 Tuohy, Selmic, Worley, Ehrhart, & Withrow	(-)	(+)	(-)	(+)
2015 Bongiovanni et al.	(-)	(-)	(-)	(-)
2017 Lussich et al.	(-)	(-)	(+)	(+)
2017 Piras et al.	(-)	(-)	(+)	(-)
2017 Verganti et al.	(-)	(+)	(+)	(-)

**Tabela 5** – Risco de enviesamento.

## ***Discussão***

### *Índice Ki67*

O índice Ki67 é um marcador imunohistoquímico muitas vezes estudado como fator prognóstico em diversos tumores. Nos 7 estudos em que foi avaliado, o índice Ki67 foi estatisticamente significativo em 5 deles. Mais uma vez, os valores considerados para o índice variaram entre estudos, ainda assim, em todos os estudos foi consensual que quanto maior o índice, pior o prognóstico e menor a sobrevida (Roels et al., 1999; Laprie et al., 2001; Bergin et al., 2011; Martínez et al., 2011; Iussich et al., 2017). Apenas no estudo de Piras et al, (2017) não foi estatisticamente significativo como fator de prognóstico, mas curiosamente, é o estudo com menor número de casos e que apresenta o peso corporal do animal como o único fator prognóstico, dos 5 estudados, com significado estatístico.

O MIB-1 é um anticorpo monoclonal, usado como marcador imunohistoquímico que avalia a proliferação celular, reconhecendo um antígeno nuclear expressado em fases mitóticas tardias, sendo o seu índice proliferativo associado noutros estudos com a classificação histológica dos tumores e tempo de sobrevida dos pacientes (Millanta et al., 2002).

Em ambos os estudos, o índice proliferativo MIB-1 foi estatisticamente associado à sobrevida (Laprie et al., 2001; Millanta et al., 2002), para além de que no segundo estudo foi possível determinar um valor ‘cut-off’, em que um índice proliferativo inferior a 0,45 foi associado a um prognóstico mais favorável, ao contrário de cães com um índice proliferativo superior a 12,35.

### *Índice Mitótico*

A grande maioria dos estudos avalia o índice mitótico como fator de prognóstico. Não só em melanomas, como em muitas outras doenças oncológicas, o índice mitótico tem provado ser um bom indicador de prognóstico e comportamento biológico dos tumores. Nos 7 estudos é que é avaliado, o índice mitótico foi estatisticamente significativo em 4 deles (Bostock, 1979; Laprie et al., 2001; Spangler & Kass, 2006; Bergin et al., 2011). Nesses 4 estudos foi determinado um valor ‘cut-off’ que não foi consensual entre estudos, mas que produziu sempre o mesmo significado, ou seja, quanto maior o índice mitótico, pior o

prognóstico e menor o tempo de sobrevida. Nos 3 estudos em que o índice mitótico não apresentou relevância, o número de amostras era reduzido (Brockley, Cooper, & Bennett, 2013; Piras et al., 2017), havendo mesmo um desses estudos em que não foi possível obter qualquer resultado estatisticamente significativo quanto aos fatores estudados (Verganti et al., 2017).

#### *Dimensão do tumor*

A dimensão do tumor, é outro fator prognóstico que foi avaliado em 6 estudos diferentes. Como se sabe, a dimensão do tumor é uma das categorias do estadiamento do melanoma, mas que neste caso é avaliado como fator prognóstico isolado, e não como parte do estadiamento, sendo este um fator prognóstico avaliado noutros estudos.

Em 4 estudos, a dimensão do tumor foi estatisticamente significativa, sendo que em todos eles foi consensual que quanto maior a dimensão inicial do tumor, pior prognóstico e menor tempo de sobrevida apresentam os pacientes. Mais uma vez, a dimensão ‘cut-off’ variou entre os estudos, rondando os 3 e 4 cm, para além dos quais o prognóstico agrava drasticamente (Proulx et al., 2003; Spangler & Kass, 2006; Boston et al., 2014; Tuohy, Selmic, Worley, Ehrhart, & Withrow, 2014).

No estudo de Bostock (1979), a dimensão do tumor não foi correlacionada estatisticamente com a sobrevida, assinalando que uma grande parte dos melanomas deste estudo eram benignos. Mais uma vez, a dimensão do tumor, assim como todos os outros fatores estudados, não produziram resultados estatisticamente significativos no estudo de Verganti et al, (2017).

#### *Metastização*

Dos 4 estudos que avaliam a metastização, seja ela para linfonodos ou órgãos, local ou distante, apenas 2 apresentaram resultados estatisticamente significativos. Nesses estudos, a metastização é associada a menor tempo de sobrevida (Spangler & Kass, 2006; Tuohy et al., 2014).

Nos outros 2 estudos a metastização não foi associada, estatisticamente, aos tempos de sobrevida dos pacientes (Boston et al., 2014; Verganti et al., 2017).

### *Localização*

Dentro das várias localizações possíveis encontra-se a pele, a cavidade oral, os lábios, os olhos e os dígitos.

A avaliação da localização como fator prognóstico foi bastante consensual entre estudos, sendo que a localização oral foi a que apresentou sempre pior prognóstico e menor sobrevida, seguida dos lábios, dígitos, olhos e, por fim, a localização cutânea com o melhor prognóstico e maior tempo de sobrevida em todos os estudos (Bostock, 1979; Millanta et al., 2002; Martínez et al., 2011; Brockley et al., 2013).

### *Estadiamento*

Quanto aos 4 estudos que avaliaram o estadiamento, todos o fizeram de acordo com o estadiamento da OMS.

Nos estudos de Noguchi et al. (2013) e Tuohy et al. (2014) foi possível associar o estadiamento com a sobrevida, sendo que, o estadio III e IV são os estadios mais avançados e, que por sua vez, foram associados a menores tempos de sobrevida.

A associação entre a metastização e o tempo de sobrevida não foi estatisticamente significativa nos restantes estudos (Brockley et al., 2013; Iussich et al., 2017).

### *Pigmentação*

A pigmentação, como fator de prognóstico, pode ser interpretada de duas formas. Melanomas melanóticos com menor ou maior grau de pigmentação, ou comparando entre melanomas melanóticos e amelanóticos. De qualquer das formas, os resultados obtidos foram consistentes entre estudos, indicando que quanto menor a pigmentação, menor o tempo de sobrevida (Laprie et al., 2001; Mukaratirwa et al., 2006; Bergin et al., 2011). Relembrando que no estudo de Mukaratirwa et al. (2006) não correlacionaram com a sobrevida, mas sim com o enquadramento clínico dos pacientes, e que no estudo de Bergin et al. (2011), a pigmentação foi apenas estatisticamente significativa na análise univariada.

Mais uma vez, no estudo de Verganti et al. (2017), a pigmentação, assim como todos os outros fatores estudados, não foi estatisticamente significativa na correlação com a sobrevida.

#### *Sublocalização*

A sublocalização refere-se à localização dentro da cavidade oral, sendo por isso apenas avaliada em estudos que consideraram apenas os melanomas orais nas suas amostras. Esta sublocalização varia essencialmente entre rostral e caudal.

Apenas um estudo conseguiu correlacionar a sublocalização com a sobrevida, sendo que, confirma a sua própria teoria dizendo que os melanomas mais caudais dentro da cavidade oral apresentam menor tempo de sobrevida pois são muito mais difíceis de detetar pelo tutor ou médico veterinário, ao contrário dos mais rostrais, que são mais facilmente detetados (Proulx et al., 2003).

Nos restantes estudos não existiu correlação entre a sublocalização e os tempos de sobrevida (Bergin et al., 2011; Boston et al., 2014; Tuohy et al., 2014).

#### *Género*

O estudo de Tuohy et al. (2014) correlaciona os fatores de prognóstico com o ILD e o TS, dizendo que não existem diferenças significativas entre machos e fêmeas, mas que as fêmeas inteiras são as que apresentam maior ILD e TS, com significado estatístico.

Os restantes estudos não produziram resultados estatisticamente significativos na correlação entre o género dos cães e o tempo de sobrevida (Laprie et al., 2001; Spangler & Kass, 2006; Bergin et al., 2011).

#### *Grau de Invasão*

O grau de invasão refere-se aos tecidos que o tumor invadiu, variando consoante a localização do mesmo. Esta invasão pode ser considerada tanto em lateralidade como em profundidade dos tecidos subjacentes ao tumor, seja tecidos moles ou até mesmo osso.

Todos os estudos foram consistentes, concluindo que um maior grau de invasão do tumor está associado a menor sobrevida dos pacientes (Laprie et al., 2001; S. Roels et al., 1999; Millanta et al., 2002).

Apenas o estudo de Mukaratirwa et al. (2006) apresenta um resultado contraditório, referindo que tumores mais invasivos estão presentes nos pacientes com melhor apresentação clínica em conjugação com outros fatores, visto que este estudo não avaliou os seus fatores quanto à sobrevida.

### *Idade*

Como seria de esperar, os resultados dos estudos apontam para o óbvio, que quanto mais velho for o paciente, menor é o seu tempo de sobrevida, devido ao facto de que a probabilidade de existirem doenças concomitantes ser muito mais alta quanto mais velho for o animal.

Por isso, alguns estudos tentam especificar a partir de que idade o prognóstico se agrava, como no caso do estudo de Boston et al. (2014), que afirma que o agravamento do prognóstico se dá a partir dos 12 anos.

Noutro estudo, a idade apenas foi estatisticamente significativa quanto à sobrevida nos melanomas cutâneos (Spangler & Kass, 2006).

No terceiro estudo, a idade não foi estatisticamente significativa quanto à sobrevida (Bergin et al., 2011).

### *Atipia nuclear*

A atipia nuclear foi avaliada como fator de prognóstico em 3 estudos, sendo consistente nos 2 primeiros, estando fortemente associada a sua presença com um pior prognóstico e decréscimo na sobrevida dos pacientes com melanomas nas mais variadas localizações (Spangler & Kass, 2006). No estudo de Bergin et al. (2011), foi mesmo o único fator de prognóstico com resultados estatisticamente significativos, na associação com a sobrevida, tanto na análise univariada como na análise multivariada.

Apenas no terceiro estudo não foi possível associar a atipia nuclear com a sobrevida (Piras et al., 2017), sendo curioso que se trata do único estudo prospetivo considerado nesta revisão sistemática.

### *Classificação Histológica*

A classificação histológica é avaliada, nos 2 estudos, como melanoma benigno ou maligno, ou com a denominação de melanocitoma e melanoma maligno.

Os resultados para este fator de prognóstico foram inconsistentes nos estudos em que foi considerado, sendo os melanomas malignos os que apresentam pior prognóstico e, conseqüentemente, menor tempo de sobrevida (Bostock, 1979), não se obtendo um resultado estatisticamente significativo no segundo estudo que avaliou este fator de prognóstico (Millanta et al., 2002).

### *C-KIT*

Dois estudos avaliaram o recetor transmembranar da tirosina-kinase como fator de prognóstico, ou seja, se a sua presença e expressão está associada ao tempo de sobrevida dos pacientes.

No primeiro, não foi encontrada associação entre a expressão KIT e o tempo de sobrevida dos pacientes (Murakami et al., 2011), mas no segundo, os cães com expressão KIT em qualquer das secções representativas do seu melanoma, obtiveram tempos de sobrevida significativamente mais longos (Newman et al., 2012).

### *Peso*

O peso dos cães foi avaliado em 2 estudos, ambos de exclusivamente melanomas orais, sendo que no estudo mais antigo o peso não foi estatisticamente significativo quanto à sobrevida (Boston et al., 2014).

O estudo mais recente obteve um resultado surpreendente quanto a este fator de prognóstico raramente estudado, em que os cães com peso inferior a 20kg, independentemente do tratamento que realizaram, sobreviveram significativamente mais tempo, sendo o único fator de prognóstico deste estudo em que se obteve relação com os tempos de sobrevida (Piras et al., 2017).

### *Densidade microvascular*

A angiogénese é crucial para um desenvolvimento tumoral sustentável, permitindo a oxigenação e nutrição dos seus tecidos. A densidade microvascular avalia a evolução da

angiogénese, ou seja, quanto mais avançado é o processo de angiogénese do tumor, maior é a densidade microvascular. Neste estudo, quanto maior a densidade microvascular tumoral, menor o tempo de sobrevida dos pacientes, pois está intimamente associada ao desenvolvimento do tumor (Mukaratirwa et al., 2006).

O segundo estudo que avalia a densidade microvascular, pretende também avaliar o papel da angiogénese no desenvolvimento tumoral, mas no qual não se obteve significado estatístico quanto à sobrevida (Cuitiño et al., 2012).

### *Atividade juncional*

Quando avaliada histologicamente, a atividade juncional é definida como a disseminação intraepitelial de células dendríticas pigmentadas na junção do epitélio com a lamina própria.

O aumento da atividade juncional foi associada, juntamente com um grau de pigmentação aumentado e posição estritamente dérmica do tumor, com um aumento do tempo de sobrevida da população do único estudo que a avalia como fator de prognóstico (Laprie et al., 2001).

### *PCNA*

Apenas um estudo avaliou o PCNA como índice proliferativo e seu significado como fator de prognóstico em melanomas.

O PCNA é um polipeptídeo nuclear 36 kD, essencial para o correto funcionamento da síntese de ADN. Em medicina humana e noutros estudos em veterinária, o índice proliferativo do PCNA tem sido associado aos tempos de sobrevida dos pacientes, mas o mesmo não acontece neste estudo, em que o índice proliferativo do PCNA não foi estatisticamente associado ao tempo de sobrevida, num período de seguimento de 6 meses (Roels et al., 1999).

### *Ulceração*

A ulceração de um tumor implica que se encontre num estadio de invasão avançado ou, pelo menos, que acarrete um comportamento biológico agressivo.

No único estudo que a considera como fator de prognóstico, a ulceração foi associada a um agravamento do prognóstico, até mesmo na análise multivariada (Laprie et al., 2001).

#### *Lise óssea*

A lise óssea poderá ocorrer através da invasão do tumor primário, principalmente em melanomas orais ou do dígito, mas também através de metastização distante para os ossos.

Proulx et al. (2003) considerou a lise óssea como fator de prognóstico no seu estudo, concluindo que a presença de lise óssea está estatisticamente associada a menor tempo de sobrevida.

#### *Contagem de mastócitos*

Os mastócitos são proeminentes no microambiente tumoral, providenciando uma resposta imunitária do hospedeiro à neoplasia, desempenhando também um papel importante na angiogênese e quanto aos fatores angiogénicos. No estudo que avaliou a contagem de mastócitos como fator de prognóstico, não foi associado este mesmo fator aos tempos de sobrevida dos pacientes, mas sim a outras características clínicas, com objetivo de perceber a sua correlação com essas mesmas características e seu prognóstico. Ainda assim, um aumento na contagem de mastócitos, em circulação e nos tecidos peri-tumorais e tumorais, foi associada a um agravamento do prognóstico (Mukaratirwa et al., 2006).

#### *Grau de inflamação*

O grau de inflamação intralesional foi considerado como fator de prognóstico num estudo, concluindo que quanto maior o grau de inflamação menor é o tempo de sobrevida, tanto para os melanomas labiais e do dígito, como para os melanomas cutâneos, mas não se obtendo a mesma associação para os melanomas orais, em que não existiu significado estatístico quanto a este fator de prognóstico (Spangler & Kass, 2006).

## *COX-2*

As cicloxigenases são um grupo de enzimas envolvidas na conversão da catalisação do ácido araquidónico em prostaglandina H<sub>2</sub>, o precursor de prostanoídes durante os processos inflamatórios. A COX-2 é expressada em várias patologias, incluindo o cancro, no qual é responsável por inúmeros efeitos, como a angiogénese, metastização, antiapoptose, imunossupressão e proliferação de células neoplásicas (Wang, 2006).

No estudo de Martínez et al. (2011), é associada a expressão da COX-2 com outros fatores de prognóstico e o tempo de sobrevida. A expressão da COX-2 foi o fator mais fortemente correlacionado com o desfecho clínico e tempo de sobrevida dos pacientes, apresentado um valor preditivo independente na análise multivariada, na associação com a sobrevida.

## *Fascina-1*

A Fascina-1 é uma proteína que desempenha um papel crucial na organização de estruturas de actina, apresentando uma correlação positiva com um comportamento clínico agressivo e diminuição do tempo de sobrevivência em diversos tumores humanos (Oh, Kim, Suh, Paek, & Moon, 2012).

Yamada et al. (2012), avaliou a expressão da Fascina-1 como fator de prognóstico em melanomas orais e cutâneos, tendo sido possível associar a sua expressão com a sobrevida. Neste estudo, quanto mais forte a marcação imunohistoquímica pela Fascina-1, menor é o tempo de sobrevida do paciente.

## *Survivina e $\beta$ – catenina*

A via de sinalização da  $\beta$  – catenina desempenha um papel fundamental em diversos processos, incluindo no desenvolvimento dos melanócitos desde a crista neural (Larue, 2006).

A survivina é um gene alvo da via de sinalização da  $\beta$  – catenina, agindo como reguladora do ciclo celular e inibidora da apoptose (Bongiovanni, Müller, & Salda, 2011).

O estudo de Bongiovanni et al. (2015) avalia as duas moléculas como potenciais fatores de prognóstico, retirando conclusões importantes, como o facto de a expressão da survivina estar associada à presença de metastização e à morte do animal, tanto em

melanocitomas como em melanomas, ao contrário da  $\beta$  – catenina que apenas apresentou significado estatístico quando se consideram os tumores benignos e malignos em conjunto. Neste estudo não existiu evidência estatística significativa para ambas as moléculas, nem foi associada a sua expressão com o tempo de sobrevida.

### *PDGR's $\alpha$ e $\beta$*

Os PDGR's são recetores dos fatores de crescimento derivados das plaquetas, envolvidos em processos fisiológicos, mas também em processos patológicos, estando envolvidos na produção de fibroblastos, proliferação de células endoteliais e na regeneração dos tecidos, juntamente com processos fibróticos (Alvarez, Kantarjian, & Cortes, 2006).

Em medicina humana sabe-se que podem ser ativados por alterações genéticas, estando a sua disfunção associada a diversos tumores (Paulsson, Ehnman, & Östman, 2014).

No estudo de Iussich et al. (2017), foi avaliada a expressão dos PDGR's como fatores de prognóstico em melanomas orais. Concluíram então, que os cães com as categorias  $\alpha$  e  $\beta$  apresentaram um intervalo livre de doença e sobrevida menor, do que aquelas que apresentaram apenas uma das categorias de PDGR's ou nenhuma delas.

### *MicroRNA's*

Os MicroRNA's são uma nova classe de RNA's curtos, que estão envolvidos na regulação negativa da expressão de genes através da sequência específica com base no emparelhamento com os mRNA's. Cada um destes miRNA's pode controlar centenas de genes-alvo, com potencial influência em quase todas as vias genéticas, desempenhando um papel importante no crescimento celular e sua diferenciação, incluindo na apoptose e oncogénese (Bartel, 2004).

Apenas um estudo avalia a expressão dos miRNA's como supressor tumoral e fator prognóstico, no qual a expressão do miR-23 foi associado com a sobrevida, sendo que, quanto menor a sua expressão, menor é o tempo de sobrevida dos pacientes, não havendo a mesma associação estatística para outros miRNA's estudados (Noguchi et al., 2013).

### *Área endotelial*

A área endotelial é um parâmetro vascular, que em conjugação com a densidade microvascular pode ser utilizado para avaliar a angiogênese, com recurso à imunohistoquímica (Vermeulen et al., 1996).

O estudo que avalia o significado prognóstico da angiogênese no desenvolvimento tumoral, recorre à densidade microvascular e área endotelial, mas ainda assim não foi possível associar as alterações em ambos os parâmetros com os tempos de sobrevida dos pacientes (Cuitiño et al., 2012).

### **Conclusão**

Como referido anteriormente, a necessidade de informação necessária para poder formular uma resposta, no que toca ao prognóstico, tempo de vida e opções de tratamento consoante a avaliação desses mesmos fatores, é de elevada importância e exigida na prática clínica diária, independentemente da doença do paciente.

Posto isto, a presente revisão sistemática vem demonstrar que, para o melanoma, existem diversos fatores de prognóstico avaliados, com vista a dar uma resposta cada vez mais rápida e exata quanto ao tempo de sobrevida dos pacientes.

Os resultados da presente revisão sistemática permitem concluir que os fatores de prognóstico com maior frequência de associação com a sobrevida são o índice de Ki67, o índice mitótico e a dimensão do tumor. Estes são os fatores que mais se repetem nos 20 estudos considerados, sendo sempre relacionados negativamente com a sobrevida, ou seja, tanto um índice mitótico e um índice de Ki67 aumentados, como tumores de maiores dimensões, significam um agravamento do prognóstico e diminuição do tempo de sobrevida na grande maioria dos estudos.

Ainda assim, existem alguns resultados bastantes interessantes e prometedores, como é o caso da atipia nuclear, COX-2, Fascína-1 e os MicroRNA's, que apesar do baixo número de casos e estudos que os avaliem, apresentaram resultados estatisticamente significativos, que indicam que poderão ser usados no futuro como fatores de prognóstico a incluir no estudo prognóstico de cães com melanoma, padecendo ainda de estudos que envolvam maiores populações e que incluam grupos de controlo, assegurando uma maior fiabilidade dos resultados.

Na presente revisão sistemática, existe quase uma maioria absoluta de estudos retrospectivos, o que poderá induzir-nos em erro quanto à extrapolação de resultados para a grande maioria da população de cães. A maioria dos estudos retrospectivos não apresentam grupo de controlo, ou quando apresentam, a definição do grupo de controlo torna-se mais complicada, pois existem diversos fatores a ter em conta na escolha desse mesmo grupo, acrescentando ainda uma maior dificuldade quando os dados obtidos não são completos para todos os cães envolvidos no estudo. Posto isto, os estudos prospectivos são bastante vantajosos no que toca a escolher um grupo de controlo, pois os fatores envolvidos e a definição do grupo é criteriosamente escolhida mesmo antes de se iniciar a recolha de dados para a investigação.

A grande maioria dos 20 estudos selecionados tem um intervalo de tempo para a recolha de dados curto e, conseqüentemente, um número de casos insuficiente, principalmente no que toca a estudos que utilizam técnicas de diagnóstico dispendiosas como a imunohistoquímica ou a citometria de fluxo.

Ainda assim, os critérios definidos nos estudos são utilizados de forma objetiva e imparcial, sem interesses secundários, e muitas vezes, com o objetivo de perceber se os mesmos fatores de prognóstico utilizados em medicina humana, podem ser usados em medicina veterinária. Em quase todos os estudos, principalmente nos que avaliam novos fatores de prognóstico pela primeira vez em medicina veterinária, existe sempre uma avaliação desses fatores com outros anteriormente comprovados, de forma a reforçar a qualidade do estudo.

## **10. Avaliação do Rácio Neutrófilo/Linfócito no Melanoma oral**

### **10.1. Objetivos**

A elaboração deste estudo retrospectivo tem como objetivo avaliar a significância do Rácio Neutrófilo/Linfócito, em cães diagnosticados com melanoma oral, como fator de prognóstico.

### **10.2. Materiais e Métodos**

Este estudo trata-se da avaliação retrospectiva de uma amostra de 16 cães, previamente diagnosticados com melanoma oral de acordo com o sistema de classificação da OMS.

Todos os dados foram recolhidos através do programa Winvet e Bizagi no Hospital Veterinário Berna, desde julho de 2010 a março de 2018, com o parecer do Dr. Joaquim Henriques.

A recolha de dados incidiu na anamnese, quanto à raça, idade e estado fértil. Nas características do tumor, no que diz respeito à localização, metastização e consequente classificação. Foram também analisados os primeiros hemogramas, mais próximos do momento de diagnóstico, recolhendo o valor de neutrófilos e linfócitos para cada animal. Registou-se o tipo de tratamento efetuado para cada animal, cirúrgico, com recurso a quimioterapia ou imunoterapia, e por fim, o tempo de sobrevida para cada animal, registado em meses desde o momento do diagnóstico até à sua morte.

Neste estudo, foram incluídos todos os cães diagnosticados com melanoma oral, através de citologia ou histopatologia, e classificados através do sistema de classificação da OMS, excluindo-se todos os animais cujo diagnóstico foi inconclusivo ou para o qual não foi efetuado nenhum tipo de tratamento. Apenas dois cães sobreviveram até ao final do estudo, sendo que todos os outros morreram por progressão da doença.

A análise estatística dos dados recolhidos foi efetuada com recurso à ferramenta de software estatístico, IBM SPSS Statistics, versão 23.

Para os resultados obtidos foi efetuada a estatística descritiva, através do cálculo da média, mediana, mínimos e desvio-padrão, assim como a frequência absoluta e percentagem.

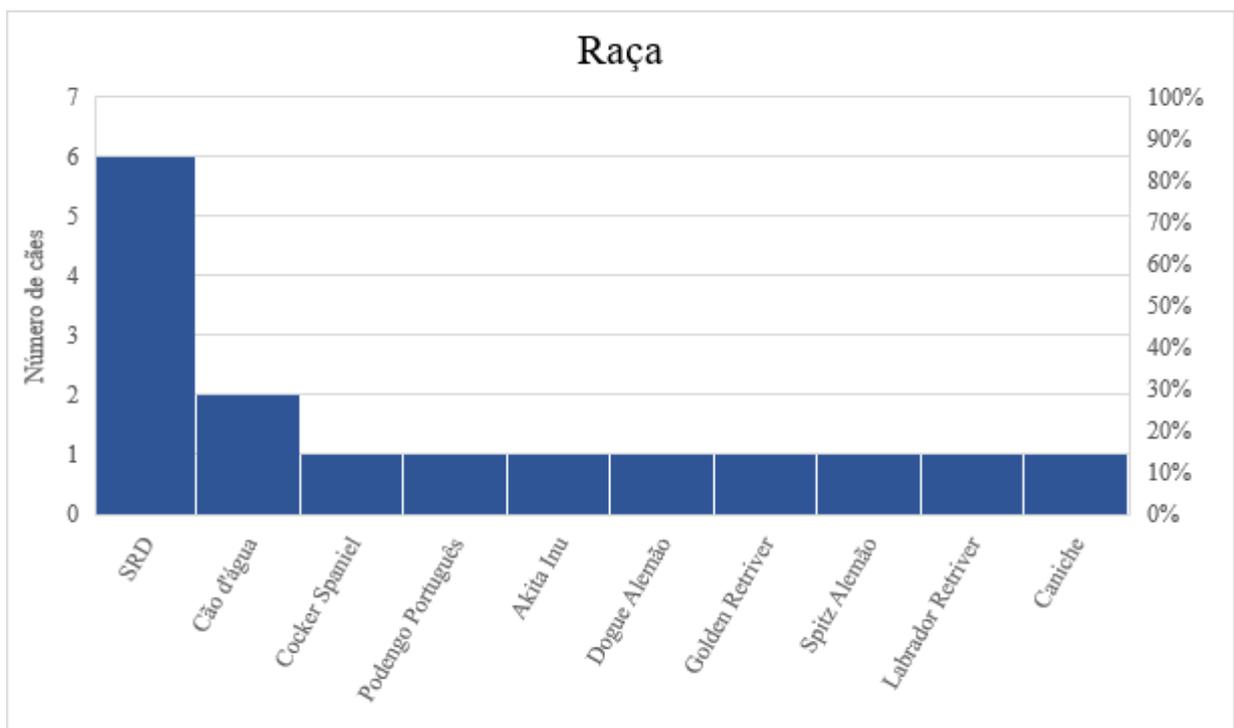
Para o RNL, considerou-se o valor da mediana como o valor ‘cut-off’, seguido do método de Kaplan-Meier para gerar as curvas de sobrevida, e posteriormente, analisando a influência do valor ‘cut-off’ na sobrevida, através do teste Log Rank.

Valores de  $p < 0,05$  foram considerados como estatisticamente significativos.

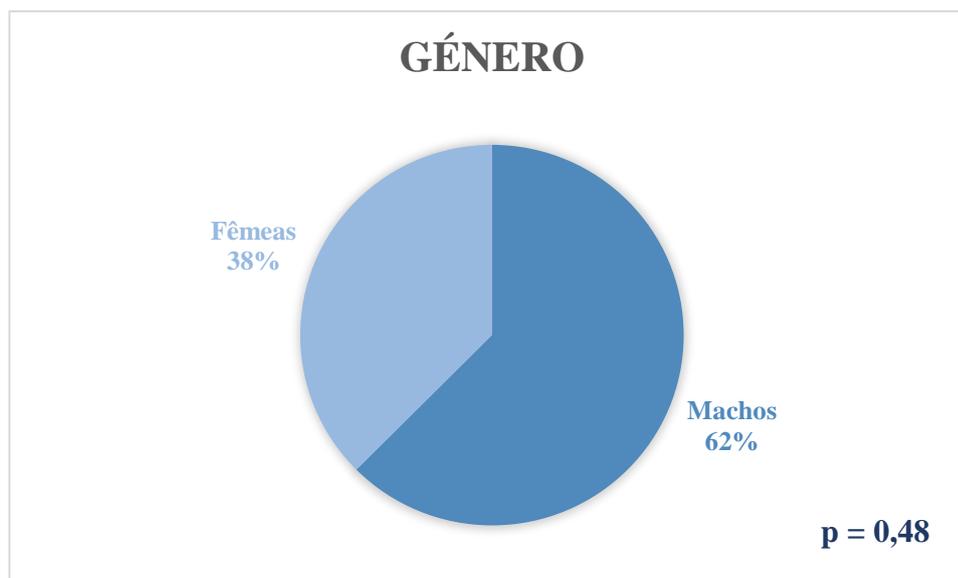
### 10.3. Resultados

Dos 16 cães incluídos neste estudo (gráfico 2), 6 eram cães sem raça definida (37,5%), 2 da raça cão d'água (12,5%) e as restantes raças, o cocker spaniel, podengo português, akita inu, dogue alemão, golden retriever, spitz alemão, labrador retriever e caniche, apenas com 1 representante no total da amostra (6,3%).

**Gráfico 2** – Distribuição da amostra quanto à Raça



**Gráfico 3** – Distribuição da amostra quanto ao Gênero



Quanto ao gênero, como ilustrado no gráfico 3, a amostra contempla 10 machos (62,5%) e 6 fêmeas (37,5%), obtendo-se então um valor  $p = 0,48$ , aparentemente sem predisposição sexual para a ocorrência de melanoma neste estudo.

Os cães apresentados neste estudo apresentam uma mediana de idade de 12 anos, num intervalo de 6 a 18 anos.

Quanto há classificação histológica do tumor, esta amostra apresenta, na sua maioria, 12 (75%) melanomas de vários tipos histológicos, e só 4 (25%) do total são melanomas amelanóticos.

No que toca à presença de metastização no total da amostra, 11 cães apresentavam doença metastática (68,8%) e apenas 5 (31,3%) não apresentavam metastização, no momento do diagnóstico.

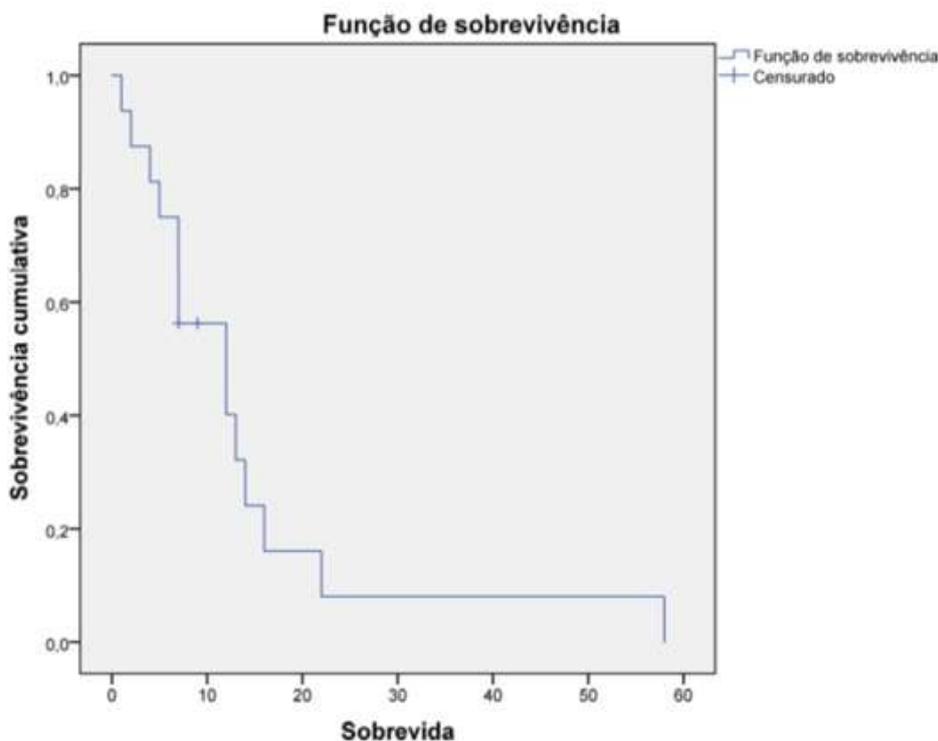
**Tabela 6** – Distribuição da amostra quanto ao estadio.

	<b>Frequência</b>	<b>Porcentagem</b>
<b>Estadio I</b>	2	12,5%
<b>Estadio II</b>	3	18,8%
<b>Estadio III</b>	4	25,0%
<b>Estadio IV</b>	7	43,8%

Na tabela 4, verificamos que dos 16 cães incluídos na nossa amostra, 2 encontravam-se no estadio I (12,5%), 3 cães no estadio II (18,8%), 4 cães no estadio III (25%), e 7, a maior percentagem, no estadio IV (43,5%), da classificação da OMS para o estadiamento do melanoma oral.

Conforme ilustrado no gráfico 4, a mediana de sobrevida total foi de 10 meses, sendo que a taxa de sobrevida aos 6, 12 e 24 meses foi de 75%, 25% e 6,3%, respetivamente.

**Gráfico 4** - Distribuição do tempo de sobrevida no total da amostra.



A mediana foi avaliada em 3 categorias no total da amostra, apresentando-se como  $10,4 \times 10^3 \mu\text{L}$  para os neutrófilos,  $2,1 \times 10^3 \mu\text{L}$  para os linfócitos e 3,7 para o RNL.

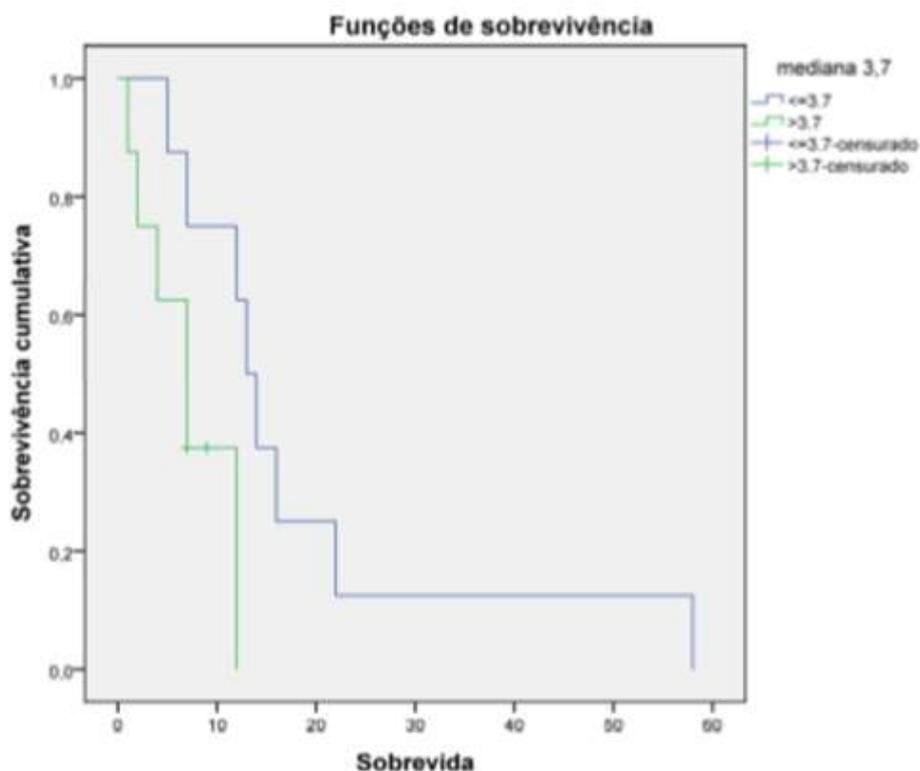
Quando analisada a distribuição da mediana do RNL em função da mediana de sobrevida, os cães em que a mediana era inferior a 3,7 apresentaram uma mediana de sobrevida de 13 meses. Já os cães com uma mediana de RNL superior a 3,7 apresentaram uma mediana de sobrevida de 7 meses, conforme apresentado na tabela 5 ( $p = 0,04$ ), (gráfico 5).

**Tabela 7** – Influência do RNL na sobrevida.

MEDIANA 3,7 (RNL)	MEDIANA (TEMPO DE SOBREVIDA)	MEDIANA (TEMPO DE SOBREVIDA)	
		Intervalo de confiança de 95%	
		Limite Inferior	Limite Superior
<b>&lt;= 3,7</b>	13	10,228	15,772
<b>&gt; 3,7</b>	7	2,974	11,026
<b>GERAL</b>	12	4,033	19,967
<b>LOG RANK (MANTEL-COX)</b>		<b>0,044</b>	

O gráfico 5, é uma ilustração da influência da mediana do RNL no tempo de sobrevida dos animais amostrados. É possível verificar que os cães com um valor de RNL inferior ou igual a 3,7 vivem significativamente mais tempo podendo atingir praticamente os 16 meses de vida, enquanto que os cães com valor superior a 3,7 apresentam menor tempo de sobrevida, podendo atingir apenas os 11 meses de vida após o diagnóstico de melanoma oral.

**Gráfico 5** – Representação gráfica da influência do ‘cut-off’ na sobrevida (p=0,04).



## 10.4. Discussão

A predisposição quanto à raça analisada neste estudo não é totalmente de acordo com outros estudos realizados à cerca do melanoma, em que as raças mais comuns de ocorrência desta neoplasia são, por exemplo, o Schnauzer (Goldschmidt, 1994), o Airedale terrier (Dorn & Priester, 1976) ou o Golden Retriever (Hahn et al., 1994). Tal poderá ser justificado por três fatores distintos, primeiro o pequeno número de animais amostrados, em segundo o facto destas raças nem estarem presentes no estudo, à exceção do Golden Retriever que é representado apenas por um animal, e em terceiro lugar pelo facto de a grande maioria dos amostrados serem cães sem raça definida (37,5%).

Já no que toca à predisposição quanto ao género, apesar de a maioria dos amostrados serem machos (62%), essa mesma maioria não é suficiente para que se possa afirmar que existe predisposição neste estudo ( $p = 0,48$ ), o que vai de acordo a semelhantes conclusões obtidas noutros estudos efetuados em melanomas orais (Bergin, Smedley, Esplin, Spangler, & Kiupel, 2011), melanomas cutâneos (Laprie et al., 2001) e melanomas labiais e do dígito (Schultheiss, 2006).

Num estudo, realizado por Bolon et al (1990), a média de idade para o aparecimento de melanoma maligno foi de 11,6 anos. Já noutro estudo, realizado apenas em melanomas orais, com uma amostra de apenas 25 casos, a idade dos animais amostrados variou entre os 4 e os 8 anos (Teixeira et al., 2014). No caso de estudos com maior número de amostras de cães com melanoma oral, a maioria apresentou uma idade entre os 10,5 a 12 anos, com uma média de 11,4 anos (Todoroff & Brodey, 1979; Ramos-Vara et al, 2000; Liptak & Withrow, 2013). Tais resultados são bastante semelhantes ao obtidos neste estudo, que apresenta uma mediana de 12 anos, sendo as variações possivelmente justificadas pela influência genética de cada animal, pelos fatores ambientais envolventes ou pela atenção dos devidos tutores na rapidez com que denotam alterações no seu animal.

Todos os estadiamento efetuados neste estudo foram feitos de acordo com a classificação da OMS para o melanoma oral em cães (Owen, 1980). Os resultados deste estudo são bastante evidentes, sendo que a maioria da amostra (68,8%) é constituídas por cães no estadio III e IV, sendo o estadio IV o mais influente, com 7 casos (43,8%) no total da amostra. Ora, isto significa que a grande maioria, no momento de diagnóstico já apresentava um tumor de tamanho considerável, com invasão dos linfonodos regionais, e com ou sem metastização distal.

Segundo Hahn et al (1994), o sistema alternativo com a ajuda do índice mitótico para o estadiamento de cada caso, é a melhor forma de produzir diferenças estatisticamente significativas no que toca à conclusão sobre os tempos de remissão e sobrevida.

Neste estudo não foi possível avaliar o índice mitótico, o que poderá comprometer a conclusão acerca da predisposição deste tumor quanto ao estadiamento. Ainda assim, diversos estudos reportam que os melanomas da cavidade oral são tipicamente malignos e com um pior prognóstico do que nas restantes localizações (Bostock, 1979; Bolon et al., 1990; Millanta et al., 2002; Mukaratirwa, Chikafa, Dliwayo, & Moyo, 2006), o que vai exatamente de acordo aos resultados aqui obtidos.

Mais uma vez, a metastização local ou distante foi identificada na maioria dos animais amostrados, representando 68,8% dos casos, o que vai exatamente de acordo ao anteriormente referido, em que a grande maioria dos casos englobam-se num estadio mais elevado. Sabe-se que o melanoma oral é uma neoplasia localmente agressiva, com potencial para invasão óssea em 57% dos casos, mas também com metastização para os linfonodos regionais em 30,3% a 74% dos casos, e para os pulmões ou outros órgãos distantes em 14% a 92% dos cães afetados (Ramos-Vara et al., 2000; Williams & Packer, 2003; Liptak & Withrow, 2013). O que significa que este tumor tem um elevado potencial metastático regional e/ou distante, como pode ser verificado neste estudo.

No que toca à pigmentação, a maioria dos amostrados apresentou diversos graus histológicos (75%) de melanoma, e apenas 25% do total da amostra foram classificados como melanomas amelanóticos. Como descrito na literatura, o diagnóstico histopatológico de melanoma amelanótico poderá ser um desafio, dada a sua semelhança com outros tipos de tumores (Smedley, Spangler, et al., 2011), podendo ser essa mesma a justificação para a sua baixa percentagem neste estudo, não por ocorrerem com menor frequência, mas porque nem sempre o seu diagnóstico histopatológico é feito. Sabe-se que os melanomas amelanóticos representam cerca de um terço de todos os casos de melanomas em cães (Nishiya et al., 2016), o que é semelhante aos resultados deste estudo, embora exista uma diferença significativa em que estas conclusões são retiradas de estudos em que foi feita identificação imunohistoquímica do tumor (Smedley et al., 2011; Ramos-Vara & Miller, 2011; Teixeira et al., 2014).

Nalguns estudos, o prognóstico para o melanoma oral apresenta uma mediana de sobrevida de 36 meses, bastante superior à encontrada neste estudo, que rondou os 10 meses (White, Jefferies, & Freedman, 1985; Liptak & Withrow, 2013; Boston et al., 2014). No

estudo realizado por MacEwen et al, (1986), a mediana de sobrevida para cães que realizaram cirurgia foi de aproximadamente de 17 a 18 meses para cães no estadio I, 5 a 6 meses para o estadio II e 3 meses para cães no estadio III. Já no caso de cães em que não seja efetuado qualquer tratamento, a mediana de sobrevida desde drasticamente para os 65 dias (Gillard et al., 2014). Estes valores tão díspares assentam em diversos problemas na realização destes estudos, principalmente no facto de que o estadiamento não é feito através do mesmo método para todos, sabendo que a classificação da OMS não produz diferenças estatísticas quanto à sobrevida e tempo de remissão da doença, mas que ainda é utilizado na maioria das vezes como único sistema de estadiamento da doença, assim como a histopatologia e o recurso ou não há imunohistoquímica. Para além disso, tal como acontece neste estudo, o estadiamento foi efetuado com base no primeiro sistema de classificação da OMS para o melanoma oral sem auxílio do índice mitótico proposto por Hahn et al, (1994), e muitos dos cães passam por processos de diagnóstico e tratamento bastante diferentes, o que influencia a forma como progride a doença e, conseqüentemente, a sobrevida associada.

No estudo acerca da utilização do RNL como instrumento para previsão do grau histológico de melanomas em cães, a mediana do valor de neutrófilos foi de  $6,7 \times 10^3 \mu\text{L}$ , de  $1,2 \times 10^3 \mu\text{L}$  para os linfócitos, e de 6 para o NLR, num total de 65 casos (Macfarlane et al., 2016). Já no estudo realizado por Mutz et al, (2015), que pretendeu avaliar o valor prognóstico do valor absoluto de linfócitos e do RNL em cães com linfoma multicêntrico, o valor de neutrófilos isoladamente não foi avaliado, mas obtiveram uma mediana de  $1,4 \times 10^3 \mu\text{L}$  para os linfócitos, e uma mediana de 6,2 para o RNL, num total de 148 cães amostrados. O terceiro estudo publicado, em medicina veterinária, que avalia o significado prognóstico do RNL, no sarcoma de tecido moles em cães, obteve um valor de  $7,6 \times 10^3 \mu\text{L}$  como mediana para os neutrófilos,  $0,9 \times 10^3 \mu\text{L}$  para os linfócitos, e 9,6 para RNL, num total de 22 casos, excluindo os casos de sarcoma dos tecidos moles benigno (Macfarlane et al., 2016). Posto isto, denota-se que os resultados são bastante diferentes de estudo para estudo, apresentando esta amostra uma mediana de  $10,4 \times 10^3 \mu\text{L}$  para os neutrófilos, significativamente mais alto do que em todos os outros estudos, de  $2,1 \times 10^3 \mu\text{L}$  para os linfócitos, novamente mais elevado do que nos restantes estudos, embora diminuído para um animal saudável, e uma mediana de 3,7 para o RNL, valor que cai para cerca de metade, quando comparado com estes estudos. Esta variação poderá dever-se a vários fatores, começando pelo baixo número de amostras deste estudo, que estatisticamente poderá influenciar bastante a mediana, ou até mesmo pelo facto de serem estudos com tumores diferentes, comportamentos e agressividades

diferentes. Dada a elevada percentagem de melanomas em estadio mais elevado, é de esperar que exista uma resposta inflamatória e imunitária mais exacerbada, o que vai de acordo com o estudo efetuado por Itoh et al, (2009), em que cães com doença oncológica apresentam valores leucocitários mais elevados em relação a cães saudáveis, aumentando ainda mais com a progressão da doença, nomeadamente um aumento significativo de células inflamatórias como os neutrófilos e os monócitos. Já noutro estudo, a influência destas populações leucocitárias em cães saudáveis e com diversas neoplasias malignas, foi estudada com recurso à citometria de fluxo, concluindo que existe um aumento no valor absoluto de leucócitos, aumentando ainda mais em cães com evidência de metastização, embora no caso dos linfócitos a sua percentagem relativa esteja diminuída. Em medicina veterinária é conhecido que em cães com linfoma existe uma linfopenia no momento do diagnóstico, ainda mais demarcada se a doença progredir sem tratamento, suspeitando-se assim que em pacientes oncológicos possa existir uma diminuição na produção de linfócitos, ou a supressão da sua maturação, assim como linfólise generalizada, ou alterações nos padrões de circulação, que levam a que estes animais tenham sistemas imunitários significativamente alterados (Watabe, Fukumoto, Komatsu, Endo, & Kadosawa, 2011).

O valor ‘cut-off’ assumido neste estudo foi obtido através do cálculo da mediana de todos os valores de RNL, obtendo-se assim o valor de 3,7. Ou seja, cães que apresentam um RNL, no momento de diagnóstico, inferior ou igual a 3,7 têm um prognóstico mais favorável, com uma mediana de sobrevida a chegar aos 13 meses. Já os cães com um RNL, no momento de diagnóstico, superior a 3,7 apresentam pior prognóstico, com uma mediana de sobrevida de cerca de 7 meses.

Nos outros estudos, realizados em medicina veterinária, o valor ‘cut-off’ obtido é diferente, mais uma vez podendo justificar-se pela grande diferença no número de casos, e pelo facto de resposta inflamatória e imunitária ser diferente de tumor para tumor.

Contudo, os resultados obtidos são bastante satisfatórios, porque apesar do número reduzido de cães desta amostra, esta apresenta um valor de  $p = 0,004$ , inferior ao limite de 0,05, significando assim que é seguro correlacionar, para este estudo, o valor ‘cut-off’ obtido com a sobrevida, apontando assim para a importância deste fator como ferramenta de prognóstico no momento inicial de diagnóstico.

Já nos outros estudos, foram obtidos resultados semelhantes, de que valores superiores ao valor ‘cut-off’ estabelecido apontam para uma tendência de casos com pior

prognóstico, mas ainda assim não foi possível obter uma diferença estatisticamente significativa para os associar à sobrevida.

## **10.5. Conclusão**

O melanoma no cão é uma neoplasia bastante complexa, multifatorial e ainda carente de muita investigação quanto aos melhores métodos para o seu diagnóstico, prognóstico e tratamento na medicina veterinária atual.

O rácio neutrófilo/linfócito apresenta, em diversos estudos, a sua importância como indicador prognóstico no momento inicial de diversas doenças, não só oncológicas, mas sem nunca descartar outros fatores de prognóstico que devem ser avaliados em conformidade. Este método com base em múltiplas informações é comum a diversas situações, tanto para o diagnóstico, como para o prognóstico e tratamento.

A revisão sistemática efetuada neste estudo permitiu concluir que existem alguns fatores de prognóstico, como o índice de Ki67 e o índice mitótico, que são muitas vezes estudados e colocados como fatores importantes para uma resposta mais clara quanto ao tempo de sobrevida dos pacientes. O RNL como fator de prognóstico não está presente, até à data desta dissertação, em nenhum dos estudos considerados, o que indica que ainda existe uma grande carência de estudos que permitam concluir quanto à importância e significância deste fator de prognóstico na associação com a sobrevida.

Este estudo tinha como principal objetivo determinar se este mesmo rácio pode ser usado em casos de melanoma oral, como bom indicador de prognóstico no momento de diagnóstico.

Existem alguns fatores que podem condicionar as conclusões a retirar deste estudo. Para começar, a amostra é composta por um número muito reduzido de casos, e apenas de carácter retrospectivo, o que significa que não podemos extrapolar estes resultados para toda a população de cães com melanoma oral. Para além disso, o percurso de diagnóstico e tratamento destes animais foi praticamente sempre diferente para cada caso, o que significa que os tempos de sobrevida podem ter sido drasticamente influenciados pelas opções tomadas. Ou seja, um animal que inicialmente até apresentava um valor de RNL intermédio, mas que não realizou tratamento, teve o seu tempo de vida encurtado, influenciado assim a mediana de sobrevida.

Ainda assim, para a população deste estudo, é possível afirmar que o RNL foi um bom indicador de prognóstico no momento inicial de diagnóstico da doença, sendo que,

usando o ‘cut-off’ de 3,7 a mediana de sobrevida desce para os 7 meses. Este estudo pode então ser um bom indicador da importância do RNL como fator de prognóstico, não só pelo facto de que se obtiveram resultados estatisticamente significativos, mas também por ser um método relativamente rápido e pouco dispendioso de se aplicar noutros estudos que considerem populações maiores e com critérios de inclusão melhor definidos.

No futuro, para que seja possível obter conclusões mais assertivas, é necessário aumentar bastante o número de casos da amostra, assim como, optar por agrupar os diferentes casos consoante o diagnóstico e tratamento, visto que este pode influenciar o tempo de sobrevida de cada animal, e consequentemente, avaliar a mediana de sobrevida deste estudo. Para tornar esses estudos ainda mais interessantes, seria também importante correlacionar o RNL, com outros fatores de prognóstico para o melanoma oral, e relacioná-los com a sobrevida, de forma a perceber quais são os fatores de prognóstico que dão as melhores previsões.

## 11. Bibliografia

- Alexander, A. N., Huelsmeyer, M. K., Mitzey, A., Dubielzig, R. R., Kurzman, I. D., MacEwen, E. G., & Vail, D. M. (2006). Development of an allogeneic whole-cell tumor vaccine expressing xenogeneic gp100 and its implementation in a phase II clinical trial in canine patients with malignant melanoma. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 55(4), 433–442.
- Alvarez, R. H., Kantarjian, H. M., & Cortes, J. E. (2006). Biology of Platelet-Derived Growth Factor and Its Involvement in Disease. *Mayo Clinic Proceedings*, 81(9), 1241–1257.
- Azab, B., Chainani, V., Shah, N., & McGinn, J. T. (2013). Neutrophil–Lymphocyte Ratio as a Predictor of Major Adverse Cardiac Events Among Diabetic Population. *Angiology*, 64(6), 456–465.
- Balkwill, F., & Mantovani, A. (2001). Inflammation and cancer: back to Virchow? *The Lancet*, 357(9255), 539–545.
- Barger, A. (2012). Cytology of Neoplasia: An Essential Component of Diagnosis, 2(October), 12–17.
- Bartel, D. P. (2004). MicroRNAs. *Cell*, 116(2), 281–297.
- Bastian, B. C. (2014). The molecular pathology of melanoma: an integrated taxonomy of melanocytic neoplasia. *Annual Review of Pathology*, 9(1), 239–271.
- 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. *Veterinary Pathology*, 48(1), 41–53.
- Bergman, P. J. (2007). Canine Oral Melanoma. *Clinical Techniques in Small Animal Practice*, 22(2), 55–60.
- Bergman, P. J., Kent, M. S., & Farese, J. P. (2012). Melanoma. In D. Vail (Ed.), *Small Animal Oncology* (5<sup>a</sup> Edição, pp. 321–334). St. Louis, Missouri: Elsevier Saunders.
- Bergman, P. J., & Wolchok, J. D. (2008). Of mice and med (and dogs): development of a xenogeneic DNA vaccine for canine oral malignant melanoma. *Cancer Therapy*, 6(6), 817–826.
- Blackwood, L. (2011). Tumours of the skin and subcutaneous tissues. In *BSAVA Manual of Canine and Feline Oncology* (3<sup>a</sup> Edição, pp. 140–142). Gloucester: BSAVA.
- Bolon, B., Mays, M. B. C., Hall, B. J., Calderwood Mays, M. B., & Hall, B. J. (1990). Characteristics of Canine Melanomas and Comparison of Histology and DNA Ploidy to Their Biologic Behavior. *Veterinary Pathology*, 27(2), 96–102.

- Bongiovanni, L., D'Andrea, A., Porcellato, I., Ciccarelli, A., Malatesta, D., Romanucci, M., ... Brachelente, C. (2015). Canine cutaneous melanocytic tumours: significance of  $\beta$ -catenin and survivin immunohistochemical expression. *Veterinary Dermatology*, 26(4), 270-e59.
- Bongiovanni, L., Müller, E. J., & Salda, L. Della. (2011). Survivin in skin pathologies. *Experimental Dermatology*, 20(6), 457–463.
- Boria, P. A., Murry, D. J., Bennett, P. F., Glickman, N. W., Snyder, P. W., Merkel, B. L., ... Knapp, D. W. (2004). 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*, 224(3), 388–394.
- Bostock, D. E. (1979a). Prognosis after surgical excision of canine melanomas. *Veterinary Pathology*, 16(1), 32–40.
- Bostock, D. E. (1979b). Prognosis after Surgical Excision of Canine Melanomas. *Veterinary Pathology*, 16(1), 32–40.
- Boston, S. E., Lu, X., Culp, W. T. N., Montinaro, V., Romanelli, G., Dudley, R. M., ... Buracco, P. (2014). 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*, 245(4), 401–407.
- Bozbay, M., & Uyarel, H. (2015). Neutrophil-to-lymphocyte ratio: A novel and simple prognostic marker for infective endocarditis. *Journal of Critical Care*, 30(4), 822.
- Brockley, L., Cooper, M., & Bennett, P. (2013). Malignant melanoma in 63 dogs (2001–2011): the effect of carboplatin chemotherapy on survival. *New Zealand Veterinary Journal*, 61(1), 25–31.
- Brockley, L. K., Cooper, M. A., & Bennett, P. F. (2013). Malignant melanoma in 63 dogs (2001–2011): the effect of carboplatin chemotherapy on survival. *New Zealand Veterinary Journal*, 61(1), 25–31.
- Brønden, L. B., Eriksen, T., & Kristensen, A. T. (2009). Oral malignant melanomas and other head and neck neoplasms in Danish dogs--data from the Danish Veterinary Cancer Registry. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 51(1), 54.
- Cancedda, S., Rohrer Bley, C., Aresu, L., Dacasto, M., Leone, V. F., Pizzoni, S., ... Marconato, L. (2016). Efficacy and side effects of radiation therapy in comparison with radiation therapy and temozolomide in the treatment of measurable canine malignant melanoma. *Veterinary and Comparative Oncology*, 14(4), e146–e157.

- Choi, C., & Kusewitt, D. F. (2003). Comparison of tyrosinase-related protein-2, S-100, and melan A immunoreactivity in canine amelanotic melanomas. *Veterinary Pathology*, 40(6), 713–718.
- Cuitiño, M. C., Massone, A. R., & Idiart, J. R. (2012). Lack of prognostic significance of angiogenesis in canine melanocytic tumours. *Journal of Comparative Pathology*, 147(2–3), 147–152.
- Daskalopoulou, D., Galanopoulou, A., Statiropoulou, P., Papapetrou, S., Pandazis, I., & Markidou, S. (1998). Cytologically interesting cases of primary skin tumors and tumor-like conditions identified by fine-needle aspiration biopsy. *Diagnostic Cytopathology*, 19(1), 17–28.
- Dennis, M. M., Ehrhart, N., Duncan, C. G., Barnes, A. B., & Ehrhart, E. J. (2006). Frequency of and risk factors associated with lingual lesions in dogs: 1,196 cases (1995–2004). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 228(10), 1533–1537.
- Donald, M. (2016). *Tumors in Domestic Animals* (5<sup>a</sup> Edição). C: Wiley Blackwell.
- Dorn, C. R., & Priester, W. A. (1976). Epidemiologic analysis of oral and pharyngeal cancer in dogs, cats, horses, and cattle. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 169(11), 1202–1206.
- Dubielzig, R. . (2016). Tumors of the Eye. In M. Donald (Ed.), *Tumors in Domestic Animals* (5<sup>a</sup> Edição, pp. 892–922). Iowa: Wiley Blackwell.
- Dubielzig, R. ., Ketring, K. ., Mclellan, G. ., & Albert, D. . (2010). *Veterinary Ocular Pathology: A Comparative Review*. Philadelphia, USA: Wiley Blackwell.
- Enache, A., Ionascu, I., Boydell, P., & Scase, T. (2013). Clinical Presentation, Diagnostic and Therapeutic Approach of Ocular Melanosis in a Golden Retriever-Case Study. *Scientific Works. Series C. Veterinary Medicine*, LIX(3), 85–90.
- Esplin, D. G. (2008). Survival of Dogs Following Surgical Excision of Histologically Well-differentiated Melanocytic Neoplasms of the Mucous Membranes of the Lips and Oral Cavity. *Veterinary Pathology*, 45(6), 889–896.
- Ferrucci, F., Ascierio, A., Pigozzo, J., Del Vecchio, M., Maio, M., Antonini Cappellini, C., ... Martinoli, C. (2016). Baseline neutrophils and derived neutrophil-to-lymphocyte ratio: prognostic relevance in metastatic melanoma patients receiving ipilimumab. *Annals of Oncology*, 27(4), 732–738.
- Fisher, E., Kwong, N., & Chin, L. (2008). Melanoma. In T. De Vita, S. Lawrence, & A. Rosenberg (Eds.), *Hellman and Rosenberg's Cancer Principles & Practice of Oncology*

- (8<sup>a</sup> Edição, pp. 1889–1951). Philadelphia, USA: Lippincott Williams & Wilkins.
- Forget, P., Khalifa, C., Defour, J. P., Latinne, D., Van Pel, M. C., & De Kock, M. (2017). What is the normal value of the neutrophil-to-lymphocyte ratio? *BMC Research Notes*, *10*(1), 1–4.
- Forrest, L., & Kraft, S. (2012). Imaging in Oncology. In D. Vail (Ed.), *Small Animal Oncology* (5<sup>a</sup> Edição, pp. 98–99). St. Louis, Missouri: Elsevier Saunders.
- Freeman, K. P., Hahn, K. A., Harris, F. D., & King, G. K. (2003). Treatment of dogs with oral melanoma by hypofractionated radiation therapy and platinum based chemotherapy. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, *17*(1), 96–101.
- Gardner, I. A., & Greiner, M. (2006). Receiver-operating characteristic curves and likelihood ratios: improvements over traditional methods for the evaluation and application of veterinary clinical pathology tests. *Veterinary Clinical Pathology*, *35*(1), 8–17.
- Ghisleni, G., Roccabianca, P., Ceruti, R., Stefanello, D., Bertazzolo, W., Bonfanti, U., & Caniatti, M. (2006). Correlation between fine-needle aspiration cytology and histopathology in the evaluation of cutaneous and subcutaneous masses from dogs and cats. *Veterinary Clinical Pathology*, *35*(1), 24–30.
- Gibson, P. H., Croal, B. L., Cuthbertson, B. H., Small, G. R., Ifezulike, A. I., Gibson, G., ... Hillis, G. S. (2007). Preoperative neutrophil-lymphocyte ratio and outcome from coronary artery bypass grafting. *American Heart Journal*, *154*(5), 995–1002.
- Gillard, M., Cadieu, E., De Brito, C., Abadie, J., Vergier, B., Devauchelle, P., ... André, C. (2014). Naturally occurring melanomas in dogs as models for non-UV pathways of human melanomas. *Pigment Cell & Melanoma Research*, *27*(1), 90–102.
- Giudice, C., Ceciliani, F., Rondena, M., Stefanello, D., & Grieco, V. (2010). Immunohistochemical investigation of PNL2 reactivity of canine melanocytic neoplasms and comparison with Melan A. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, *22*(3), 389–394.
- Goldschmidt, M. H. (1994). Pigmented lesions of the skin. *Clinics in Dermatology*, *12*(4), 507–514.
- Goldschmidt, M. H., & Goldschmidt, K. H. (2016). Epithelial and Melanocytic Tumors of the Skin. In *Tumors in Domestic Animals* (5<sup>a</sup> Edição, pp. 129–131). Iowa: Wiley Blackwell.
- Griffiths, G. L., Lumsden, J. H., & Valli, V. E. O. (1984). Fine Needle Aspiration Cytology and Histologic Correlation in Canine Tumors. *Veterinary Clinical Pathology*, *13*(1), 13–17.

- Grosenbaugh, D. A., Leard, A. T., Bergman, P. J., Klein, M. K., Meleo, K., Susaneck, S., ... Wolchok, J. D. (2011). Safety and efficacy of a xenogeneic DNA vaccine encoding for human tyrosinase as adjunctive treatment for oral malignant melanoma in dogs following surgical excision of the primary tumor. *American Journal of Veterinary Research*, 72(12), 1631–1638.
- Guevara-Patiño, J. A., Turk, M. J., Wolchok, J. D., & Houghton, A. N. (2003). Immunity to cancer through immune recognition of altered self: studies with melanoma. *Advances in Cancer Research*, 90, 157–177.
- Guthrie, G. J. K., Charles, K. A., Roxburgh, C. S. D., Horgan, P. G., McMillan, D. C., & Clarke, S. J. (2013). The systemic inflammation-based neutrophil–lymphocyte ratio: Experience in patients with cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 88(1), 218–230.
- Gyorffy, S., Rodriguez-Lecompte, J. C., Woods, J. P., Foley, R., Kruth, S., Liaw, P. C. Y. Y., & Gauldie, J. (2005). Bone Marrow–Derived Dendritic Cell Vaccination of Dogs with Naturally Occurring Melanoma by Using Human gp100 Antigen. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 19(1), 56.
- Haass, N. K., Ripperger, D., Wladykowski, E., Dawson, P., Gimotty, P. A., Blome, C., ... Brandner, J. M. (2010). Melanoma progression exhibits a significant impact on connexin expression patterns in the epidermal tumor microenvironment. *Histochemistry and Cell Biology*, 133(1), 113–124.
- Hahn, K. A., DeNicola, D. B., Richardson, R. C., & Hahn, E. A. (1994). Canine oral malignant melanoma: Prognostic utility of an alternative staging system. *Journal of Small Animal Practice*, 35(5), 251–256.
- Harvey, H. J., MacEwen, E. G., Braun, D., Patnaik, A. K., Withrow, S. J., & Jongeward, S. (1981). Prognostic criteria for dogs with oral melanoma. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 178(6), 580–582.
- Head, K. ., Else, R. ., & Dubielzig, R. . (2016). Tumors of the Alimentary Trac. In *Tumors in Domestic Animals* (5<sup>a</sup> Edição, pp. 426–430). Iowa: Wiley Blackwell.
- Henry, C. J., Brewer, W. G., Whitley, E. M., Tyler, J. W., Ogilvie, G. K., Norris, A., ... Veterinary Cooperative Oncology Group (VCOG). (2005). Canine digital tumors: a veterinary cooperative oncology group retrospective study of 64 dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 19(5), 720–724.
- Horiuchi, Y., Tominaga, M., Ichikawa, M., Yamashita, M., Okano, K., Jikumaru, Y., ...

- Yukawa, M. (2010). Relationship between regulatory and type 1 T cells in dogs with oral malignant melanoma. *Microbiology and Immunology*, 54(3), 152–159.
- Hume, K. R., Johnson, J. L., & Williams, L. E. (2009). Adverse Effects of Concurrent Carboplatin Chemotherapy and Radiation Therapy in Dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 23(1), 24–30.
- Hunter, T. (1997). Oncoprotein Networks. *Cell*, 88(3), 333–346.
- Hyodo, I., Doi, T., Endo, H., Hosokawa, Y., Nishikawa, Y., Tanimizu, M., ... Kotani, Y. (1998). Clinical significance of plasma vascular endothelial growth factor in gastrointestinal cancer. *European Journal of Cancer (Oxford, England : 1990)*, 34(13), 2041–2045.
- Ihrke, P. ., Walder, E. ., & Affolter, V. . (2005). Melanocytic tumors. In L. Gross (Ed.), *Skin diseases of the dog and cat : Clinical and histopathologic diagnosis* (2ª Edição, pp. 813–836). Oxford: Blackwell Science.
- Ishizuka, M., Shimizu, T., & Kubota, K. (2012). Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio Has a Close Association With Gangrenous Appendicitis in Patients Undergoing Appendectomy. *International Surgery*, 97(4), 299–304.
- Itoh, H., Horiuchi, Y., Nagasaki, T., Sakonju, I., Kakuta, T., Fukushima, U., ... Takase, K. (2009). Evaluation of immunological status in tumor-bearing dogs. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 132(2–4), 85–90.
- Iussich, S., Maniscalco, L., Di Sciuva, A., Iotti, B., Morello, E., Martano, M., ... De Maria, R. (2017). PDGFRs expression in dogs affected by malignant oral melanomas: correlation with prognosis. *Veterinary and Comparative Oncology*, 15(2), 462–469.
- Jin-no, K., Tanimizu, M., Hyodo, I., Nishikawa, Y., Hosokawa, Y., Endo, H., ... Ishitsuka, H. (1998). Circulating platelet-derived endothelial cell growth factor increases in hepatocellular carcinoma patients. *Cancer*, 82(7), 1260–1267.
- Kahramanca, S., Ozgehan, G., Seker, D., Gökce, E. I., Seker, G., Tunç, G., ... Kargıcı, H. (2014). Neutrophil-to-lymphocyte ratio as a predictor of acute appendicitis. *Ulusal Travma ve Acil Cerrahi Dergisi = Turkish Journal of Trauma & Emergency Surgery : TJTES*, 20(1), 19–22.
- Khan, N., Khan, M. K., Almasan, A., Singh, A. D., & MacKlis, R. (2011). The evolving role of radiation therapy in the management of malignant melanoma. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 80(3), 645–654.
- Khanna, C., Lindblad-Toh, K., Vail, D., London, C., Bergman, P., Barber, L., ... Withrow, S.

- (2006). The dog as a cancer model. *Nature Biotechnology*, 24(9), 1065–1066.
- Kim, H. S., Han, K. H., Chung, H. H., Kim, J. W., Park, N. H., Song, Y. S., & Kang, S. B. (2010). Neutrophil to lymphocyte ratio for preoperative diagnosis of uterine sarcomas: A case-matched comparison. *European Journal of Surgical Oncology (EJSO)*, 36(7), 691–698.
- Kitchell, B. E., Brown, D. M., Luck, E. E., Woods, L. L., Orenberg, E. K., & Bloch, D. A. (1994). Intralesional implant for treatment of primary oral malignant melanoma in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 204(2), 229–236.
- Koenig, A., Wojcieszyn, J., Weeks, B. R., & Modiano, J. F. (2001). Expression of S100a, Vimentin, NSE, and Melan A/MART-1 in Seven Canine Melanoma Cell Lines and Twenty-nine Retrospective Cases of Canine Melanoma. *Veterinary Pathology*, 38(4), 427–435.
- Kosovsky, J. K., Matthiesen, D. T., Marretta, S. M., & Patnaik, A. K. (1991). Results of partial mandibulectomy for the treatment of oral tumors in 142 dogs. *Veterinary Surgery: VS*, 20(6), 397–401.
- Lacroux, C., Raymond-Letron, I., Bourges-Abella, N., Lucas, M. N., Deviers, A., Serra, F., ... Delverdier, M. (2012). Study of canine cutaneous melanocytic tumours: evaluation of histological and immunohistochemical prognostic criteria in 65 cases. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 163(8–9), 393–401.
- Laprie, C., Abadie, J., Amardeilh, M. F., Net, J. L. L. E., Lagadic, M., & Delverdier, M. (2001). MIB-1 immunoreactivity correlates with biologic behaviour in canine cutaneous melanoma. *Veterinary Dermatology*, 12(3), 139–147.
- Larue, L. (2006). The WNT/Beta-catenin pathway in melanoma. *Frontiers in Bioscience*, 11(1), 733.
- Levine, A. J. (1997). P53, the Cellular Gatekeeper for Growth and Division. *Cell*, 88(3), 323–331.
- Lino-Silva, L., Salcedo-Hernández, R., García-Pérez, L., Meneses-García, A., & Zepeda-Najar, C. (2017). Basal neutrophil-to-lymphocyte ratio is associated with overall survival in melanoma. *Melanoma Research*, 27(2), 140–144.
- Liptak, M., & Withrow, J. (2013). Cancer of gastrointestinal tract. In J. Withrow & M. Vail (Eds.), *Small Animal Clinical Oncology* (5<sup>a</sup> Edição, pp. 381–395). St. Louis, Missouri: Elsevier Saunders.
- MacEwen, E. G., Kurzman, I. D., Vail, D. M., Dubielzig, R. R., Everlith, K., Madewell, B.

- R., ... Fidel, J. (1999). Adjuvant therapy for melanoma in dogs: results of randomized clinical trials using surgery, liposome-encapsulated muramyl tripeptide, and granulocyte macrophage colony-stimulating factor. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 5(12), 4249–4258.
- MacEwen, E. G., Patnaik, A. K., Harvey, H. J., Hayes, A. A., & Matus, R. (1986). Canine oral melanoma: comparison of surgery versus surgery plus *Corynebacterium parvum*. *Cancer Investigation*, 4(5), 397–402.
- Macfarlane, L., Morris, J., Pratschke, K., Mellor, D., Scase, T., Macfarlane, M., & Mclauchlan, G. (2016). Diagnostic value of neutrophil-lymphocyte and albumin-globulin ratios in canine soft tissue sarcoma. *Journal of Small Animal Practice*, 57(3), 135–141.
- Macfarlane, M. J., Macfarlane, L. L., Scase, T., Parkin, T., & Morris, J. S. (2016). Use of neutrophil to lymphocyte ratio for predicting histopathological grade of canine mast cell tumours. *Veterinary Record*, 179(19), 491–491.
- Martínez, C. M., Peñafiel-Verdú, C., Vilafranca, M., Ramírez, G., Méndez-Gallego, M., Buendía, A. J., ... Sánchez, J. (2011). Cyclooxygenase-2 expression is related with localization, proliferation, and overall survival in canine melanocytic neoplasms. *Veterinary Pathology*, 48(6), 1204–1211.
- 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. *Research in Veterinary Science*, 73(1), 45–51.
- Modiano, J. F., Ritt, M. G., & Wojcieszyn, J. (1999). The Molecular Basis of Canine Melanoma: Pathogenesis and Trends in Diagnosis and Therapy. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 13(3), 163–174.
- Moore, A. S. (2008). Staging Melanoma of the Oral Cavity or Skin in Dogs. *NAVCClinician's Brief*, 27–30.
- Mukaratirwa, S., Chikafa, L., Dliwayo, R., & Moyo, N. (2006). Mast cells and angiogenesis in canine melanomas: malignancy and clinicopathological factors. *Veterinary Dermatology*, 17(2), 141–146.
- Murakami, A., Mori, T., Sakai, H., Murakami, M., Yanai, T., Hoshino, Y., & Maruo, K. (2011). Analysis of KIT expression and KIT exon 11 mutations in canine oral malignant melanomas. *Veterinary and Comparative Oncology*, 9(3), 219–224.
- Murphy, S., Hayes, A. M., Blackwood, L., Maglennon, G., Pattinson, H., & Sparkes, A. H.

- (2005). Oral malignant melanoma - the effect of coarse fractionation radiotherapy alone or with adjuvant carboplatin therapy. *Veterinary and Comparative Oncology*, 3(4), 222–229.
- Mutz, M., Boudreaux, B., Kearney, M., Stroda, K., Gaunt, S., & Shiomitsu, K. (2015). Prognostic value of baseline absolute lymphocyte concentration and neutrophil/lymphocyte ratio in dogs with newly diagnosed multi-centric lymphoma. *Veterinary and Comparative Oncology*, 13(4), 337–347.
- Newman, S. J., Jankovsky, J. M., Rohrbach, B. W., & LeBlanc, A. K. (2012). C-kit expression in canine mucosal melanomas. *Veterinary Pathology*, 49(5), 760–765.
- Nishiya, A., Massoco, C., Felizzola, C., Perlmann, E., Batschinski, K., Tedardi, M., ... Zaidan Dagi, M. (2016). Comparative Aspects of Canine Melanoma. *Veterinary Sciences*, 3(4), 7.
- Noguchi, S., Mori, T., Hoshino, Y., Yamada, N., Maruo, K., & Akao, Y. (2013). MicroRNAs as tumour suppressors in canine and human melanoma cells and as a prognostic factor in canine melanomas. *Veterinary and Comparative Oncology*, 11(2), 113–123.
- O'Day, S., & Boasberg, P. (2006). Management of Metastatic Melanoma 2005. *Surgical Oncology Clinics of North America*, 15(2), 419–437.
- Oh, S. Y., Kim, Y. B., Suh, K. W., Paek, O. J., & Moon, H. Y. (2012). Prognostic Impact of Fascin-1 Expression is More Significant in Advanced Colorectal Cancer. *Journal of Surgical Research*, 172(1), 102–108.
- Ohsie, S. J., Sarantopoulos, G. P., Cochran, A. J., & Binder, S. W. (2008). Immunohistochemical characteristics of melanoma. *Journal of Cutaneous Pathology*, 35(5), 433–444.
- Ottod, J. M., Smedley, R. C., Walshaw, R., Hauptman, J. G., Kiupel, M., & Obradovich, J. E. (2013). A retrospective analysis of the efficacy of Oncept vaccine for the adjunct treatment of canine oral malignant melanoma. *Veterinary and Comparative Oncology*, 11(3), 219–229.
- Owen, L. (1980). TNM Classification of tumours in domestic animals. *World Health Organisation*, 1–52.
- Park, J. J., Jang, H.-J., Oh, I.-Y., Yoon, C.-H., Suh, J.-W., Cho, Y.-S., ... Choi, D.-J. (2013). Prognostic Value of Neutrophil to Lymphocyte Ratio in Patients Presenting With ST-Elevation Myocardial Infarction Undergoing Primary Percutaneous Coronary Intervention. *The American Journal of Cardiology*, 111(5), 636–642.

- Patterson, H., & Latimer, K. S. (2001). *The Variable Cytological Appearance of Melanoma in Dogs*. Georgia.
- Paulsson, J., Ehnman, M., & Östman, A. (2014). PDGF receptors in tumor biology: prognostic and predictive potential. *Future Oncology*, *10*(9), 1695–1708.
- Piras, L. A., Riccardo, F., Iussich, S., Maniscalco, L., Gattino, F., Martano, M., ... Buracco, P. (2017). Prolongation of survival of dogs with oral malignant melanoma treated by en bloc surgical resection and adjuvant CSPG4-antigen electrovaccination. *Veterinary and Comparative Oncology*, *15*(3), 996–1013.
- Pires, I., Garcia, A., Prada, J., & Queiroga, F. L. (2010). COX-1 and COX-2 expression in canine cutaneous, oral and ocular melanocytic tumours. *Journal of Comparative Pathology*, *143*(2–3), 142–149.
- Proulx, D. R., Ruslander, D. M., Dodge, R. K., Hauck, M. L., Williams, L. E., Horn, B. B., ... Thrall, D. E. (2003). A retrospective analysis of 140 dogs w/ oral melanoma treated w/ external beam radiation. *Veterinary Radiology & US*, *44*(3), 352–359.
- 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. *Veterinary Pathology*, *37*(6), 597–608.
- Ramos-Vara, J. A., & Miller, M. A. (2011). Immunohistochemical identification of canine melanocytic neoplasms with antibodies to melanocytic antigen PNL2 and tyrosinase: comparison with Melan A. *Veterinary Pathology*, *48*(2), 443–450.
- Rassnick, K. M., Ruslander, D. M., Cotter, S. M., Al-Sarraf, R., Bruyette, D. S., Gamblin, R. M., ... Moore, A. S. (2001). Use of carboplatin for treatment of dogs with malignant melanoma: 27 cases (1989-2000). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, *218*(9), 1444–1448.
- Rochaix, P., Lacroix-Triki, M., Lamant, L., Pichereaux, C., Valmary, S., Puente, E., ... Voigt, J.-J. (2003). PNL2, a New Monoclonal Antibody Directed against a Fixative-Resistant Melanocyte Antigen. *Modern Pathology*, *16*(5), 481–490.
- Roels, S. L., Van Daele, A. J., Van Marck, E. A., & Ducatelle, R. V. (2000). DNA ploidy and nuclear morphometric variables for the evaluation of melanocytic tumors in dogs and cats. *American Journal of Veterinary Research*, *61*(9), 1074–1079.
- Roels, S., Tilmant, K., & Ducatelle, R. (1999). PCNA and Ki67 proliferation markers as criteria for prediction of clinical behavior of melanocytic tumours in cats and dogs.

- Journal of Comparative Pathology*, 121(1), 13–24.
- Roels, S., Tilmant, K., & Ducatelle, R. (2001). p53 expression and apoptosis in melanomas of dogs and cats. *Research in Veterinary Science*, 70(1), 19–25.
- Rovesti, G. L., Guandalini, A., & Peiffer, R. (2001). Suspected latent vertebral metastasis of uveal melanoma in a dog: a case report. *Veterinary Ophthalmology*, 4(1), 75–77.
- Sánchez, J., Ramirez, G. A., Buendia, A. J., Vilafranca, M., Martinez, C. M., Altimira, J., & Navarro, J. A. (2007). Immunohistochemical Characterization and Evaluation of Prognostic Factors in Canine Oral Melanomas with Osteocartilaginous Differentiation. *Veterinary Pathology*, 44(5), 676–682.
- Schultheiss, P. C. (2006). Histologic features and clinical outcomes of melanomas of lip, haired skin, and nail bed locations of dogs. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 18(4), 422–425.
- Smedley, C., Lamoureux, J., Sledge, D. G., Kiupel, M., Smedley, C., Lamoureux, J., ... Kiupel, M. (2011). Immunohistochemical Diagnosis of Canine Oral Amelanotic Melanocytic Neoplasms. *Veterinary Pathology*, 48(1), 32–40.
- Smedley, C., Spangler, L., Esplin, G., Kitchell, E., Bergman, E., Ho, Y., ... Kiupel, M. (2011). Prognostic Markers for Canine Melanocytic Neoplasms. *Veterinary Pathology*, 48(1), 54–72.
- Smedley, R. (2012). Review of the Prognostic Evaluation of Canine Melanomas. *Veterinary Clinical Pathology*, 5–10.
- Smith, S. H., Goldschmidt, M. H., & McManus, P. M. (2002). A Comparative Review of Melanocytic Neoplasms. *Veterinary Pathology*, 39(6), 651–678.
- Spangler, W. L., & Kass, P. H. (2006). The Histologic and Epidemiologic Bases for Prognostic Considerations in Canine Melanocytic Neoplasia. *Veterinary Pathology*, 43(2), 136–149.
- Spugnini, E. P., Dragonetti, E., Vincenzi, B., Onori, N., Citro, G., & Baldi, A. (2006). Pulse-mediated chemotherapy enhances local control and survival in a spontaneous canine model of primary mucosal melanoma. *Melanoma Research*, 16(1), 23–27.
- Tafra, L., Dale, P. S., Wanek, L. A., Ramming, K. P., & Morton, D. L. (1995). Resection and adjuvant immunotherapy for melanoma metastatic to the lung and thorax. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 110(1), 119–129.
- Teixeira, T. F., Gentile, L. B., da Silva, T. C., Menecier, G., Chaible, L. M., Cogliati, B., ... Dagli, M. L. Z. (2014). Cell proliferation and expression of connexins differ in melanotic

- and amelanotic canine oral melanomas. *Veterinary Research Communications*, 38(1), 29–38.
- Templeton, A. J., McNamara, M. G., Šeruga, B., Vera-Badillo, F. E., Aneja, P., Ocaña, A., ... Amir, E. (2014). Prognostic role of neutrophil-to-lymphocyte ratio in solid tumors: a systematic review and meta-analysis. *Journal of the National Cancer Institute*, 106(6), dju124.
- Todoroff, R. J., & Brodey, R. S. (1979). Oral and pharyngeal neoplasia in the dog: a retrospective survey of 361 cases. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 175(6), 567–571.
- Tuohy, J. L., Selmic, L. E., Worley, D. R., Ehrhart, N. P., & Withrow, S. J. (2014). Outcome following curative-intent surgery for oral melanoma in dogs: 70 cases (1998-2011). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 245(11), 1266–1273.
- Ulu, S., Bucak, A., Ulu, M. S., Ahsen, A., Duran, A., Yucedag, F., & Aycicek, A. (2014). Neutrophil–lymphocyte ratio as a new predictive and prognostic factor at the hearing loss of diabetic patients. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*, 271(10), 2681–2686.
- Uthamalingam, S., Patvardhan, E. A., Subramanian, S., Ahmed, W., Martin, W., Daley, M., & Capodilupo, R. (2011). Utility of the Neutrophil to Lymphocyte Ratio in Predicting Long-Term Outcomes in Acute Decompensated Heart Failure. *The American Journal of Cardiology*, 107(3), 433–438.
- Verganti, S., Berlato, D., Blackwood, L., Amores-Fuster, I., Polton, G. A., Elders, R., ... Murphy, S. (2017). Use of Oncept melanoma vaccine in 69 canine oral malignant melanomas in the UK. *The Journal of Small Animal Practice*, 58(1), 10–16.
- Vermeulen, P. B., Gasparini, G., Fox, S. B., Toi, M., Martin, L., Mcculloch, P., ... Dirix, L. Y. (1996). Quantification of angiogenesis in solid human tumours: an international consensus on the methodology and criteria of evaluation. *European Journal of Cancer*, 32(14), 2474–2484.
- von Euler, H., Sadeghi, A., Carlsson, B., Rivera, P., Loskog, A., Segall, T., ... Tötterman, T. H. (2008). Efficient Adenovector CD40 Ligand Immunotherapy of Canine Malignant Melanoma. *Journal of Immunotherapy*, 31(4), 377–384.
- Wallace, J., Matthiesen, D. T., Patnaik, A. K., Matthiesen, T., & Patnaik, K. (1992). Hemimaxillectomy for the Treatment of Oral Tumors in 69 Dogs. *Veterinary Surgery*, 21(5), 337–341.

- Wang, D. (2006). PROSTAGLANDINS AND CANCER. *Gut*, 55(1), 115–122.
- Watabe, A., Fukumoto, S., Komatsu, T., Endo, Y., & Kadosawa, T. (2011). Alterations of lymphocyte subpopulations in healthy dogs with aging and in dogs with cancer. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 142(3–4), 189–200.
- Weber, L. W., Bowne, W. B., Wolchok, J. D., Srinivasan, R., Qin, J., Moroi, Y., ... Houghton, A. N. (1998). Tumor immunity and autoimmunity induced by immunization with homologous DNA. *Journal of Clinical Investigation*, 102(6), 1258–1264.
- Webster, J. D., Yuzbasiyan-Gurkan, V., Miller, R. A., Kaneene, J. B., & Kiupel, M. (2007). Cellular Proliferation in Canine Cutaneous Mast Cell Tumors: Associations with c-KIT and Its Role in Prognostication. *Veterinary Pathology*, 44(3), 298–308.
- Weinberg, R. (1995). The Molecular Basis of Oncogenes and Tumor Suppressor Genes. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 758(1 DNA), 331–338.
- Weiss, E., & Frese, K. (1974). Tumours of the skin. *Bulletin of the World Health Organization*, 50(1–2), 79–100.
- Wergin, M. C., & Kaser-Hotz, B. (2004). Plasma vascular endothelial growth factor (VEGF) measured in seventy dogs with spontaneously occurring tumours. *In Vivo (Athens, Greece)*, 18(1), 15–19.
- White, S., Jefferies, R., & Freedman, S. (1985). Clinical staging for oropharyngeal malignancies in the dog. *Journal of Small Animal Practice*, 26(10), 581–594.
- Williams, C. S., & DuBois, R. N. (1996). Prostaglandin endoperoxide synthase: why two isoforms? *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 270(3), G393–G400.
- Williams, L. E., & Packer, R. A. (2003). Association between lymph node size and metastasis in dogs with oral malignant melanoma: 100 cases (1987-2001). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 222(9), 1234–1236.
- Withrow, S., Vail, D., & Page, R. (2012). *Small Animal Oncology*. (D. Vail, Ed.) (5<sup>a</sup> Edição). St. Louis, Missouri: Elsevier Saunders.
- Wobeser, B. K., Kidney, B. A., Powers, B. E., Withrow, S. J., Mayer, M. N., Spinato, M. T., & Allen, A. L. (2007). Diagnoses and Clinical Outcomes Associated with Surgically Amputated Canine Digits Submitted to Multiple Veterinary Diagnostic Laboratories. *Veterinary Pathology*, 44(3), 355–361.
- Wynford-Thomas, D. (1997). Proliferative lifespan checkpoints: Cell-type specificity and influence on tumour biology. *European Journal of Cancer*, 33(5), 716–726.

- Yamada, N., Mori, T., Murakami, M., Noguchi, S., Sakai, H., Akao, Y., & Maruo, K. (2012). Fascin-1 expression in canine cutaneous and oral melanocytic tumours. *Veterinary and Comparative Oncology*, *10*(4), 303–311.
- Yoshida, K., Yanai, T., Iwasaki, T., Sakai, H., Ohta, J., Kati, S., ... Masegi, T. (1999). Proliferative Potential of Canine Oral Epulides and Malignant Neoplasms Assessed by Bromodeoxyuridine Labeling. *Veterinary Pathology*, *36*(1), 35–41.
- Zaragoza, J., Caille, A., Beneton, N., Bens, G., Christiann, F., Maillard, H., & Machet, L. (2016). High neutrophil to lymphocyte ratio measured before starting ipilimumab treatment is associated with reduced overall survival in patients with melanoma. *The British Journal of Dermatology*, *174*(1), 146–151.