

SIRLEY ADRIANA ORTIZ BEDOYA

**ESTUDO RETROSPECTIVO DE NEOPLASIAS MELANOCÍTICAS
CUTÂNEAS ESPONTÂNEAS EM CÃES: CARACTERIZAÇÃO
HISTOPATOLÓGICA, MORFOMÉTRICA E SEQUENCIAMENTO DE TP53**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS- BRASIL
2019

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

O77e
2019

Ortiz Bedoya, Sirley Adriana, 1986-

Estudo retrospectivo de neoplasias melanocíticas cutâneas espontâneas em cães : caracterização histopatológica, morfométrica e sequenciamento de TP53 / Sirley Adriana Ortiz Bedoya. – Viçosa, MG, 2019.

x, 82 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador: Marlene Isabel Vargas Vilorio.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Cães - Doenças. 2. Melanoma. 3. Cães. 4. Morfometria. 5. Tumores. 6. Sequenciamento de nucleotídeo. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Veterinária. Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária. II. Título.

CDD 22. ed. 636.70896994

SIRLEY ADRIANA ORTIZ BEDOYA

**ESTUDO RETROSPECTIVO DE NEOPLASIAS MELANOCÍTIAS
CUTÂNEAS ESPONTÂNEAS EM CÃES: CARACTERIZAÇÃO
HISTOPATOLÓGICA, MORFOMÉTRICA E SEQUENCIAMENTO DE TP53**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 29 de julho de 2019.



Gabriel Domingos Carvalho



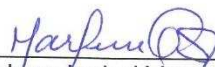
Aécio Carlos de Oliveira



Lissandro Gonçalves Conceição
(Coorientador)



Fabrícia Hallack Loures
(Coorientadora)



Marlene Isabel Vargas Vitoria
(Orientadora)

Á meu maior exemplo, minha mãe
Á meu irmão, Andrés Felipe
Aos meu meninos, Tommy Lee e Alexandre Magno

AGRADECIMENTOS

À minha mãe e meu irmão pelo apoio incondicional e as palavras certas nos momentos de maior escuridão. Muito obrigada pela paz que me deram, mesmo estando a milhares de quilômetros. Sem vocês não teria conseguido.

Aos meus meninos, Tommy Lee e Alexandre Magno por me acompanhar e aguentar no meu dia a dia.

À Universidade Federal de Viçosa, especialmente ao Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária do Departamento de Veterinária (DVT/UFV), pela oportunidade de realizar o doutorado em Medicina Veterinária.

À coordenação do Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Viçosa (UFV), na pessoa do Prof. Abelardo Silva Júnior, pelo apoio econômico para o desenvolvimento desta pesquisa.

Ao professor Lissandro Gonçalves conceição, do Departamento de Medicina Veterinária da UFV, pela orientação, dedicação e ensinamentos que contribuíram positivamente para o desenvolvimento desta pesquisa, mas principalmente no meu crescimento profissional e pessoal. Muito agradecida por ter me ajudado a encontrar meu caminho, minha admiração e gratidão será eterna.

À professora Marlene Isabel Vargas Vilória, do Departamento de Medicina Veterinária da UFV, pela oportunidade de realizar o doutorado.

À professora Simone Elisa Facione Guimarães, do Departamento de Zootecnia da UFV, pela orientação, ensinamentos, apoio financeiro, e a paciência, que foram cruciais para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao professor Fabricio Luciani Valente, do Departamento de Medicina Veterinária da UFV, pela amizade, disponibilidade e a valiosa ajuda nesta pesquisa.

À Dra. Fabricia Hallack, pelos casos cedidos para o desenvolvimento do estudo e sua ajuda na avaliação histopatológica neoplasias melanocíticas cutâneas. Agradeço imensamente a orientação, paciência e suporte oferecido durante todos estes anos.

À professora Reggiani Vilela Gonçalves e Mariáurea Matias Sarandy, do Departamento de Biologia Animal da UFV, pela orientação na realização da análise morfométrica das neoplasias melanocíticas cutâneas.

A Jose do Carmo, pela amizade e ajuda na avaliação histopatológica das neoplasias melanocíticas cutâneas em cães.

Ao professor Clairton Marcolongo, do Departamento de Veterinária da UNESC/ES, pela ajuda na avaliação histopatológica das neoplasias melanocíticas cutâneas em cães.

A Jurandy Penitente, pelo suporte dado com a análise estatística. Muito obrigada pelo carinho, apoio e paciência durante todos estes meses.

Ao Laboratório de Histopatologia do departamento de Veterinária, o Laboratório de Biotecnologia Animal do Departamento da Zootecnia (LABTEC/DZO), e o Laboratório de Patologia Experimental do Departamento de Biologia Animal da UFV que permitiram a utilização de suas instalações, aparelhos e capital humano, contribuindo na realização de fase experimental.

Ao laboratório ACTGene Análises Moleculares pelos serviços prestados na preparo, quantificação e sequenciamento do gene TP53.

À Rosi, secretaria da Pós-Graduação do DVT, pela dedicação incondicional, e ajuda no momento certo.

Aos funcionários Adão Cardoso e Cláudio Veridiano, do Laboratório de Histopatologia do Departamento de Veterinária (DVT) da UFV, pela amizade e auxílio no processamento do material histológico.

A minha amiga Jessica Miranda Cota, pela amizade sincera, alegre e descontraída. Agradeço muito pela ajuda durante a fase experimental do projeto e durante minha estadia no Brasil. MUITÍSSIMO obrigada por todas as vivências neste tempo de amizade.

A Leda Castaño Barrios, pela amizade que entende, compreende e aceita as diferenças. Mesmo que não pareça, você é muito importante para mim.

A Daiana Quirino, pela amizade e valiosa ajuda durante a fase experimental do projeto.

Aos meus amigos que me acompanharam nesta caminhada, em especial a família Echavarría Londoño, Família Aguiar Albino, família Carrascal Gatti, Antônio, Andrés Mauricio Ortega, Camilo Ramirez.

A todos aqueles que me ajudaram, direta ou indiretamente, para a conclusão deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
INTRODUÇÃO GERAL	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	7
CAPÍTULO 1	13
AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA E MORFOMÉTRICA EM NEOPLASIAS MELANOCÍTICAS CUTÂNEAS ESPONTÂNEAS EM CANINOS	13
RESUMO	14
ABSTRACT	15
INTRODUÇÃO	16
MATERIAL E MÉTODOS	17
Comitê de Ética	17
Amostragem	17
Avaliação histopatológica	19
Análises morfológicas	23
Análises estatísticas	24
RESULTADOS	25
DISCUSSÃO	39
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45
CAPÍTULO 2	49
IDENTIFICAÇÃO DE MUTAÇÕES DO GENE TP53 DOS EXONS 5 AO 8 EM NEOPLASIAS MELANOCÍTICAS CUTÂNEAS ESPONTÂNEAS EM CÃES	49
RESUMO	50
ABSTRACT	50
INTRODUÇÃO	50
MATERIAL E MÉTODOS	52
RESULTADOS	54
DISCUSSÃO	57
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
CONCLUSÕES GERAIS	64
ANEXOS	65

RESUMO

ORTIZ-BEDOYA, Sirley Adriana, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2019. **Estudo retrospectivo de neoplasias melanocíticas cutâneas espontâneas em cães: caracterização histopatológica, morfométrica e sequenciamento de tp53.** Orientador: Marlene Isabel Vargas Vilória. Coorientadores: Lissandro Gonçalves Conceição, Simone Eliza Facioni Guimaraes, Fabricia Hallack Loures e Joaquin Hernan Patarroyo Salcedo.

Cães são susceptíveis à tumores melanocíticos e a sobrevida de cães com melanoma geralmente é pequena devido ao prognóstico desfavorável. Pesquisas que auxiliem no discernimento do comportamento biológico e fatores prognósticos desta neoplasia na espécie canina permitirão estabelecer um diagnóstico e prognóstico mais precisos. Neste trabalho foram realizados dois experimentos. O primeiro teve como objetivo a caracterização histopatológica e morfométrica de neoplasias melanocíticas cutâneas espontâneas em caninos. O segundo objetivou o sequenciamento do gene tp53 em 25 neoplasias melanocíticas. Em ambos experimentos, os casos foram resgatados do arquivo de biopsias do laboratório de histopatologia da Universidade Federal de Viçosa e do laboratório PROVET. No experimento I, de cada caso, registrou-se raça, sexo, idade, tamanho e localização das lesões. Os casos foram avaliados por dois patologistas em lâminas histológicas coradas com hematoxilina e eosina e/ou despigmentadas para comprovação do diagnóstico e caracterização histopatológica: pigmentação, presença ou ausência do infiltrado pagetoide, atividade juncional e ulceração. O índice mitótico foi determinado e registrado para cada tumor. Determinou-se a proporção celular e tipo celular, infiltrado linfocitário, vasos sanguíneos e necrose. O pleomorfismo nuclear foi avaliado em uma escala de 1 a 3, por 3 patologistas distintos, os quais não compartilharam entre si seus diagnósticos e as interpretações, sendo os casos classificados mediante uma concordância dos três diagnósticos. A área e diâmetros dos núcleos de células epitelioides, fusiformes e eritrócitos foram mesurados. No experimento II, 25 neoplasias melanocíticas cutâneas caninas, fixadas em formol tamponado e embebidos em parafina, foram utilizadas para detecção de mutações do gene tp53 nos exons 5 ao 8. No experimento I, os melanomas apresentam maior tamanho quando comparados aos melanocitomas. Microscopicamente, os melanocitomas foram mais pigmentados quando

comparados aos melanomas. A presença de infiltrado pagetoide esteve ausente na maioria tumores melanocíticos estudados e a atividade juncional foi observada nos melanomas e melanocitomas com frequências similares. A ulceração esteve ausente na maioria dos melanocitomas mas foi frequente nos melanomas. A maioria das lesões melanocíticas apresentaram 3 subtipos celulares: redondas, epitelioides e fusiformes. Com relação à atipia/pleomorfismo, os melanocitomas apresentaram grau discreto, enquanto os melanomas mostraram graus variando de discreto a intenso, com aumento gradual do índice mitótico à medida que o pleomorfismo aumento. Além disso, houve diferença significativa para o tamanho nuclear entre os graus de atipia/pleomorfismo dos tumores estudados. O infiltrado linfocitário foi observado com maior intensidade nos melanomas, principalmente nos melanomas classificados no grau 2. A proporção de necrose não diferiu entre melanocitomas e melanomas, porém quando considerado o grau de atipia/pleomorfismo os melanomas de grau 3 apresentaram maior porcentagem. No experimento II, todas as neoplasias melanocíticas apresentaram inserção de três bases (TAC) no éxon 5, e mutações em íntrons. Em conclusão, a avaliação da atipia/pleomorfismo em células epitelioides é um procedimento eficiente, visto que estas células representam uma grande proporção nos tumores melanocíticos e são mais fáceis de avaliar que os núcleos das células fusiformes. A escala de atipia/pleomorfismo é uma ferramenta útil que pode ser facilmente aplicada na rotina de diagnóstico de tumores melanocíticos e contribuiria na avaliação unificada entre patologistas, Entretanto, são necessários mais estudos para se avaliar a aplicação desta ferramenta com o prognóstico clínico. As mutações encontradas nas regiões avaliadas do gene tp53 aparentemente não foram relevantes para definir o diagnóstico nos tumores melanocíticos deste estudo.

ABSTRACT

ORTIZ-BEDOYA, Sirley Adriana, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2019. **Retrospective study of spontaneous cutaneous melanocytic neoplasms in dogs: histopathology, morphometry and tp53 sequencing.** Adviser: Marlene Isabel Vargas Vilória. Co-advisers: Lissandro Gonçalves Conceição, Simone Eliza Facioni Guimaraes, Fabricia Hallack Loures and Joaquin Hernan Patarroyo Salcedo.

Dogs are susceptible to melanocytic tumors and the survival of dogs with melanoma is generally small due to unfavorable prognosis. Research that helps in the discernment of the biological behavior and prognostic factors of this neoplasm in the canine species will allow establishing a more accurate diagnosis and prognosis. In this work two experiments were performed. The first one aimed at the histopathological and morphometric characterization of spontaneous cutaneous melanocytic neoplasm in canines. The second aimed at sequencing the tp53 gene in 25 melanocytic neoplasm. In both experiments, the cases were recovered from the biopsy file of the histopathology laboratories of the Federal University of Viçosa and the PROVET. In the experiment I, we recorded data of breed, sex and age of the animals, and size and location of tumors. Two pathologists evaluated the histological slides stained with hematoxylin and eosin and/or bleached to confirm the diagnosis and histopathological characterization: pigmentation, presence or absence of the pagetoid infiltrate, junctional activity, and ulceration. Mitotic index was determined and recorded for each tumor. The proportion of total cellularity, cell type, lymphocytic infiltrate, blood vessels and necrosis was determined. Nuclear pleomorphism was evaluated on a scale of 1 to 3 by 3 different pathologists, who did not share their diagnoses and interpretations, and the cases were classified according to the agreement of the three diagnoses. The area and diameters of epithelioid cells, spindle cells and erythrocyte nuclei were measured. In Experiment II, 25 canine cutaneous melanocytic neoplasms, fixed in buffered formalin and embedded in paraffin, were included in the study to detect mutations of the tp53 gene in exons 5 to 8. In Experiment I, Melanomas were larger than melanocytomas. Microscopically, melanocytomas were more pigmented compared to melanomas. The presence of pagetoid infiltrate was observed in both types of neoplasms and the junctional activity was observed in melanomas and melanocytomas with similar

frequencies. Ulceration was absent in most melanocytomas but was frequent in melanomas. The majority of the melanocytic lesions presented 3 cellular subtypes: rounded, epithelioid and spindle. Regarding the atypia/pleomorphism, melanocytomas presented a discrete degree, whereas the melanomas showed degrees from discrete to intense, with gradual increase of the mitotic index as the differentiation decreased. Furthermore, there was a significant difference for nuclear size between the degrees of atypia/pleomorphism of the tumors studied. Lymphocyte infiltrate was observed with greater intensity in melanomas, especially in grade 2 melanomas. The proportion of necrosis did not differ between melanocytomas and melanomas, but when the degree of atypia/pleomorphism was considered, grade 3 melanomas had a higher percentage. In experiment II, all melanocytic neoplasms presented three base insertion (CT) at exon 5, and mutations in introns. In conclusion, the evaluation of atypia / pleomorphism in epithelioid cells is an efficient procedure, since these cells represent a large proportion in melanocytic tumors and are easier to evaluate than spindle cell nuclei. The atypia/ pleomorphism scale may be a useful tool to be easily applied in the diagnosis of melanocytic tumors routine, and might contribute to the unified assessment among pathologists; nevertheless, further studies are needed to evaluate the application of this tool with clinical prognosis. melanocytic tumors of this study. Mutations found in the evaluated regions of the tp53 gene apparently were not relevant to define the diagnosis in the melanocytic tumors of this study.

INTRODUÇÃO GERAL

Na Medicina Veterinária, os tumores melanocíticos de comportamento biológico benigno são denominados como melanocitomas e aqueles com comportamento maligno são chamados de melanoma (WHO, 1998), e esta será a forma de referirmos a cada tumor neste estudo. O termo “neoplasias melanocíticas” será usado para referenciar ambos os tipos de tumor, assim mesmo nos casos que não seja possível determinar o comportamento biológico através de avaliação da histopatologia, ditas neoplasias serão classificadas como “tumores de comportamento biológico indeterminado”. Melanocitomas e melanomas são considerados frequentes em cães e o melanoma é responsável por aproximadamente 7% das neoplasias malignas que acometem esta espécie (Garma- -Aviña et al., 1981; Goldschmidt, 1994, Smith et al., 2002). Goldschmidt e Shofer, (1992) relataram que 95% dos tumores melanocíticos cutâneos apresentam comportamento benigno. No entanto, o comportamento biológico de um tumor maligno individual não pode ser predito com precisão por qualquer característica histológica específica (Schultheiss, 2006).

Pouco se sabe sobre o início das neoplasias melanocíticas nos animais, mas a exposição à radiação solar não parece estar relacionada (Smith et al., 2002; Hernandez et al., 2018). Em cães, algumas raças apresentam alto risco, sugerindo um histórico genético específico (Segaoula et al., 2018). Outros fatores, como trauma crônico, exposição a agentes químicos e hormônios, ou mesmo a microbiota bucal e a inflamação podem estar associados à etiologia desses tumores (Modiano et al., 1999; Ramos-Vara et al., 2000; Dzutsev et al., 2015).

Atualmente, existem dificuldades na compreensão da base genética e molecular de todos os subtipos de melanoma (Hernandez et al., 2018). Em humanos, a alteração dos genes envolvidos na regulação do ciclo celular ou reparo de DNA, como a ciclina CDKN2A, p16INK4A e PTEN, são conhecidas como elementos importantes na patogênese tumoral (Koening et al., 2002).

Vários oncogenes como *Braf*, *Nras*, *Gna11*, *Gnaq*, *Mitf* e *tp53*, estão ligados à melanomagênese. Mutações nestes genes são descritas em melanoma cutâneo humano (BRAF, NRAS), melanoma mucoso (NRAS), nevos azuis e melanomas uveais (GNAQ, GNA11) e em numerosos tipos de câncer (*tp53*).

(Gillar et al., 2014; Hernandez et al., 2018; Segoula, et al., 2018). Ainda, a presença de c-MYC, c-erb B-2 e c-kit também tem sido relacionada com a progressão da neoplasia (Smith et al., 2002; Hernandez et al., 2018).

O gene tp53 codifica uma proteína nuclear (P53 ou TP53) que é essencial para a manutenção da integridade do DNA e é considerada como um dos fatores supressores de tumor mais importantes (Koenig et al., 2002; Oliveira et al., 2017). Câncer de mama, carcinoma de ovários, sarcomas dos ossos e tecidos moles, tumores cerebrais e carcinomas adrenocorticais são frequentemente associados a mutações e polimorfismo deste gene (Wang et al., 2004, Petitjean et al., 2007). Outros tipos de câncer menos frequentes incluem leucemia, câncer de estômago, câncer colorretal e de esôfago (Petitjean et al., 2007; Wang et al., 2010).

Em cães, existem alguns estudos realizados em tumores mamários, que demonstraram expressão diminuída e heterogênea com acúmulo da proteína no citoplasma, e mutações do tp53 localizadas nos exons 4 ao 8 (Koenig et al., 2002; Souza et al., 2012; Oliveira et al., 2017). Segoula et al. (2018) relataram a deleção da região que contém o gene tp53 em melanomas de mucosa em esta espécie.

A incidência de neoplasias melanocíticas aumenta com a idade (Dorn, 1976). Nos cães, o melanoma ocorre em média aos 10 anos, mas com variação entre um e 17 anos (Aronsohn et al., 1990). Entretanto, já foi relatado na literatura um melanoma cutâneo congênito, num cão sem raça definida, com progressão rápida para metástases e morte (Meyrer et al., 2016). Esta neoplasia não apresenta predisposição sexual (Smith et al., 2002), mas vários autores descreveram maior na frequência em cães machos (Dorn, 1976; Todoroff e Brodey, 1979; Goldschmidt, 1994).

Neoplasias melanocíticas são mais frequentes em raças com marcada pigmentação cutânea, como Schnauzer ou Scottish Terrier (Goldschmidt e Shofer, 1992). Camargo et al. (2008) avaliaram 68 casos de neoplasias melanocíticas em caninos no Brasil. Estes autores observaram que os melanomas cutâneos (19 casos) foram mais frequentes nos cães sem raça definida, seguidos por aqueles das raças Rottweiler, Pinscher, Cocker Spaniel e Airedale.

Os melanocitomas são comuns na região da cabeça, tronco, escroto, axila, membros e dígitos (Garma-Aviña et al., 1981; Camargo et al., 2008),

enquanto que os melanomas cutâneos são encontrados com mais frequência na cabeça, abdômen ventral e escroto (Goldschmidt, 1994).

Os melanocitomas podem ter aspecto de manchas pequenas até nódulos de 5 cm de diâmetro, geralmente pigmentados, de coloração preta ou amarronzada (Conceição e Loures, 2016). Segundo Smith et al. (2002) o melanoma pode variar consideravelmente em aparência independentemente do local, pode ser de qualquer cor, desde cinza ou marrom para preto, vermelho ou mesmo azul escuro. A pigmentação não é uma característica específica porque outras lesões neoplásicas ou não neoplásicas podem ser fenotipicamente similares. Varia em tamanho, mas a maioria apresenta de 1 a 3 cm.

O melanoma cutâneo pode ter aparência de cúpulas lisas, nódulos sésseis, polipoides, placa, ou até mesmo massas lobuladas; as de maior tamanho frequentemente são de pior prognóstico (Smith et al., 2002). Geralmente são ulcerados e com frequência são encontrados como tumores únicos (Garma-Aviña et al., 1981), mas tem sido observado que alguns animais podem apresentar lesões múltiplas e multicêntricas (Bostock, 1979).

Os melanomas produzem metástase via vasos sanguíneos ou linfáticos, qualquer um dos órgãos viscerais pode ser infiltrado, mas os pulmões são comumente os mais afetados (Smith et al., 2002; kim et al., 2009), sendo os gânglios linfáticos uns dos primeiros locais de metástase (Bobek et al. 2010). Outros locais de metástase são o sistema nervoso central (Garma-aviña et al., 1981; Kim et al., 2009), hipófise (Garma-Aviña et al., 1981) e em casos raros em ovários (Michael, 1948).

A caracterização das neoplasias melanocíticas é baseada em critérios histológicos como: atipia nuclear, índice mitótico, grau de pigmentação, atividade juncional, células neoplásicas intraepiteliais, nível de infiltração/invasão, presença de necrose e inflamação (Spangler e Kass, 2006; Smedley et al., 2011). É recomendado que mais de um parâmetro seja considerado para classificar as neoplasias melanocíticas como melanoma ou melanocitoma (Spangler e Kass, 2006; Sánchez et al, 2007; Smedley et al., 2011).

A atipia nuclear é considerada um parâmetro significativo para avaliar o comportamento biológico em neoplasias melanocíticas, sendo que uma atipia marcada é associada a um prognóstico desfavorável, sem importar a localização. Esta característica é útil para avaliar a atipia em tumores com

predomínio de células epitelióides do que naqueles com tipo celular fusiforme, devido a detalhes nucleares escassos (Millanta et al., 2002; Spangler e Kass, 2006; Campagne et al., 2013). A avaliação histopatológica é difícil de realizar objetivamente, e os estudos nem sempre são consensuais (Roels e Tilmant, 1999; Millanta et al., 2002; Schultheiss, 2006). Segundo Spangler e Kass (2006), o grau de atipia nuclear deve ser avaliado com base nos seguintes critérios:

Células neoplásicas bem diferenciadas ou típicas

- Núcleos pequenos.
- Um único nucléolo que se encontra orientado centralmente.
- Mínima aglomeração de cromatina.
- Condensação da cromatina ao longo da superfície interna da membrana.
- Células sem núcleo e eventualmente cromatina dispersa cromatina na periferia do núcleo.
- Pode ter presença de cromatina nuclear condensada que se estende do nucléolo para a membrana nuclear.

Células neoplásicas pouco diferenciadas (atípico)

- Presença de vários nucléolos.
- Nucléolo de maior de forma menos regular que estão localizados excentricamente no núcleo.
- Em alguns casos, vários nucléolos estão ligados na superfície interna da membrana nuclear por finos fios de cromatina, que dão aparência de um núcleo grosseiramente vacuolizado.

O índice mitótico é considerado um fator prognóstico útil para neoplasias melanocíticas tanto da pele como da cavidade oral, embora não parece ser tão útil como atipia nuclear ou índice de proliferação celular Ki67 (Spangler e Kass, 2006; Smedley et al., 2011). É recomendada que seja avaliada em conjunto com a atipia nuclear para obter um diagnóstico histológico mais preciso (Spangler e Kass, 2006). Este fator deve ser determinado pela contagem do número de figuras de mitose em 10 campos consecutivos, começando na área de maior atividade mitótica para neoplasias orais e dos lábios e em campos aleatórios

para neoplasias cutâneas (Smedley et al., 2011); deve ser relatado como o número de mitoses por 10 campos, considerando que cães com um índice mitótico ≥ 3 em melanoma cutâneo e ≥ 4 em melanoma oral e de lábios terão uma expectativa de vida menor (Bergin et al., 2011).

Existem diferentes graus de pigmentação e em alguns casos ausência total desta característica (Sandusky et al., 1985; Ramos-Vara et al., 2000; Sulaimon et al., 2002), razão pela qual o diagnóstico nos melanomas amelanocíticos torna-se difícil, pois a falta de pigmentação pode induzir um diagnóstico errôneo, já que podem imitar outras neoplasias (Ramos-Vara et al., 2000; Smith et al., 2002; Ohsie et al., 2008). Também é importante considerar que cortes histológicos de neoplasias melanocíticas, especialmente melanocitomas, com marcada pigmentação podem dificultar ou impedir a avaliação adequada da morfologia celular e figuras mitóticas, sendo recomendada a remoção da melanina (Conceição e Loures, 2016).

A ulceração é definida como a ausência de uma epiderme intacta que recobre a maior parte do melanoma primário, que não é artefato ou secundária a trauma (Balch et al., 2001). A presença desta representa um fenótipo de tumor mais agressivo, com maior probabilidade de metástase e prognóstico desfavorável (Dickson e Gershenwald, 2011).

O infiltrado pagetoide refere-se à presença de melanócitos isolados ou em grupos nas camadas superiores à basal da epiderme. Apesar de ser vista como uma característica presente nos melanomas, pode também ser vista em algumas lesões melanocíticas benignas (Haupt e Stern, 1995; Petronic-rosic et al., 2004). A presença desta característica deve alertar o patologista sobre a possibilidade de um tumor com comportamento biológico maligno, mas não requer necessariamente uma interpretação maligna, já que o diagnóstico final requer avaliação de todos os achados histológicos e clínicos (Stern e Haupt, 1998).

A atividade juncional refere-se à proliferação de melanócitos neoplásicos na interface da epiderme com a derme (Golschmidt et al., 1994). A presença ou ausência de atividade juncional não é específica para melanoma e frequentemente ocorre em melanocitomas (Smith et al., 2002), não obstante, os melanomas cutâneos mostram frequentemente uma atividade juncional marcada (Goldschmidt e Hendrick, 2002).

A expressão de Melan-A / MART-1, S-100, vimentina e HMB-45 tem sido usada no diagnóstico de neoplasias melanocíticas, mas o seu valor como marcadores prognósticos é bastante limitado. O índice de proliferação celular Ki67 é especialmente útil para os casos com parâmetros histológicos conflitantes, e é um teste altamente objetivo que tem valor preditivo superior a de critérios histológicos (Smedley et al., 2011). O índice de Ki67 deve ser reportado como uma porcentagem de núcleos marcados positivamente por 500 células. Neoplasias com um índice de Ki67 $\geq 15\%$ apresentam um prognóstico desfavorável, e neoplasias com um índice de Ki67 $<15\%$ um prognóstico positivo, e estes valores correlacionam-se positivamente com o índice mitótico ≥ 3 e <3 em 10 campos na objetiva de 40X, respectivamente (Smedley et al., 2011; Meuten, 2017).

A localização também é um fator prognóstico para estas neoplasias (Ramos- Vara et al., 2002; Smith et al., 2002). Considera-se que os melanomas orais caninos são indiscutivelmente malignos, carregando um prognóstico de regular a pobre (Bostock, 1979). No caso das neoplasias melanocíticas cutâneas, os tumores digitais são considerados como os de pior prognóstico do que em outras localizações na pele (Smedley et al., 2011). Da mesma forma, a presença de metástases são indicativas de mau prognóstico para todas as neoplasias melanocíticas independentemente da sua localização (Smedley et al., 2011). Cães acometidos com melanoma podem desenvolver metástases até em 80% dos casos (Todoroff e Brodey, 1979).

Grau de pigmentação, intensidade da proliferação de antígeno nuclear celular (PCNA), presença de necrose, ulceração ou inflamação, e expressão da proteína tp53 apresentam baixo valor prognóstico em animais. A profundidade da invasão do tumor na pele é um critério importante na medicina humana, mas impraticável em animais (Smith et al., 2002).

Apesar da alta frequência das neoplasias melanocíticas no Brasil (Felizzola et al., 1999; Camargo et al., 2008; Teixeira et al., 2010), ainda existem poucos trabalhos correlacionando os achados histopatológicos como a atipia/pleomorfismo e seu comportamento biológico (Spangler e Kass, 2006; Bergin et al. 2011). A dificuldade na avaliação de critérios histopatológicos e de parâmetros morfológicos como indicadores prognósticos radica na subjetividade, experiência e treinamento do patologista no momento do diagnóstico, devido a

isto a comparação entre estudos é difícil. Assim, a avaliação morfométrica, ainda que laboriosa, pode ser uma ferramenta útil aos patologistas na caracterização e avaliação do comportamento biológico dos tumores melanocíticos.

Adicionalmente, vários oncogenes como PTEN, TP53, Rb, p21, *Braf*, *Nras*, *Gna11*, *Gnaq* e *Mitf* têm sido relatados como importantes para a progressão das neoplasias melanocíticas, mas poucos trabalhos foram encontrados na literatura caracterizando os tipos de alteração genética presentes no gene Tp53 em melanomas e melanocitomas em cães.

Deste modo, este trabalho tem como objetivo a avaliação histopatológica, morfométrica e sequenciamento do gene tp53 em neoplasias melanocíticas cutâneas espontâneas em caninos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARONSOHN, M.G.; CARPENTER, J.L. Distal extremity melanocytic nevi and malignant melanomas in dogs. *Journal of American Animal Hospital Association*, v.26, n.6, p.605-612, 1990.
- BALCH, C.M.; BUZAID, A.C.; SOONG, S.J.; ATKINS, M.B.; CASCINELLI, N.; COIT, D.G.; FLEMING, I.D.; GERSHENWALD, J.E.; HOUGHTON, A.J.R.; KIRKWOOD, J.M.; MCMASTERS, K.M.; MIHM, M.F.; MORTON, D.L.; REINTGEN, D.S.; ROSS, M.I.; SOBER, A.; THOMPSON, J.A.; THOMPSON, J.F. Final version of the American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma. *Journal of Clinical Oncology*, v.19, n.16, p.3635-3648, 2001.
- BERGIN, I.L.; SMEDLEY, R.C.; ESPLIN, D.G.; SPANGLER, W.L.; KIUPEL, M. Prognostic Evaluation of Ki67 Threshold Value in Canine Oral Melanoma. *Veterinary Pathology*, v.48, n.1, p.48-41, 2011.
- BOBEK, V.; KOLOSTOVA, K.; PINTEROVA, D.; KACPRZAK, G.; ADAMIAK, J.; KOLODZIEJ, J.; BOUBELIK, M.; KUBECOVA, M.; HOFFMAN, R.M. A Clinically Relevant, Syngeneic Model of Spontaneous, Highly Metastatic B16 Mouse Melanoma. *Anticancer research*, v.30, n.12, p.4799-4803, 2010.
- BOSTOCK, D.E. Prognosis after surgical excision of canine melanomas. *Veterinary Pathology*, v.16, n.1, p. 32-40, 1979.

CAMARGO, L.P.; CONCEIÇÃO, L.G.; COSTA, P.R.S. Neoplasias melanocíticas cutâneas em cães: estudo retrospectivo de 68 casos (1996-2004). *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v.45, n.2, p.138-152, 2008.

CAMARGO, L.P.; CONCEIÇÃO, L.G.; COSTA, P.R.S. Neoplasias melanocíticas cutâneas em cães: estudo retrospectivo de 58 casos (1996-2004). *Brazilian Journal of Veterinary, Research and Animal Science*, v.45, n.2, p.138-152, 2008.

CAMPAGNE, C.; JULÉ, S.; ALLEAUME, C.; BERNEX, F.; EZAGAL, J.; CHÂTEAU-JOUBERT, S.; ESTRADA, M.; AUBIN-HOUZELSTEIN, G.; PANTHIER, J.J.; EGIDY, G. Canine melanoma diagnosis: RACK1 as a potential biological marker. *Veterinary Pathology*, v.50, n.6, p.1083-90, 2013.

CONCEIÇÃO, L.G.; F.H. LOURES. Sistema tegumentar. In: SANTOS, R.L.; ALESSI, A.C. *Patologia Veterinária*. 2. Ed. Rio de Janeiro: Roca, 2016. p. 407-486.

DICKSON, P.V.; GERSHENWALD, J. Staging and Prognosis of Cutaneous 1237 Melanoma. *Surgical Oncology Clinics of North America*, v.20, n.1, p.1–17, 1238 2011.

DORN, C. R. Epidemiology of canine and feline tumors. *Journal of the American Animal Hospital Association*, v.12, p.307-312, 1976.

DZUTSEV, A.; GOLDSZMID R.S.; VIAUD, S.; ZITVOGEL, L.; TRINCHIERI, G. The role of the microbiota in inflammation, carcinogenesis, and cancer therapy. *European Journal of Immunology*, v.45, n.1, p.17-31, 2015.

FELIZZOLA, C.R.; STOPIGLIA, A.J.; ARAÚJO, N.S. Oral tumors in dogs. Clinical aspects, exfoliative cytology and histopathology. *Ciência Rural*, Santa Maria 1999, v.29.n.3, p.499-506.

GARMA-AVIÑA, A.; VALLI, E.; LUMSDEN, J.H. Cutaneous melanoma in domestic animals. *Journal of cutaneous pathology*, v.8, n.1, p. 3-2 4, 1981.

GILLARD, M.; CADIEU, E.; DE BRITO, C.; ABADIE, J.; VERGIER, B.; DEVAUCHELLE, P. Naturally occurring melanomas in dogs as models for non-UV pathways of human melanomas. *Pigment Cell & Melanoma Research*, v.27, n.1, p.90–102, 2014.

GOLDSCHMIDT, M.H. Pigmented lesions of the skin. *Clinics in Dermatology*, v.12, p.507–514, 1994.

GOLDSCHMIDT, M.H.; SHOFER, F.S. *Skin Tumors of the Dog and Cat*. Oxford: Butterworth Heinemann, 1992. P. 142–151.

GOLDSCHMIDT, M.H.; HENDRICK, M.J. 2002. Tumors of the skin and soft tissues. In: MEUTEN D.J. Tumors in Domestic Animals. 4ed. Iowa State: Ames, 2002. p. 45-118.

HAUPT, H.M.; STERN, J.B. Pagetoid melanocytosis: histological features in benign and malignant lesions. American Journal of Pathology, v.19, n.7, 1278 p.792-7, 1995.

HERNANDEZ, B.; ADISSU, H.A.; WEI, B.R.; MICHAEL, H.T.; MERLINO, G.; SIMPSON, R.M. Naturally Occurring Canine Melanoma as a Predictive Comparative Oncology Model for Human Mucosal and Other Triple Wild-Type Melanomas. International Journal of Molecular Sciences, n. 19, v. 2, p. E394.

KIM, D.Y.; ROYAL, A.B.; VILLAMI, J.A. Disseminated Melanoma in a Dog with Involvement of Leptomeninges and Bone Marrow. Veterinary Pathology, v.46, n.1, p.80–83, 2009.

KOENIG, A.; BIANCO, S.; FOSMIRE, S.; WOJCIESZYN, J.; MODIANO, J. Expression and significance of p53, rb, p21/waf-1, p16/ink-4a, and PTEN tumor suppressors in canine melanoma. Veterinary Pathology, v.39, n.4, 1303 p.458-72, 2002.

MEUTEN, D.J. Tumours in domestic animal. 5 ed. Iowa:Wiley-Blackwell, 2017. P.945-947.

MEYRER, B.; BIANCHI, S.P.; PAVARINI, S.P.; GERARDI, D.G. Congenital cutaneous melanoma in a dog. Veterinary Dermatology, v.28, n.2, p.228-256, 2016.

MICHAEL, S.J. Melanosarcoma of the eye with metastasis to the kidney and ovaries. Journal of the American Veterinary Medical Association, v.113, n.858, p.253, 1948.

MILLANTA, F.; FRATINI, F.; CORAZZA, M.; CASTAGNARO, M.; ZAPPULLI, V.; POLI, A. Proliferation activity in oral and cutaneous canine melanocytic tumours: correlation with histological parameters, location, and clinical behavior. Research in Veterinary Science, v.73, n.1, p.45–51, 2002.

MODIANO, J.F.; RITT, M.G.; WOJCIESZYN, J. The molecular basis of canine melanoma: pathogenesis and trends in diagnosis and therapy. Journal of Veterinary internal Medicine, v.13, n.3, p.163–174, 1999.

OHSIE, S.J.; SARANTOPOULOS, G.P.; COCHRAN, A.J.; BINDER, S.W. Immunohistochemical characteristics of melanoma. *Journal of Cutaneous Pathology*, v.35, n.5, p.433- 444, 2008.

OLIVEIRA, T.F.; MAUÉS, T.; RAMUNDO, FIGUEIREDO, A.M.S.; DE MELLO, M.F.V.; EL-JAICK, K.B.; FERREIRA, M.L.G.; FERREIRA, A.M.R. TP53 gene expression levels and tumor aggressiveness in canine mammary carcinomas. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 29, n.6, p.865–868, 2017.

PETRONIC-ROSIC, V.; SHEA, C.R.; KRAUSZ, T. Pagetoid melanocytosis: when is it significant? *Pathology*, v.36, n.5, p.435-44, 2004.

PETITJEAN, A.; ACHATZ, M.I.W.; BORRESEN-DALE, A.L.; HAINAUT, P.; OLIVIER, M. TP53 mutations in human cancers: functional selection and impact on cancer prognosis and outcomes. *Oncogene*, v.26, p. 2157–2165, 2007.

RAMOS-VARA, J.A.; BEISSENHERZ, M.E.; MILLER, M.A.; JOHNSON, G.C.; PACE, L.W.; FARD, A.; KOTTLER, S.J. Retrospective Study of 338 Canine Oral Melanomas with Clinical, Histologic, and Immunohistochemical Review of 129 Cases. *Veterinary Pathology*, v.37, n.6, p.597-608, 2000.

ROELS, S.; TILMANT, K.R.D. PCNA and Ki67 proliferation markers as criteria for prediction of clinical behavior of melanocytic tumours in cats and dogs. *Journal of Comparative Pathology*, 121:13–24, 1999.

SÁNCHEZ, J; RAMIREZ, G.A; BUENDIA, A.J.; VILAFRANCA, M.; MARTINEZ, C.M.; ALTIMIRA; J; NAVARRO, J.A. Immunohistochemical Characterization and Evaluation of Prognostic Factors in Canine Oral Melanomas with Osteocartilaginous Differentiation. *Veterinary Pathology*, p.44, n.5, p. 676-682, 2007.

SANDUSKY, G.E.; CARLTON, W.W.; WIGHTMA, K.A. Immunohistochemical staining for S100 protein in the diagnosis of canine amelanotic melanoma. *Veterinary Pathology*, v.22, n. 6, p.577-581, 1985.

SCHULTHEISS, P.C. Histologic features and clinical outcomes of melanomas of lip, haired skin, and nail bed locations of dogs. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v.18, n.4, p.422–425, 2006.

SEGAOULA, Z.; PRIMOT, A.; LEPRETRE, F.; HEDAN, B.; BOUCHAERT, E.; MINIER, K.; MARESCAUX, L.; SERRES, F.; GALIÈGUE-ZOUITINA, S.; ANDRÉ, C.; QUESNEL, B.; THURU, X.; TIERNY D. Isolation and characterization of two

canine melanoma cell lines: new models for comparative oncology. *BMC Cancer*, v.18, n.1, 1219, 2018.

SMEDLEY, R.C.; SPANGLER, W.L.; ESPLIN, D.G.; KITCHELL, B.E. ; BERGMAN, P. J. ; HO, H.Y.; BERGIN, I.L.; KIUPEL, M. Prognostic Markers for Canine Melanocytic Neoplasms: A Comparative Review of the Literature and Goals for Future Investigation. *Veterinary Pathology*, v.48, n.1, p.48-54, 2011.

SMITH S.H.; GOLDSCHMIDT, M.H.; MCMANUS, P.M. A Comparative review of melanocytic neoplasms. *Veterinary Pathology*, v.39, n.6, p.651-678, 2002.

SOUZA, D.M.B.; BARROS, M.G.O.; SILVA, J.S.C.; SILVA, M.B.; COLETO, Z.F.; JIMENEZ, G.C.; ADRIÃO, M.; WISCHRAL, A. Detection of mutations within exons 4 to 8 of the p53 tumor suppressor gene in canine mammary glands. *Arq. Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.64, n.2, p.341-348, 2012.

SPANGLER, W. L.; KASS, D.P.H. The Histologic and Epidemiologic Bases for Prognostic Considerations in Canine Melanocytic Neoplasia. *Veterinary Pathology*, v.43, n.2, p.136–149, 2006.

SULAIMON, S.S.; KITCHELL, B.E.; EHRHART, E.J. Immunohistochemical detection of melanoma-specific antigens in spontaneous canine melanoma. *Journal of Comparative Pathology*, v.127, n.2-3, p.162-168, 2002

STERN, J.B.; HAUPT, H.M. Pagetoid melanocytosis: tease or tocsin? *Seminars in Diagnostic Pathology*, v.15, n.3; p.225-229, 1998.

TEIXEIRA, T.F.; SILVA, T.C.; CONGLIATI, B.; NAGAMINE, M.K.; DAGLI, M.L.Z. Retrospective study of melanocytic neoplasms in dogs and cats. *Brazilian Journal Veterinary Pathology*, v.3, n.2, p.100-104, 2010.

TODOROFF, R.J.; BRODEY, R.S. Oral and pharyngeal neoplasia in the dog: a retrospective survey of 361 cases. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v.175, n.6, p. 567-571, 1979.

WANG, B.; WANG, D.; ZHANG, D.; LI, A.; LIU, D.; LIU, H.; JIN, H. Pro variant of TP53 Arg72Pro contributes to esophageal squamous cell carcinoma risk: evidence from a meta-analysis. *European Journal of Cancer Prevention*, v.19, n. 4, p.299-307, 2010.

WANG, Y.; KRINGEN, P.; KRISTENSEN, G.B.; HOLM, R.; BAEKELANDT, M.M.; OLIVIER, M.; SKOMEDAL, H.; HAINAUT, P.; TROPÉ, C.G.; ABELER, V.M.; NESLAND, J.M.; BORRESEN-DALE, A.L.; HELLAND, A. Effect of the codon 72 polymorphism (c.215G>C, p.Arg72Pro) in combination with somatic sequence

variants in the TP53 gene on survival in patients with advanced ovarian carcinoma. *Human Mutation*, v. 4, p. 21–34, 2004.

WHO. *International Histological Classification of Epithelial and Melanocytic Tumors of the Skin of Domestic Animals*. *Bulletin of the World Health Organization*, v.3, p. 106, 1998.

CAPÍTULO 1

CARACTERIZAÇÃO HISTOPATOLÓGICA E MORFOMÉTRICA DE NEOPLASIAS MELANOCÍTICAS CUTÂNEAS ESPONTÂNEAS EM CÃES

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo a avaliação histopatológica e morfométrica em neoplasias melanocíticas cutâneas espontâneas em caninos. Os casos com prévio diagnóstico de tumores melanocíticos cutâneos foram resgatados do arquivo de lâminas do laboratório de histopatologia da Universidade Federal de Viçosa e do laboratório PROVET. De cada caso registrou-se a raça, sexo, idade, tamanho e localização. Os casos foram avaliados por dois patologistas para comprovação do diagnóstico e avaliação de critérios histopatológicos em lâminas histológicas coradas com hematoxilina e eosina e/ou despigmentadas. Determinou-se a proporção celular e tipo celular, infiltrado linfocitário, vasos sanguíneos e necrose. O pleomorfismo nuclear foi avaliado em uma escala de 1 a 3 por 3 patologistas, cada um sem o conhecimento sobre o diagnóstico e as interpretações dos outros patologistas, e os casos foram classificados segundo a concordância dos três especialistas. A área, os diâmetros maior e menor dos núcleos de células epitelioides, fusiformes e eritrócitos foram medidos. Os melanomas apresentam maior tamanho quando comparados aos melanocitomas. Microscopicamente, a maioria das lesões melanocíticas apresentaram 3 subtipos celulares: redondas, epitelioides e fusiformes. Com relação à atipia/pleomorfismo, os melanocitomas apresentaram grau discreto, enquanto os melanomas mostraram graus de discreto a intenso, com aumento gradual do índice mitótico à medida que a diferenciação diminuiu. Além disso, houve diferença significativa para o tamanho nuclear entre os graus de atipia/pleomorfismo dos tumores estudados. A escala de atipia/pleomorfismo é uma ferramenta útil que pode ser facilmente aplicada na rotina de diagnóstico veterinário e contribuiria na avaliação unificada entre patologistas, porém são necessários novos estudos para avaliar sua importância prognóstica no desfecho clínico.

Palavras-chave: melanoma, melanocitoma, parâmetros histológicos, prognóstico.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the histopathology and morphometry of spontaneous cutaneous melanocytic neoplasm in canines. The cases with previous diagnosis of cutaneous melanocytic tumors were recovered from the biopsy file of the histopathology laboratory of the Universidade Federal de Viçosa and laboratory PROVET. In each case, we recorded data of breed, sex and age of the animals, and size and location of tumors. Two pathologists evaluated the histological slides stained with hematoxylin and eosin and/or bleached to confirm the diagnosis. The proportion of total cellularity, cell type, lymphocytic infiltrate, blood vessels and necrosis was determined. Nuclear pleomorphism was assessed on a scale of 1 to 3 by 3 pathologists, each one without the knowledge about the diagnosis and the interpretations of the others, and the cases were classified according to the agreement among the three specialists. The area and diameters of epithelioid cells, spindle cells and erythrocyte nuclei were measured. Melanomas were larger than melanocytomas. Microscopically, the majority of the melanocytic lesions presented 3 cellular subtypes: rounded, epithelioid and spindle. Regarding the atypia/pleomorphism, melanocytomas presented a discrete degree, whereas the melanomas showed degrees from discrete to intense, with gradual increase of the mitotic index as the differentiation decreased. Furthermore, there was a significant difference for nuclear size between the degrees of atypia/pleomorphism of the tumors studied. The atypia/pleomorphism scale may be a useful tool to be easily applied in the veterinary diagnostic routine, and might contribute to the unified assessment among pathologists; nevertheless, further studies are necessary to evaluate its prognostic importance in the clinical outcome.

Keywords: melanoma, melanocytoma, histological parameters, prognosis.

INTRODUÇÃO

As neoplasias melanocíticas surgem da transformação maligna dos melanoblastos e melanócitos, que são células capazes de formar melanina e embriologicamente derivam do nervo neural (Andrade et al., 1976; Garma-Aviña et al., 1981; Goldschmidt e Hendrick, 2002; Smith et al., 2002; Schatton e Frank, 2008). As neoplasias melanocíticas têm sido relatadas em diversas espécies com ocorrência espontânea, mas os cães são considerados como o melhor modelo animal desta neoplasia (Nishiya et al., 2016).

Os cães são susceptíveis às neoplasias melanocíticas e a sobrevida dos pacientes com melanoma geralmente é pequena devido ao prognóstico desfavorável do tumor. Além disso, outros fatores contribuem para o prognóstico desfavorável, como o diagnóstico tardio, o alto grau de metástase, a pouca resposta ao tratamento quimioterápico, e as altas taxas de recidivas que ocorrem após cirurgia, principalmente nos casos de melanoma oral (Bolon et al., 1990; Koenig et al., 2002; Smith et al., 2002).

O exame histopatológico é fundamental para confirmar o diagnóstico, definir o prognóstico e programar o tratamento adequado de neoplasias melanocíticas de caninos. A caracterização dos tumores malignos primários baseia-se em critérios histológicos, em razão disto, existem sérias dificuldades para usar os parâmetros morfológicos como indicadores prognósticos (Bostock, 1979), visto que o comportamento biológico de um tumor maligno individual não pode ser predito com precisão por qualquer característica histológica específica (Schultheiss, 2006).

A atipia é considerada um dos parâmetros mais importantes de malignidade em neoplasias melanocíticas independentemente da localização, sendo que uma atipia marcada é associada a um prognóstico desfavorável (Millanta et al., 2002; Spangler e Kass, 2006; Campagne et al., 2013). Contudo, a avaliação histopatológica é difícil de ser realizada objetivamente, e os estudos nem sempre são consensuais (Roels e Tilmant, 1999; Millanta et al., 2002; Schultheiss, 2006).

O índice mitótico é considerado um fator prognóstico útil para neoplasias melanocíticas tanto da pele como da cavidade oral, embora não parece ser tão útil como atipia nuclear ou índice de proliferação celular Ki67 (Spangler e Kass,

2006; Smedley et al., 2011), de modo que é recomendado que o índice mitótico seja avaliado em conjunto com a atipia nuclear para se obter um prognóstico mais preciso (Spangler e Kass, 2006). Em geral, considera-se que cães com um índice mitótico acima de 3 terão expectativa de vida menor (Laprie et al., 2001).

Atualmente, considera-se que o índice de proliferação celular Ki67 apresenta um valor preditivo superior aos critérios histopatológicos, sendo recomendado para todas as neoplasias melanocíticas em cães, e especialmente em aquelas com comportamento biológico indeterminado, porém a realização deste exame nem sempre é possível devido principalmente a fatores financeiros.

Deste modo, este trabalho tem como objetivo deste trabalho é a caracterização histopatológica e morfométrica em neoplasias melanocíticas cutâneas espontâneas em caninos

MATERIAL E MÉTODOS

Aspectos Éticos da Pesquisa

O projeto de pesquisa que deu origem a este trabalho foi aprovado, sob processo de nº 60/2018, pela Comissão de Ética para o Uso de animais (CEUA) da Universidade Federal de Viçosa.

Amostragem

Foram utilizados os arquivos de biópsia processadas nos Laboratórios de Histopatologia do Departamento de Veterinária da UFV (MG) e PROVET (São Paulo, SP). Durante a amostragem não foi feita restrição quanto ao sexo, raça ou faixa etária, sendo excluídos apenas os casos referentes a melanoma oral, ocular e visceral. As informações referentes à raça, sexo, idade do animal, assim como o tamanho e localização dos tumores foram obtidas a partir das fichas histopatológicas.

Os casos regatados do laboratório de patologia da UFV com grande quantidade de pigmento foram despigmentadas. Para este fim, o material foi submetido ao protocolo de despigmentação que consistiu de um banho com uma solução a 0,25% de permanganato de potássio (KMnO₄), durante 30 a 60 minutos

dependendo da quantidade de pigmento, seguido por outro banho em solução a 5% de ácido oxálico ($H_2C_2O_4$) por alguns segundos (Figura 1) (Sulaimon et al., 2002; UNICAMPI, 2011). Do laboratório PROVET as laminas histológicas coradas com HE e despigmentadas foram recuperadas.

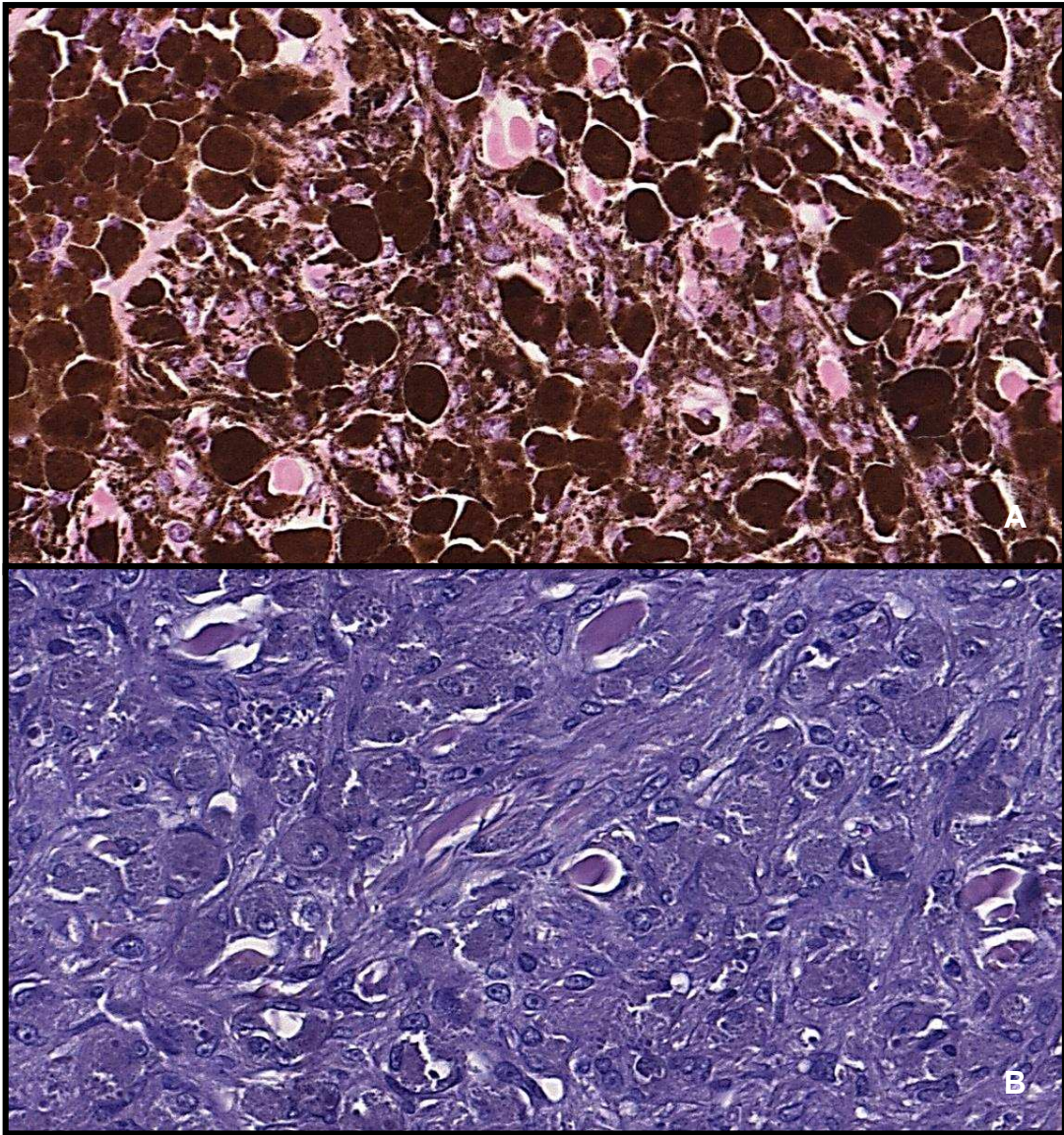


Figura 1. A. Tumor melanocítico com alta carga de pigmento melânico dificultando a avaliação das características celulares nucleares nas células neoplásicas, assim como a contagem de mitoses Fotomicrografia de um melanocitoma, HE. B. Corte histológico do mesmo caso após processo de despigmentação com permanganato de potássio e ácido oxálico. As células neoplásicas apresentam núcleos pequenos, com discreta variação da forma e nucléolos raramente evidentes na maioria das células. 20X

Avaliação histopatológica

A comprovação do diagnóstico foi realizado por dois patologistas por meio de microscopia de luz em lâminas coradas com HE e/ou despigmentadas e de acordo com a Classificação Histológica Internacional de Tumores Epiteliais e Melanocíticos da Pele de Animais Domésticos (WHO, 1998) e critérios atuais (Smedley et al., 2011). Foram incluídos na pesquisa apenas casos de melanoma e melanocitomas cutâneos, não limítrofes, baseado no índice mitótico. O diagnóstico de melanocitoma foi caracterizado quando a contagem de figuras mitóticas foi inferior a três em 10 campos (40x) consecutivos, sem sobreposição, em microscópio de ocular de 20mm, enquanto que para melanoma igual ou superior a três mitoses (Spangler e Kass, 2006, Smedley et al., 2011). A contagem era iniciada sempre de uma área com alta atividade mitótica, evitando áreas de inflamação, necrose e ulceração. O índice mitótico de cada tumor foi registrado por dois patologistas e a média usada para análises posteriores.

A presença de pigmento melânico foi avaliada e classificada em uma escala subjetiva de um (1) a três (3), sendo um (1) uma pigmentação escassa (menos de 30% de células pigmentadas); dois (2), pigmentação moderada (31 a 70%) e três (3), pigmento em abundância (mais de 70%). A presença ou ausência de infiltrado pagetoide, atividade juncional e ulceração também foi registrada.

A escala de atipia e pleomorfismo celular foi definida a partir da variação no tamanho, forma e características nucleares das células neoplásicas (presença de núcleos bizarros e nucléolos evidentes) considerando o predomínio dos subtipos celulares epitelioides e fusiformes no estroma tumoral e conforme critérios propostos por Spangler e Kass (2006), sendo:

- Um - 1 (Discreto): corresponde a células neoplásicas diferenciadas que apresentam uma dispersão fina e uniforme, com núcleos pequenos ou discretamente volumosos, apresentando pouca variação da forma. Os nucléolos podem estar presentes nas células, e quando observados, um único nucléolo pequeno e centralizado foi visualizado (figura 2A e 3A).
- Dois - 2 (Moderado): corresponde a células neoplásicas com núcleos volumosos, apresentando moderada variação da forma e tamanho, exibindo nucléolos de maior tamanho na maioria dos núcleos. Alguns

campos apresentam nucléolos múltiplos, núcleos bizarros e células multinucleadas (figura 2B e 3B).

- Três - 3 (Intenso): corresponde a células neoplásicas atípicas com núcleos vesiculosos, podendo apresentar intensa variação da forma e tamanho. Grande parte possui nucléolos evidentes e proeminentes de forma menos regular, localizados excentricamente, e com frequência são observados múltiplos e de tamanho similar a um eritrócito. Nesta classificação é frequente encontrar núcleos bizarros e células multinucleadas em vários campos figura (2C e 3C).

Todas as lâminas histológicas incluídas no estudo foram classificadas utilizando a escala de atipia/pleomorfismo por 3 patologistas que não obtiveram informação sobre o diagnóstico, nem das interpretações dos outros especialistas para obter o nível de concordância. Determinou-se que a escala fosse aplicada considerando o predomínio no estroma tumoral dos tipos celulares epitelioides e fusiformes independentemente. Os casos conflitantes foram classificados por acordo entre os patologistas para posterior análise morfométrica dos casos.

Casos indiferenciados, com comportamento biológico indeterminado ou limítrofes, apresentado mais de uma localização no corpo simultaneamente, lesões metastáticas ou com diagnóstico errôneo foram excluídos do estudo.

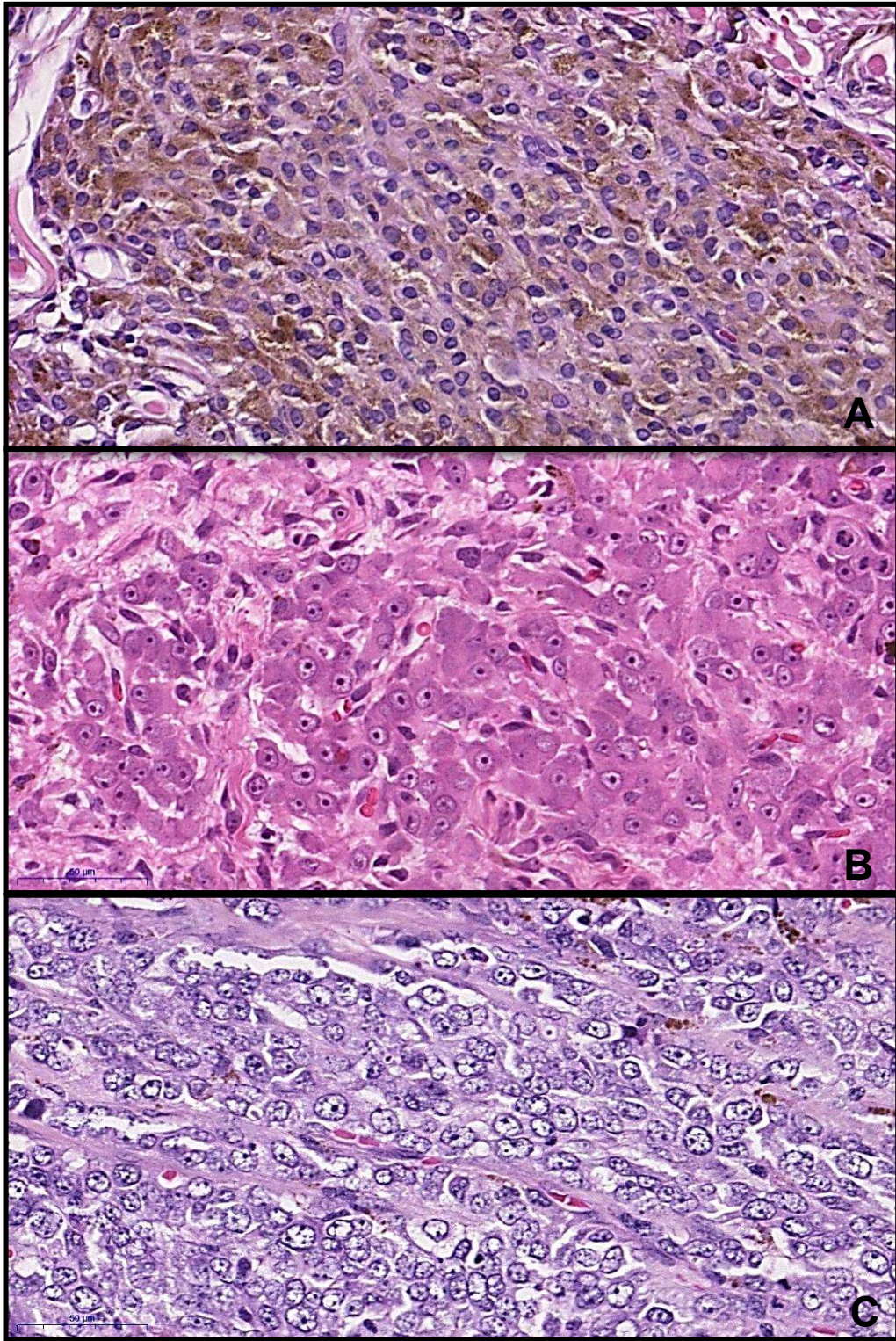


Figura 2. Fotomicrografia de tumores melanocíticos cutâneos espontâneos em cães exibindo diversos graus de atipia e pleomorfismo nuclear em células epitelioides. A. Corte histológico de um melanocitoma com núcleos discretamente volumosos, apresentado nucléolos pequenos e centralizados em algumas das células classificados com atipia/pleomorfismo grau I ou discreta. B. Melanoma cutâneo com núcleos volumosos com nucléolos visíveis e de maior tamanho quando comparado com as células neoplásicas da figura 2A. tumor melanocítico classificado com atipia/pleomorfismo grau II o moderado C. Melanoma cutâneo, mostrando melanócitos pleomorficos com núcleos vesiculosos e nucléolos proeminentes, sendo muitos destes múltiplos. Classificado com atipia/pleomorfismo grau III ou intenso, HE, 40X.

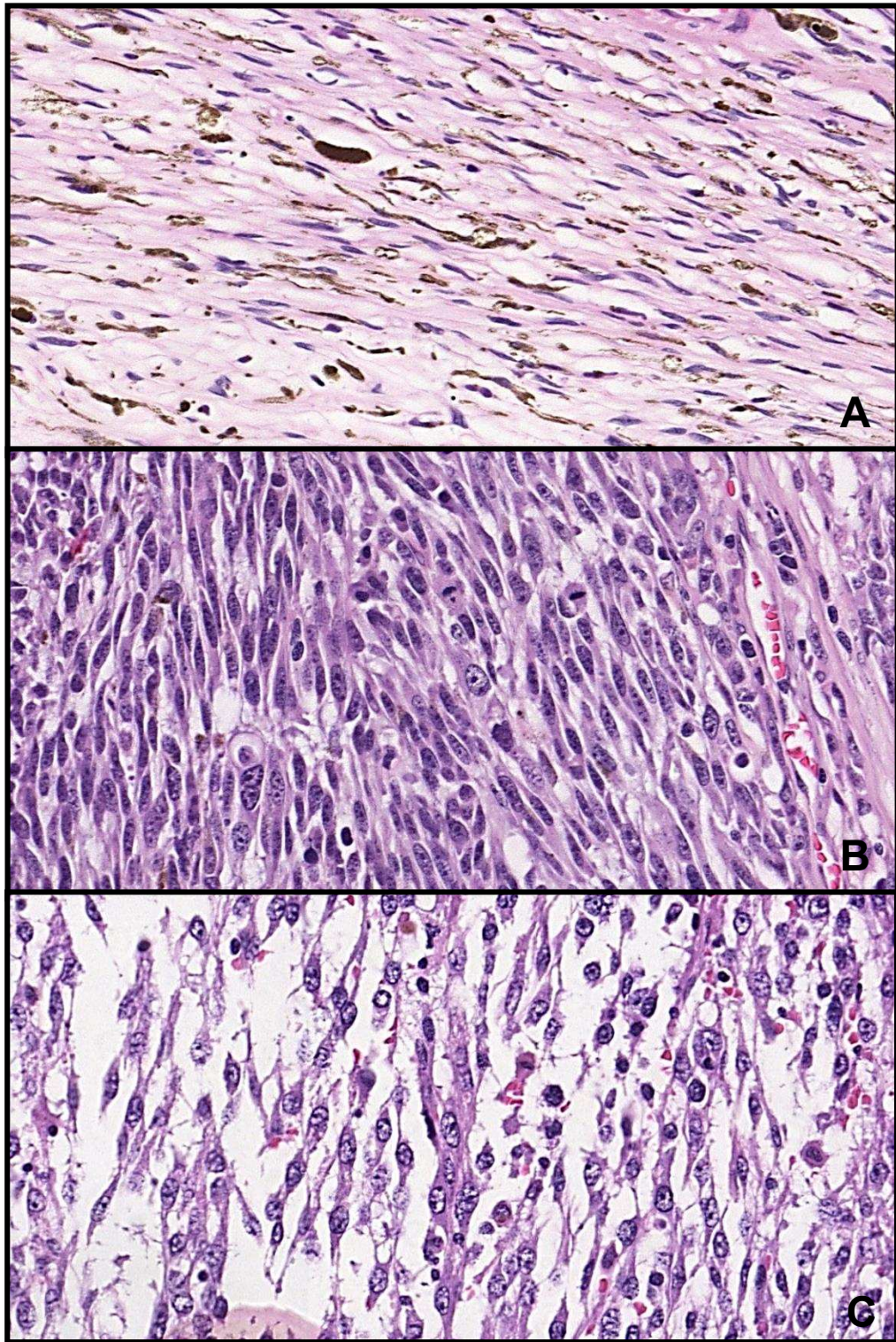


Figura 3. Fotomicrografia de tumores melanocíticos cutâneos espontâneos em cães exibindo diversos graus de atipia e pleomorfismo nuclear em células fusiformes. A. Atipia/Pleomorfismo discreto (A), Moderado (B) e intenso (C). HE, 40X.

Análises morfométricas

Foram realizadas fotomicrografias dos cortes histológicos usando câmera Leica MC170 HD (Leica Microsystems AG, Industry Division, Heerbrugg – Suíça) e programa de captura de imagens LAS (Versão 4.12.0, Leica Microsystems – Suíça) conectado a um microscópio de luz Leica DM1000.

De cada tumor foram amostrados aleatoriamente dez campos histológicos em aumento de 200X para determinar as proporções de celularidade tumoral, vasos sanguíneos e necrose e em aumento de 400X para determinar as proporções de tipo celular (epitelioides ou poligonais, fusiformes, redondas e células claras) (Weiss e Frese, 1974; Spangler e Kass, 2006; Smedley et al., 2011) e infiltrado inflamatório (linfocitário e polimorfonuclear). Posteriormente, as imagens foram analisadas sobrepondo uma graticula de 391 pontos no *software ImageJ*, desenvolvido pelo *National Institute of Health* (Maryland, EUA), disponível gratuitamente online (<https://imagej.nih.gov/ij>).

Os parâmetros estereológicos de densidade volumétrica (Vv) foram calculados pela contagem pontos que ocorreram nas estruturas de interesse usando a razão: $Vv = (PP / PT) \times 100$, em que PP é o número de pontos ocorrendo sobre a estrutura de interesse e PT é o total número de pontos da grade (Gonçalves et al., 2010; Novaes et al., 2014; Sarandy et al., 2017).

As fotomicrografias em aumento de 1000X foram capturadas aleatoriamente, incluindo áreas com alta e baixa celularidade. Quando possível um máximo de 300 núcleos de cada subtipo celular, epitelioides e fusiformes, com membrana nuclear definida e não sobrepostos foram mesurados para determinar a área e os diâmetros dos núcleos utilizando o programa *image-Pro Plus 4.5* (Media Cybernetics, Silver Spring, EUA). As mesmas medidas foram obtidas dos eritrócitos íntegros encontrados nos campos capturados. Os dados obtidos foram exportados e salvos em planilha eletrônica (Excel 2013) para sua organização e posterior análise estatística. A captura das imagens e a análise morfométrica foram realizadas por um único avaliador.

Para documentação fotográfica do trabalho foram digitalizadas algumas lâminas histológicas com scanner de lâminas 3D HISTECH no de Centro de Aquisição e Processamento de Imagens – (CAPI) do Instituto de Ciências

Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). E as capturas de imagem obtidas no programa CaseViewer 2.2 (3D HISTECH).

Análises estatísticas

Para a análise dos dados, foi utilizado o *Statistical Analysis System* (SAS, 2002). Os dados foram analisados quanto à normalidade dos erros e homogeneidade de variâncias pelos testes de Kolmogorov-Smirnov e Bartlett, respectivamente. Os dados em porcentagem foram submetidos à transformação angular ($Y' = \arcsen\sqrt{Y}$), os dados de índice mitótico e tamanho dos tumores foram submetidos à transformação inversa da raiz quadrada ($Y' = 1/\sqrt{Y}$), e os dados referentes à área das células fusiformes foram submetidos à transformação logarítmica ($Y' = \log(Y + 1)$). Para maior clareza, os resultados foram apresentados com variáveis não transformadas.

As comparações entre os tipos de tumores (melanoma e melanocitoma) foram realizadas por análise de variância (*ANOVA procedure*). As comparações entre os tipos de tumores associados ao grau de pleomorfismo (Melanocitoma grau 1, Melanoma grau 1, 2 e 3) foram realizadas por análise de variância (*GLM procedure*) com médias comparadas pelo teste *t*.

Os dados de frequência foram arranjados em tabelas de contingência e analisados pelo teste exato de Fisher (tabelas 2 x 2) ou de Freeman-Halton (tabelas l x c) utilizando o *FREQ procedure*.

A concordância entre os patologistas com relação à avaliação do pleomorfismo de células epitelioides e fusiformes foi analisada pelo coeficiente kappa ponderado (*FREQ procedure*). A força da concordância foi avaliada de acordo com o proposto por Landis e Koch (1977).

O nível de significância adotado foi $\alpha = 0.05$.

Foi realizada análise de cluster (*CLUSTER procedure*) entre os tumores utilizando as variáveis de morfometria (diâmetros e áreas celulares e proporções celulares) e índice mitótico, com o objetivo de classificar os tumores considerando o grau de atipia/pleomorfismo. Foi considerado o método do centroide, os valores de RMSSTD (*root mean square standard deviation*) foram obtidos em relação ao número de clusters, o que gerou um gráfico que possibilitou identificar o número ideal de clusters de acordo com Cecon et al.

(2008). Para visualizar o dendograma e verificar quais tumores pertencem aos diferentes clusters foi utilizado o *TREE procedure*.

RESULTADOS

Um total de 96 casos foram resgatados do acervo dos laboratórios de patologia da UFV e PROVET. Foram excluídos 27 casos da pesquisa: oito por apresentarem um comportamento biológico indeterminado no momento da avaliação histopatológica, três por diagnóstico de melanoma amelanótico, dez por se apresentarem como neoplasias indiferenciadas, quatro por apresentarem tumores em localizações distantes, e dois casos por dificuldade na despigmentação do corte histológico, posto que o pigmento não permitiu a avaliação da atipia/pleomorfismo e análise morfométrica. Dessa forma, 69 casos de neoplasias melanocíticas cutâneas foram incluídos para caracterização histopatológica e morfométrica. Um dos cães apresentou dois tumores com localização próxima e características histopatológicas similares, fazendo com que o número de tumores avaliados fosse 70, sendo 27 (38.5%) melanocitomas e 43 (61.43%) melanomas.

Dos 69 animais incluídos no estudo, a maior parte foi sem raça definida (SRD) (18), outras raças foram Teckel (9), Schnauzer (7), Rottweiler (5), Pit Bull (4), Labrador (4), Lhasa Apso (3), Beagle (2), Boxer (2), Poodle (2), Sharpei (2), Pinscher (2), Shih Tzu (2), Cocker (1), Dálmata (1), Dobermann (1), Rhodesian Ridgeback (1) e York Shire (1). Um caso não apresentava a informação referente a raça. Com relação ao sexo, 60,9% (42) eram fêmeas e 39,1% (27) eram machos ($n=69$, $P < 0,05$).

A idade média dos animais acometidos por neoplasias melanocíticas foi de 10.0 ± 3.3 anos. Os melanocitomas afetaram cães desde os seis até os 14 anos de idade, nos melanomas cutâneos de dois a 17 anos. O diâmetro tumoral dos melanomas foi maior ($2,30 \pm 1,61$ cm) quando comparado com os melanocitomas ($0,80 \pm 0,62$ cm; $P < 0,05$). Com respeito a localização anatômica regional encontrou-se uma distribuição similar em cabeça e pescoço, tronco e membros para ambos os tipos de tumor (tabela 1).

Tabela 1. Distribuição anatômica regional das neoplasias melanocíticas em cães (n=61).

Localização	Melanocitomas N (%)	Melanomas N (%)
Cabeça e pescoço	9 (45,0)	17 (41,5)
Tronco	6 (30,0)	11 (26,8)
Membros	5 (25,0)	13 (31,7)

P> 0,05

Microscopicamente, o grau de pigmentação das neoplasias melanocíticas variou de escassa a intensa, sendo constatado que a maioria dos melanocitomas foram mais pigmentados quando comparados aos melanomas. O infiltrado pagetoide esteve ausente na maioria dos tumores melanocíticos avaliados. Em três casos não foi possível avaliar esta característica. A atividade juncional foi observada nos melanomas e melanocitomas com frequências similares. A ulceração esteve ausente na maioria dos melanocitomas e foi mais frequente nos melanomas (tabela 2).

Os melanomas apresentaram maior densidade celular que os melanocitomas (tabela 3), embora, quando considerada a atipia/pleomorfismo a diferença tenha sido apenas entre melanocitoma e melanomas de escala três (tabela 4). Ambas neoplasias melanocíticas exibiram os subtipos celulares epitelioides, fusiformes e redondas (pequenas e grandes). Houve predomínio do subtipo celular epitelióide nos melanomas (tabela 3), que aumentou gradualmente de acordo com o grau de atipia/pleomorfismo (tabela 4) e células redondas pequenas, seguidas por epitelioides para os melanocitomas (tabela 3 e 4). O infiltrado linfocitário observou-se com maior intensidade nos melanomas (tabela 3), principalmente nos melanomas classificados no grau 2 (tabela 4). A proporção de necrose não diferiu entre melanocitomas e melanomas (tabela 3), porém quando considerado o grau de atipia/pleomorfismo os melanomas de grau 3 apresentaram maior porcentagem (tabela 4).

Tabela 2. Frequência de pigmentação, infiltrado pagetoide, juncional das neoplasias melanocíticas segundo o grau de pigmentação.

	Melanocitoma n (%)	Melanoma Cutâneo n (%)
Pigmentação (n=70).		
1	2 (7.41)	23 (53.49)
2	10 (37.04)	10 (23.26)
3	15 (55.56)	10 (23.26)
P < 0,05		
Infiltrado pagetoide (n=67).		
Ausente	25 (92.59)	31 (77.5)
Presente	2 (7.41)	9 (22.5)
P > 0,05		
Atividade juncional (n=67)		
Ausente	11 (40.74)	9 (22.5)
Presente	16 (59.26)	31 (77.5)
P > 0,05		
Ulceração (n=67)		
Ausente	18 (66.67)	17 (42.5)
Presente	9 (33.33)	23 (57.5)
P > 0,05		

n= número de casos

Tabela 3. Porcentagens de densidade volumétrica para celularidade total, subtipo celular, infiltrado inflamatório, necrose, vasos sanguíneos e fibrose em tumores melanocíticos em cães (Média \pm desvio-padrão).

Variáveis	Melanocitoma	Melanoma
Densidade celular	30,27 \pm 14,98 ^b	41,07 \pm 13,25 ^a
Células epitelióide	7,89 \pm 6,47 ^b	17,55 \pm 8,52 ^a
Células fusiformes	1,88 \pm 1,55 ^a	1,69 \pm 1,47 ^a
Células redondas pequenas	11,57 \pm 8,48 ^a	5,73 \pm 7,00 ^b
Células redondas gigantes	0,67 \pm 0,81 ^a	0,06 \pm 0,20 ^b
Polimorfonucleares	0,02 \pm 0,05 ^a	0,08 \pm 0,21 ^a
Infiltrado linfocitário	0,10 \pm 0,20 ^b	0,85 \pm 2,07 ^a
Necrose	0,55 \pm 1,86 ^a	1,90 \pm 4,54 ^a
Vasos sanguíneos	1,10 \pm 1,03 ^a	1,05 \pm 0,93 ^a

Letras diferentes na mesma linha diferem pela ANOVA ($P < 0,05$).

Tabela 4. Porcentagens de densidade volumétrica para celularidade total, subtipo celular, infiltrado inflamatório, necrose, vasos sanguíneos e fibrose em tumores melanocíticos em cães segundo a atipia/pleomorfismo (Média ± desvio-padrão).

Variáveis	Atipia/pleomorfismo			
	Melanocitoma	Melanoma		
	1	1	2	3
Densidade celular	30,27 ± 14,98 ^b	33,42 ± 14,74 ^{ab}	43,55 ± 12,92 ^{ab}	44,34 ± 5,65 ^a
Células epitelioides	7,89 ± 6,47 ^d	12,99 ± 10,15 ^c	17,78 ± 7,43 ^b	24,93 ± 4,15 ^a
Células fusiformes	1,88 ± 1,55 ^a	2,49 ± 2,03 ^a	1,34 ± 1,18 ^a	1,73 ± 0,92 ^a
Células redondas pequenas	11,57 ± 8,48 ^a	4,54 ± 4,33 ^{bc}	7,28 ± 8,14 ^b	1,20 ± 1,68 ^c
Células redondas gigantes	0,67 ± 0,81 ^a	0,03 ± 0,10 ^b	0,08 ± 0,25 ^b	0,01 ± 0,02 ^b
Polimorfonucleares	0,02 ± 0,05 ^a	0,04 ± 0,09 ^a	0,09 ± 0,25 ^a	0,12 ± 0,19 ^a
Infiltrado linfocitário	0,10 ± 0,20 ^b	0,15 ± 0,21 ^b	1,28 ± 2,59 ^a	0,27 ± 0,27 ^{ab}
Necrose	0,55 ± 1,86 ^b	2,44 ± 6,13 ^b	0,55 ± 1,31 ^b	6,78 ± 7,11 ^a
Vasos sanguíneos	1,10 ± 1,03 ^a	0,93 ± 0,71 ^a	1,23 ± 1,05 ^a	0,49 ± 0,36 ^a

Letras diferentes na mesma linha diferem pelo teste *t* (P < 0,05).

Todos os melanocitomas foram classificados com atipia/pleomorfismo discreto para o subtipo celular epitelióide, 25 casos foram classificados como discretos e dois casos como moderados nas células fusiformes. Os melanomas cutâneos apresentaram maior variação, indo do discreto ao intenso em ambos os subtipos celulares (Figuras 4 e 5).

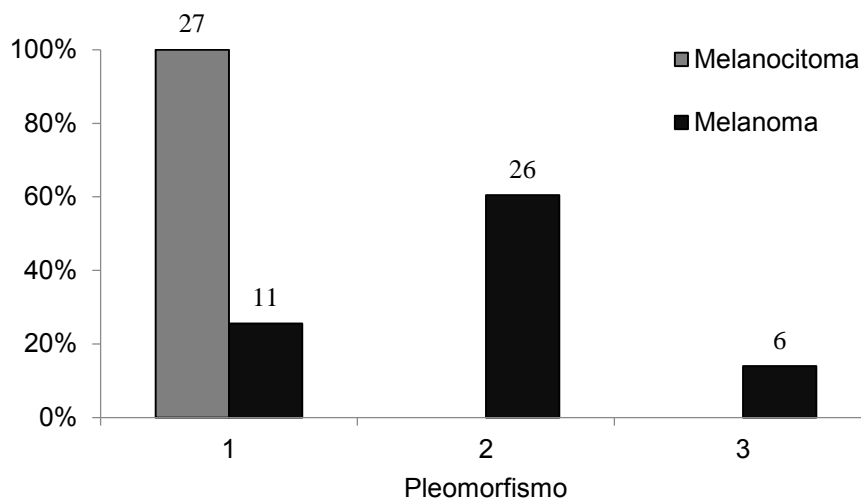


Figura 4. Distribuição das escalas de pleomorfismo para o subtipo celular epitelióide das neoplasias melanocíticas cutâneas em cães. $P < 0,05$ pelo teste de Freeman-Halton.

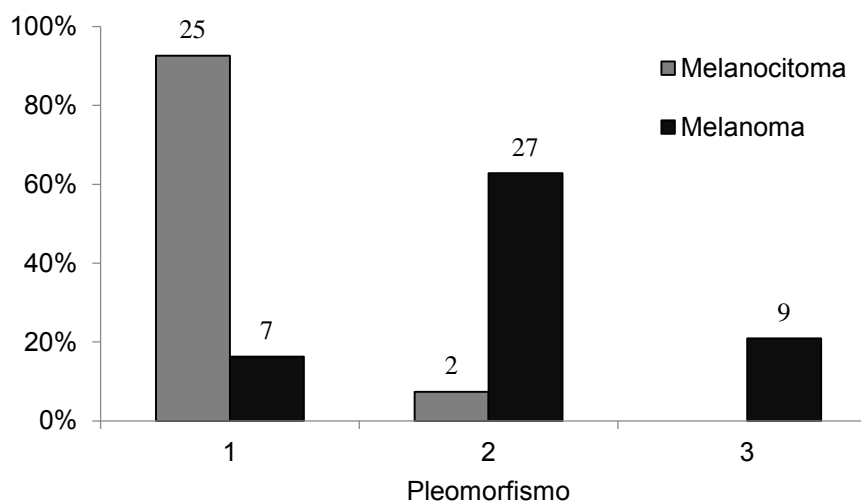


Figura 5. Distribuição das escalas de pleomorfismo para o subtipo celular fusiforme das neoplasias melanocíticas cutâneas em cães. $P < 0,05$ pelo teste de Freeman-Halton.

Os núcleos das células epitelióides foram semelhantes entre os dois tipos de neoplasias, embora o diâmetro menor tenha sido maior nos melanomas, já as

células fusiformes foram maiores nos melanomas, com maior diâmetro menor, diâmetro médio e área (Tabela 5).

Tabela 5. Diâmetros e área dos subtipos celulares mensurados nas neoplasias melanocíticas cutâneas em cães (Média \pm desvio-padrão)

Variáveis	Melanoma	Melanocitoma
Núcleos de células epitelioides		
Diâmetro menor (μm)	5,11 \pm 0,63 ^a	4,65 \pm 0,53 ^b
Diâmetro maior (μm)	7,25 \pm 0,88 ^a	7,36 \pm 0,89 ^a
Diâmetro médio (μm)	6,18 \pm 0,74 ^a	6,00 \pm 0,68 ^a
Área (μm^2)	28,96 \pm 6,68 ^a	26,40 \pm 5,36 ^a
Núcleos de células fusiformes		
Diâmetro menor (μm)	3,02 \pm 0,51 ^a	2,44 \pm 0,37 ^b
Diâmetro maior (μm)	9,77 \pm 1,16 ^a	9,33 \pm 0,94 ^a
Diâmetro médio (μm)	6,40 \pm 0,81 ^a	5,88 \pm 0,62 ^b
Área (μm^2)	23,98 \pm 6,78 ^a	18,04 \pm 4,12 ^b

Letras diferentes na mesma linha diferem pela ANOVA ($P < 0,05$).

Ao considerar a atipia/pleomorfismo, os núcleos do subtipo epitelióide foram maiores nos melanomas de grau 3 e menores nos melanocitomas e melanomas de grau 1, com os melanomas de grau 2 apresentando valores intermediários. As células fusiformes foram maiores nos melanomas grau 3, apresentaram valores intermediários nos melanomas 1 e 2, e foram menores nos melanocitomas. Em geral, as células epitelióides foram cerca de duas vezes maiores que os eritrócitos, sendo a razão epitelióide/eritrócito maior nos melanomas grau 3 que nos melanocitomas (Tabela 6).

Houve aumento gradual do índice mitótico à medida que a atipia/pleomorfismo aumentou (Figura 6).

Tabela 6. Diâmetros e área dos subtipos celulares mensurados nas neoplasias melanocíticas cutâneas e eritrócitos em cães segundo a atipia/pleomorfismo (Média ± desvio padrão).

Variáveis	Atipia/pleomorfismo			
	Melanocitoma 1	1	Melanoma 2	3
Núcleos de células epitelioides (n = 70 casos)				
Diâmetro menor (µm)	4,65 ± 0,53 ^c	4,57 ± 0,38 ^c	5,16 ± 0,50 ^b	5,89 ± 0,59 ^a
Diâmetro maior (µm)	7,36 ± 0,89 ^b	6,65 ± 0,64 ^c	7,29 ± 0,83 ^b	8,15 ± 0,63 ^a
Diâmetro médio (µm)	6,00 ± 0,68 ^{bc}	5,61 ± 0,49 ^c	6,22 ± 0,66 ^b	7,02 ± 0,61 ^a
Área (µm ²)	26,40 ± 5,36 ^{bc}	23,63 ± 4,12 ^c	29,16 ± 5,19 ^b	37,84 ± 7,01 ^a
Núcleos de células fusiformes (n = 70 casos)				
Diâmetro menor (µm)	2,44 ± 0,37 ^c	2,74 ± 0,55 ^b	2,98 ± 0,34 ^b	3,70 ± 0,52 ^a
Diâmetro maior (µm)	9,33 ± 0,94 ^b	9,21 ± 1,44 ^b	9,64 ± 0,69 ^b	11,36 ± 1,03 ^a
Diâmetro médio (µm)	5,88 ± 0,62 ^c	5,98 ± 0,98 ^{bc}	6,31 ± 0,47 ^b	7,53 ± 0,75 ^a
Razão entre o diâmetro menor e maior	0,27 ± 0,03 ^c	0,30 ± 0,03 ^b	0,31 ± 0,03 ^{ab}	0,33 ± 0,03 ^a
Área (µm ²)	18,04 ± 4,12 ^c	20,65 ± 6,91 ^{bc}	23,04 ± 4,10 ^b	34,16 ± 7,32 ^a
Eritrócitos (n = 50 casos)				
Área (µm ²)	15,55 ± 3,68 ^a	13,39 ± 2,55 ^a	14,71 ± 4,36 ^a	13,50 ± 1,40 ^a
Razão núcleo epitelioides/eritrócito*	1,79 ± 0,75 ^b	1,92 ± 0,35 ^{ab}	2,19 ± 0,91 ^{ab}	2,85 ± 0,68 ^a

Letras diferentes na mesma linha diferem pelo teste *t* (P < 0,05). * Razão entre o tamanho (área) dos núcleos de células epitelioides e eritrócitos.

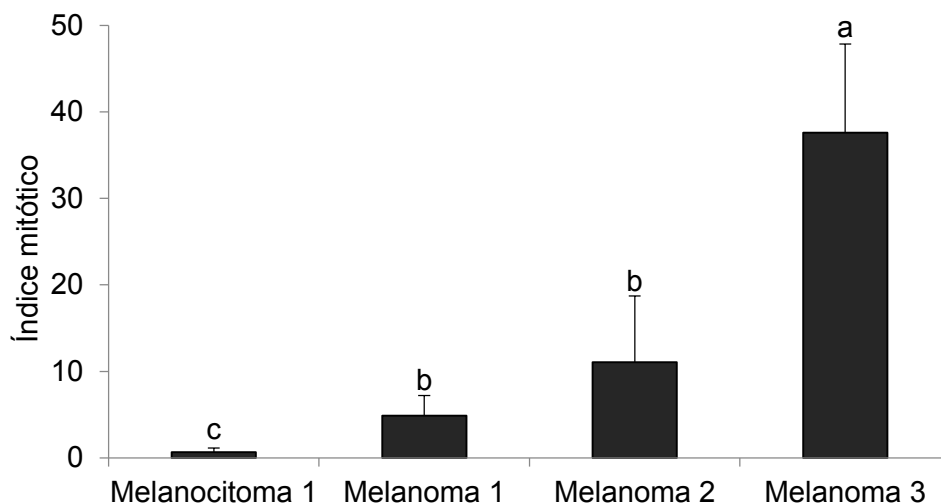


Figura 6. Índice mitótico associado a atipia/pleomorfismo nas neoplasias melanocíticas. Letras diferentes indicam diferença significativa diferem pelo teste t ($P < 0.05$).

As concordâncias entre os patologistas na avaliação de atipia/pleomorfismo nuclear das células epitelioides e fusiformes estão apresentadas nas tabelas 7 e 8, respectivamente. É possível notar que houve maior discrepância entre os patologistas na classificação da atipia/pleomorfismo moderado (grau 2) nas células fusiformes.

Os valores dos coeficientes kappa ponderado estão apresentados na tabela 9. Na avaliação das células epitelioides, os coeficientes foram significativos ($P < 0,05$) e de magnitude considerável a substancial. Entretanto, na avaliação das células fusiformes, embora os coeficientes tenham sido significativos ($P < 0,05$), apresentaram magnitudes menores, especialmente entre os patologistas 2 e 3.

Tabela 7. Concordância dos patologistas na avaliação de atipia/pleomorfismo nuclear das células epitelioides em neoplasias melanocíticas cutâneas em cães (n= 70).

		Patologista 2			
		Atipia/pleomorfismo			
		1	2	3	
Patologista 1	Atipia/pleomorfismo	1	28	8	4
		2	2	16	6
		3	0	0	6
		Patologista 3			
		Atipia/pleomorfismo			
		1	2	3	
Patologista 1	Atipia/pleomorfismo	1	35	3	2
		2	8	14	2
		3	0	1	5
		Patologista 3			
		Atipia/pleomorfismo			
		1	2	3	
Patologista 2	Atipia/pleomorfismo	1	25	4	1
		2	14	8	2
		3	4	6	6

Tabela 8. Concordância dos patologistas na avaliação de atipia/pleomorfismo nuclear das células fusiformes em neoplasias melanocíticas cutâneas em cães (n=70).

		Patologista 2			
		Atipia/pleomorfismo			
		1	2	3	
Patologista 1	Atipia/pleomorfismo	1	24	7	2
		2	5	18	8
		3	0	0	6

		Patologista 3			
		Atipia/pleomorfismo			
		1	2	3	
Patologista 1	Atipia/pleomorfismo	1	20	8	5
		2	7	14	10
		3	2	1	3

		Patologista 3			
		Atipia/pleomorfismo			
		1	2	3	
Patologista 2	Atipia/pleomorfismo	1	14	9	6
		2	10	11	4
		3	5	3	8

Tabela 9. Coeficientes kappa ponderado da Concordância entre patologistas atipia/pleomorfismo nuclear das células epitelioides e fusiformes em neoplasias melanocíticas cutâneas em cães.

Tipo celular	Patologistas		
	1 e 2	1 e 3	2 e 3
Epiteloide	0,5634 (0,4036 - 0,7232)	0,6196 (0,4471- 0,7921)	0,3687 (0,1955 - 0,5420)
Fusiformes	0,5548 (0,3978 – 0,7119)	0,2802 (0,1061 – 0,4544)	0,1966 (-0,0016 – 0,3947)

Entre parênteses os intervalos de confiança com 95% de certeza.

A avaliação dos valores de RMSSTD indicou o número ótimo de 10 clusters (Figuras 7 e 8).

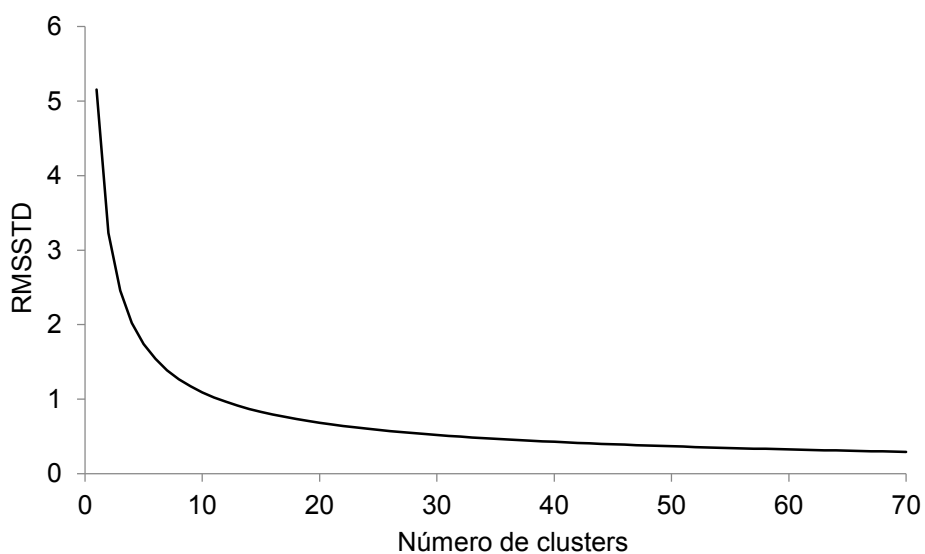


Figura 7. Valores de RMSSTD (*root mean square standard deviation*) de acordo com o número de clusters.

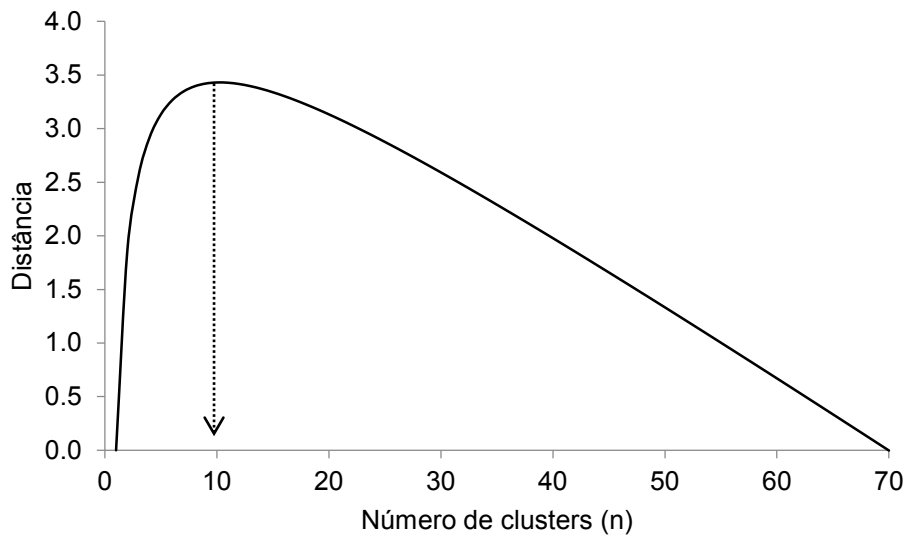


Figura 8. Distância euclidiana dos valores de RMSSTD (*root mean square standard deviation*). Valor máximo em $n = 10$.

À partir do dendograma (Figura 9) é possível visualizar os clusters. Todos os tumores de atipia/pleomorfismo grau I foram agrupados nos clusters 1 e 2, todos os tumores de atipia/pleomorfismo grau III foram agrupados nos clusters 4 a 10, os tumores de atipia/pleomorfismo grau II apresentaram maior variabilidade, sendo agrupados em vários clusters, embora 50% deles foram agrupados no cluster 3 (Figura 10).

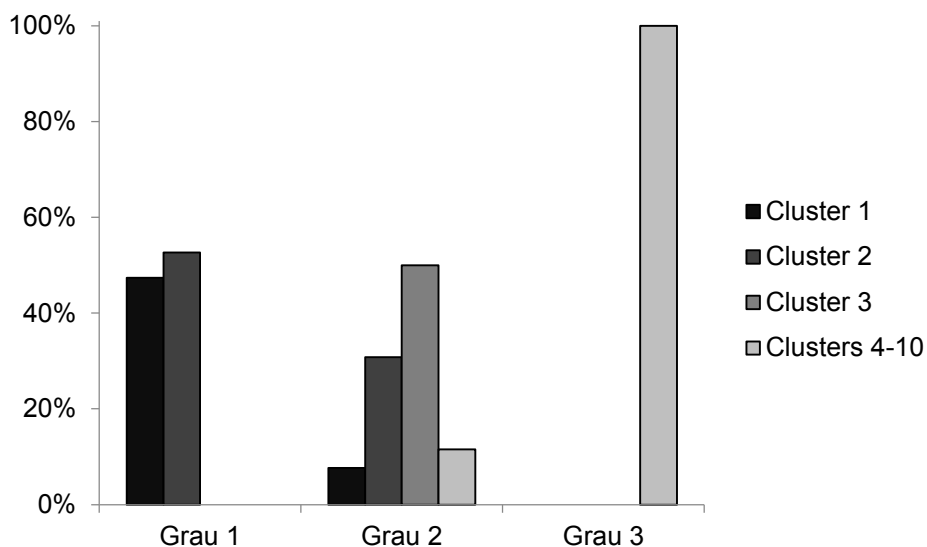


Figura 10. Distribuição dos graus de atipia/pleomorfismo de acordo com os clusters.

DISCUSSÃO

As neoplasias melanocíticas são comuns em cães, e as raças mais acometidas são aquelas que apresentam marcada pigmentação cutânea, o que é considerado um fator de risco para este tipo de neoplasia (Ramos-Vara et al., 2000). Cocker Spaniel, Schnauzer, Scottish Terriers, Irish Setters, Poodle, Dobermann Pinscher, Chow Chow, Golden Retriever, Dachshund e SRD são comumente afetados (Ramos-Vara et al., 2000; Smith et al., 2002). Boxers e Pastores Alemães parecem ser menos afetados pela doença, conforme descrito por Ramos-Vara et al. (2000). De acordo com Modiano et al. (1990), a predileção de raça em cães sugere que as neoplasias melanocíticas poderiam ter uma base genética, mas ainda não está claro.

No presente trabalho, cães de raças com pele pigmentada e cães SRD foram os mais acometidos com neoplasias melanocíticas cutâneas. Teixeira et al. (2010) observaram alta incidência de neoplasias melanocíticas de comportamento maligno em caninos SRD, porém estes autores não informaram o tipo de melanoma.

Desta forma, um cão SRD que possua a pele pigmentada também pode ser considerado predisposto a desenvolver melanoma (Camargo et al., 2008),

no entanto, a ficha histopatológica dos animais usados no presente estudo não informava o grau de pigmentação da pele.

O risco de desenvolver neoplasias melanocíticas aumenta com a idade (Dorn, 1976; Millanta et al. 2002; Smith et al.,2002). Neste estudo, os cães diagnosticados com neoplasias melanocíticas eram senescentes, com uma idade média de 10,0 anos, corroborando com os dados descritos por outros autores (Todoroff e Brodey, 1979; Goldschmidt, 1994, Ramos- Vara et al., 2000; Camargo et al. 2008). Por outro lado, Teixeira et al. (2010) relataram uma incidência maior em cães de média idade.

Quanto ao sexo, não há predileção nas neoplasias melanocíticas em cães (Bolton et al. 1990; Smith et al., 2002; Schultheiss, 2006; Spangler, 2006; Miller et al., 2013), não obstante, alguns autores relataram maior frequência em cães machos (Dorn, 1976; Todoroff e Brodey, 1979; Camargo et al., 2008; Texeira et al. 2010). Neste estudo as fêmeas foram mais acometidas que os machos, isto é similar ao reportado Perrone (2001).

No presente estudo, a localização anatômica dos tumores foi uniforme, porém observou-se que os locais acometidos em número absoluto foram similares ao descrito na literatura para as neoplasias melanocíticas (Garma-aviña et al., 1981; Ramos-vara et al., 2000; Camargo et al., 2008. O comportamento maligno dos melanomas é amplamente dependente da localização do tumor (Cangul, 2001), sendo que os localizados na cavidade oral e no dígito sempre terão um prognóstico desfavorável, assim como aqueles localizados no dígito e nas junções mucocutâneas nos cães (Ramos-Vara et al., 2002; 1017 Smith et al., 2002). Como não foi possível realizar o seguimento dos casos após o diagnóstico é difícil avaliar o comportamento biológico segundo a localização destas neoplasias nos cães incluídos no estudo.

A pigmentação melânica foi mais marcada nos melanocitomas em comparação aos melanomas cutâneos, mas o grau de pigmentação depende da diferenciação dos melanócitos neoplásicos, sendo que quanto menor diferenciação das células, menor pigmentação melânica, mas isto não é uma constante, pois melanomas também podem exibir vários graus de pigmentação que vão desde ausência até intensa (Ramos-Vara et al., 2000; Smith et al., 2002; Ohsie et al., 2008). O infiltrado pagetoide ocasional é uma característica inespecífica, que pode ser encontrada em melanomas mas também pode se

apresentar em diversas lesões benignas (Goldschmidt, 1994; Haupt e Stern, 1995; Smith et al., 2002). Esta característica esteve ausente na maioria dos tumores melanocíticos cutâneos avaliados neste estudo.

A presença ou ausência de atividade juncional não é específica para melanomas e frequentemente pode ser observada em melanocitomas (Smith et al., 2002), no entanto, os melanomas cutâneos podem exibir uma atividade juncional mais evidente (Goldschmidt e Hendrick, 2002). Neste estudo, a atividade juncional esteve presente nos tumores melanocíticos de comportamento benigno e maligno.

O desfecho clínico de uma neoplasia melanocítica individual não pode ser predito com precisão por qualquer característica histológica específica (Schultheiss, 2006), sendo recomendado que mais de um parâmetro seja considerado para classificar uma neoplasia melanocítica como melanoma ou melanocitoma (Spangler e Kass, 2006; Sánchez et al., 2007; Smedley et al., 2011). Além disso, na presença de parâmetros histopatológicos conflitantes, a imunohistoquímica deve ser realizada para determinar o diagnóstico e prognóstico.

Existe dificuldade na utilização de critérios histopatológicos e de parâmetros morfológicos como indicadores prognósticos devido a sua subjetividade, dessa forma a experiência e o nível de treinamento do patologista podem influenciar a avaliação dos cortes histológicos (Bostock, 1979, Smith et al., 2002). Alguns parâmetros histológicos têm implicação prognóstica para neoplasias melanocíticas, entre eles estão a atipia e o índice mitótico, que devem ser avaliados conjuntamente.

Por sua subjetividade, a atipia nuclear é um dos critérios que mais podem causar dúvidas ao patologista quando presente numa lesão melanocítica. Esta característica parece ser a mais sensível para avaliar o prognóstico em neoplasias melanocíticas, principalmente quando critérios de avaliação são rigorosamente definidos e um sistema de classificação metuculoso é aplicado (Bergin et al. 2011). Outros estudos de tumores melanocíticos orais e cutâneos também consideraram a atipia nuclear importante, embora não tenha sido definida com precisão (Roels e Tilmant, 1999; Millanta et al., 2002). Do mesmo modo, Schultheiss (2006) não identificou características histológicas específicas de valor prognóstico, mas este autor não definiu critérios de atipia.

Spangler e Kass, (2006) propuseram uma escala incremental de 0 a 10 para avaliar atipia nuclear. Apesar de resultados satisfatórios na classificação da atipia, a metodologia é demorada, potencialmente suscetível à variação interobservador (Smedley et al., 2011) e pouco prática, tornando-a difícil de implementar na rotina. Bergin et al. (2011) avaliaram a atipia nuclear de 80 neoplasias melanocíticas orais caninas usando a escala previamente estabelecida por Spangler e Kass (2006), adaptando-a para um método semiquantitativo: contando 100 células no aumento 400X e classificando os núcleos como típicos ou atípicos. Após a contagem, foi atribuído um escore numérico que correspondeu à porcentagem de células com núcleos atípicos: 0, sem núcleos atípicos; 1, 1 a 9% de núcleos atípicos; 2, 10 a 19% de núcleos atípicos, até 10, 90 a 100% de núcleos atípicos. Ainda, para mimetizar uma avaliação diagnóstica mais típica, os autores agruparam os escores de atipia nucleares: 0 a 3 foram considerados leves, 4 a 8 moderados e 9 a 10 intenso. Contudo, este sistema mostrou-se ligeiramente inferior embora comparável ao obtido com o agrupamento em decil. Além disso, cães com atipia nuclear moderada e intensa foram mais propensos a morrer um ano após o diagnóstico do que cães com atipia leve.

Atualmente, recomenda-se que a avaliação de atipia seja realizada em 100 - 200 células, principalmente epitelioides e em 3 campos, sendo que tumores que exibam mais de 20% de atipia nuclear apresentarão um prognóstico desfavorável (Spangler e Kass, 2006; Bergin et al. 2011), porém esta avaliação nem sempre é aplicada pelos patologistas no momento do diagnóstico devido à dificuldade desta metodologia. Neste estudo, a escala de atipia/pleomorfismo foi aplicada nos subtipos celulares epitelioides e fusiformes independentemente e considerando sempre o predomínio do grau de atipia/pleomorfismo no estroma tumoral. Encontrou-se que os melanomas cutâneos apresentaram atipia/pleomorfismo de forma discreta a intensa, mas os tumores com comportamento benigno exibiram atipia/pleomorfismo discreto, coincidindo com relatos anteriores (Bostock, 1979; Goldschmidt e Shofer, 1992; Goldschmidt, 1994).

Neste estudo, os núcleos dos subtipos celulares epitelioides e fusiformes foram medidos e classificados considerando o grau de atipia/pleomorfismo, porém não conseguimos comparar com outros trabalhos em neoplasias

melanocíticas. O diâmetro nuclear no subtipo celular epitelióide foi mensurado para neoplasias melanocíticas orais em cães por Spangler e Kass (2006), porém, os autores removeram os dados do artigo porque era um procedimento trabalhoso e demorado, não relacionado significativamente à mortalidade nesse grupo de cães portadores de tumor.

A comparação do núcleo das células epitelióides com os eritrócitos objetiva facilitar a avaliação visual dos núcleos. Neste estudo, o tamanho das células epitelióides em relação aos eritrócitos variou conforme o grau de atipia/pleomorfismo, de modo que nos melanocitomas e melanomas de grau 1 as células epitelióides corresponderam a um ou dois eritrócitos, no grau 2, dois eritrócitos, e no grau 3, três eritrócitos.

O índice mitótico é considerado um fator prognóstico útil nas neoplasias melanocíticas. Contagens acima de 3 mitoses nos melanomas cutâneos e acima de 4 para os melanomas orais e de lábios representam uma expectativa de vida menor para os cães acometidos (Laprie et al., 2001; Bergin et al., 2011). Após o diagnóstico de melanocitoma, 90% dos cães continuam vivos por pelo menos 2 anos, nos melanomas cutâneos, 50% dos cães vivem menos de 7 meses e 25% podem estar vivos aos 2 anos (Bostock, 1979). Neste estudo, encontrou-se aumento gradual do índice mitótico à medida que o grau de atipia/pleomorfismo aumentava, o que apresenta implicações prognósticas importantes para os animais diagnosticados, visto que os melanomas apresentam um prognóstico ruim em comparação aos melanocitomas, que apresentam um comportamento biológico benigno (Bostock, 1979; Smith et al., 2002).

Como a classificação por atipia nuclear depende da avaliação do observador e não de uma medida quantitativa, os critérios altamente específicos e definidos para a atipia são muito importantes para manter a reprodutibilidade e minimizar a variação interobservador (Spangler e Kass, 2006; Bergin *et al.* 2011). Nesta pesquisa, a concordância entre patologistas foi considerável a substancial na avaliação da atipia/pleomorfismo do subtipo celular epitelióide, com maior discordância no subtipo fusiforme.

Histologicamente, os subtipos celulares encontrados nas neoplasias melanocíticas deste estudo foram epitelióides, fusiformes e células redondas. Esses achados assemelharam-se aos citados por Camargo et al. (2008), contudo, estes autores também descreveram a presença de células redondas,

balanosas em melanocitomas e melanomas cutâneos. No caso dos melanomas de cavidade oral a presença do padrão epitelióide foi observado com mais frequência no estudo realizado por Ramos-Vara et al. (2000). Teixeira et al. (2010) reportaram achados similares nos melanomas orais e melanocitomas num estudo realizado no Brasil com 186 cães. Outros tipos de células reportados para este tipo de neoplasias incluem: células de balão, anel de sinete e células claras (Smedley et al., 2011), mas não foram observadas nos casos examinados neste trabalho.

Mesmo que o tipo celular não apresente significado prognóstico nos cães (Goldschmidt, 1994) como apresenta nos felinos (Goldschmidt e Hendrick, 2002), os dados do presente estudo indicam que a avaliação da atipia/pleomorfismo em células epitelióides é um procedimento eficiente, visto que representam uma grande proporção nos tumores melanocíticos e são mais fáceis de avaliar que os núcleos das células fusiformes, que apresentam menos detalhes nucleares e maior variação dentro do estroma do tumor. Além disso, as células fusiformes tendem a se tornarem menos alongadas à medida que a atipia/pleomorfismo aumentou, como pôde ser observado pelo aumento da razão diâmetro menor / diâmetro maior e, dessa forma, no grau 3 elas podem ser confundidas com células epitelióides. Ressalta-se que tumores com marcado predomínio de células fusiformes e outros tipos celulares devem ser avaliados cuidadosamente, e se possível avaliados por imunohistoquímica.

A presença de infiltrado inflamatório no estroma tem sido relatada, mas não parece ter um significado prognóstico (Goldschmidt, 1994), porém, neste estudo, o infiltrado linfocitário esteve presente com maior frequência nos melanomas.

A necrose foi mais frequente nos melanomas com atipia/pleomorfismo grau 3, apesar desta característica ser relatada com frequência em neoplasias melanocíticas, a presença no estroma tumoral não tem implicação prognóstica nos cães (Goldschmidt, 1994; Smith et al., 2002).

Os critérios histopatológicos para o diagnóstico de neoplasias melanocíticas têm sua importância e nunca devem ser utilizados individualmente. A avaliação da atipia/pleomorfismo em células epitelióides é um procedimento eficiente, visto que estas células representam uma grande proporção nos tumores melanocíticos e são mais fáceis de avaliar que os núcleos das células

fusiformes. A escala atipia/pleomorfismo de células epitelioides, em conjunto com a avaliação histopatológica, é uma ferramenta útil que pode ser facilmente aplicada em um ambiente de laboratório de diagnóstico veterinário e contribuiria na avaliação unificada entre patologistas, embora sejam necessários estudos que correlacionem esta escala com o índice mitótico, índice de proliferação celular Ki67 e seguimento clínico dos cães para avaliação da sobrevida após o diagnóstico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE, R.; GUMPORT, S.L.; POPKIN, G.L.; REES, T.D. Cancer of the Skin. p. 24. London: W. B. Saunders, 1976. p.24.
- BERGIN, I.L.; SMEDLEY, R.C.; ESPLIN, D.G; SPANGLER, W.L.; KIUPEL, M. Prognostic Evaluation of Ki67 Threshold Value in Canine Oral Melanoma. *Veterinary Pathology*, v.48, n.1, p.48-41, 2011.
- BEN-EZRA, J.; JOHNSON, D.A.; ROSSI, J.; COOK, N.; WU, A. Effect of fixation on the amplification of nucleic acids from paraffin-embedded material by the polymerase chain reaction. *JHC*, v. 39, n. 3, p. 351-4, 1991.
- BOLON, B.; CALDERWOOD, M. B.; HALL, B. J. Characteristics of canine melanomas and comparison of histology and DNA ploidy to their biologic behavior. *Veterinary Pathology*, v.27, n.2, p.96-102, 1990.
- BOSTOCK, D.E. Prognosis after surgical excision of canine melanomas. *Veterinary Pathology*, v.16, n.1, p. 32-40, 1979.
- CAMARGO, L.P.; CONCEIÇÃO, L.G.; COSTA, P.R.S. Neoplasias melanocíticas cutâneas em cães: estudo retrospectivo de 68 casos (1996-2004). *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v.45, n.2, p.138-152, 2008.
- CAMPAGNE, C.; JULÉ, S.; ALLEAUME, C.; BERNEX, F.; EZAGAL, J.; CHÂTEAU-JOUBERT, S.; ESTRADA, M.; AUBIN-HOUZELSTEIN, G.; PANTHIER, J.J.; EGIDY, G. Canine melanoma diagnosis: RACK1 as a potential biological marker. *Veterinary Pathology*, v.50, n.6, p.1083-90, 2013.
- CECON, P.R.; SILVA, F.F.; FERREIRA, A.; FERRÃO, R.G.; CARNEIRO, A.P.S.; DETMANN, E.; FARIA, P.N.; MORAIS, T.S.S. Análise de medidas repetidas na avaliação de clones de café 'Conilon'. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.43, p.1171-1176, 2008.

GARMA-AVIÑA, A.; VALLI, E.; LUMSDEN, J.H. Cutaneous melanoma in domestic animals. *Journal of cutaneous pathology*, v.8, n.1, p. 3-24, 1981.

GOLDSCHMIDT, M.H. Pigmented lesions of the skin. *Clinics in Dermatology*, v.12, p.507–514, 1994.

GOLDSCHMIDT, M.H.; HENDRICK, M.J. 2002. Tumors of the skin and soft tissues. In: MEUTEN D.J. *Tumors in Domestic Animals*. 4ed. Iowa State: Ames, 2002. P.45-118.

GOLDSCHMIDT, M.H.; SHOFER, F.S. *Skin Tumors of the Dog and Cat*. Oxford: Butterworth Heinemann, 1992. P. 142–151.

GONÇALVES, R.V.; MEZÊNCIO, J. M. S.; BENEVIDES, G. P.; MATTA, S.L.P.; NEVES, C.A.; SARANDY, M.M.; VILELA, E.F. “Effect of gallium-arsenide laser, gallium-aluminum-arsenide laser and healing ointment on cutaneous wound healing in wistar rats,” *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 43, n.4, p. 350–355, 2010.

KOENIG, A.; BIANCO, S.; FOSMIRE, S.; WOJCIESZYN, J.; MODIANO, J. Expression and significance of p53, rb, p21/waf-1, p16/ink-4a, and PTEN tumor suppressors in canine melanoma. *Veterinary Pathology*, v.39, n.4, p.458-72, 2002.

LANDIS, J. R.; KOCH, G. G. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*, v. 33, n.1, p.159-174, 1977.

LAPRIE, C.; ABADIE, J.; AMARDEILH, M.F.; NET, J.L.; LAGADIC, M.; DELVERDIER, M. MIB-1 immunoreactivity correlates with biologic behaviour in canine cutaneous melanoma. *Vet Dermatol*, v.12,p.139–147, 2001.

MILLANTA, F.; FRATINI, F.; CORAZZA, M.; CASTAGNARO, M.; ZAPPULLI, V.; POLI, A. Proliferation activity in oral and cutaneous canine melanocytic tumours: correlation with histological parameters, location, and clinical behavior. *Research in Veterinary Science*, v.73, n.1, p.45–51, 2002.

MILLER, W.H.; GRIFFIN, C.E.; CAMPBELL, K.L. *Muller and Kirk’s Small Animal Dermatology*. 7. ed. St. Louis: 2013. P.938.

NISHIYA, A.T.; MASSOCO, C.O.; FELIZZOLA, C.R.; PERLMANN, E.; BATSCHINSKI, K.; TEDARDI, M.V.; GARCIA, J.S.; MENDONÇA, P.P.; TEIXEIRA, T.F.; ZAIDAN-DAGLI, M.L. Comparative Aspects of Canine Melanoma. *Veterinary Sciences*, v.19, n.3, p.1, 2016.

NOVAES, R. D.; GONCALVES, R. V.; CUPERTINO, M. C.; ARAÚJO, B.M.; REZENDE, R.M.; SANTOS,E.C.; LEITE,J.P.; MATT, S.L.P. The energy density of laser light differentially modulates the skin morphological reorganization in a murine model of healing by secondary intention, *International Journal of Experimental Pathology*, v. 95, n. 2, p. 138–146, 2014

RAMOS-VARA, J.A.; BEISSENHERZ, M.E.; MILLER, M.A.; JOHNSON, G.C.; PACE, L.W.; FARD, A.; KOTTLER, S.J. Retrospective Study of 338 Canine Oral Melanomas with Clinical, Histologic, and Immunohistochemical Review of 129 Cases. *Veterinary Pathology*, v.37, n.6, p.597-608, 2000.

ROELS, S.; TILMANT, K.R.D. PCNA and Ki67 proliferation markers as criteria for prediction of clinical behavior of melanocytic tumours in cats and dogs. *Journal of Comparative Pathology*, 121:13–24, 1999.

SÁNCHEZ, J; RAMIREZ, G.A; BUENDIA, A.J.; VILAFRANCA, M.; MARTINEZ, C.M.; ALTIMIRA; J; NAVARRO, J.A. Immunohistochemical Characterization and Evaluation of Prognostic Factors in Canine Oral Melanomas with Osteocartilaginous Differentiation. *Veterinary Pathology*, p.44, n.5, p. 676-682, 2007.

SARANDY. M.M.; NOVAES, R.D.; XAVIER, A.A.; VITAL, C.E.; LEITE, JP.V.; MELO, F.C. S.; GONÇALVES, R.V. Hydroethanolic Extract of *Strychnos pseudoquina* Accelerates Skin Wound Healing by Modulating the Oxidative Status and Microstructural Reorganization of Scar Tissue in Experimental Type I Diabetes, *BioMed Research International*, v. 2017,p. 1-11, 2017.

SCHATTON, T; FRANK, M.H. Cancer stem cells and human malignant melanoma. *Pigment cell and melanoma research*, v.21, n.1, p. 39-55, 2008.

SCHULTHEISS, P.C. Histologic features and clinical outcomes of melanomas of lip, haired skin, and nail bed locations of dogs. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v.18, n.4, p.422–425, 2006.

SMEDLEY, R.C.; SPANGLER, W.L.; ESPLIN, D.G; KITCHELL, B.E. ; BERGMAN, P. J. ; HO, H.Y.; BERGIN, I.L.; KIUPEL, M. Prognostic Markers for Canine Melanocytic Neoplasms: A Comparative Review of the Literature and Goals for Future Investigation. *Veterinary Pathology*, v.48, n.1, p.48-54, 2011.

SMITH S.H.; GOLDSCHMIDT, M.H.; MCMANUS, P.M. A Comparative review of melanocytic neoplasms. *Veterinary Pathology*, v.39, n.6, p.651-678, 2002.

SPANGLER, W. L.; KASS, D.P.H. The Histologic and Epidemiologic Bases for Prognostic Considerations in Canine Melanocytic Neoplasia. *Veterinary Pathology*, v.43, n.2, p.136–149, 2006.

SULAIMON, S.S.; KITCHELL, B.E.; EHRHART, E.J. Immunohistochemical detection of melanoma-specific antigens in spontaneous canine melanoma. *Journal of Comparative Pathology*, v.127, n.2-3, p.162-168, 2002.

Técnicas histológicas empregadas no Departamento de anatomia patológica - FCM – UNICAMP. Disponível em: <http://anatpat.unicamp.br/tecnicashistologicas.html#t5>.

TEIXEIRA, T.F.; SILVA, T.C.; COGLIATI, B.; NAGAMINE, N.K.; DAGLI, M.L.Z. Retrospective study of melanocytic neoplasms in dogs and cats. *Brazilian Journal of Veterinary Pathology*, v.3, n.2, p. 100–104, 2010

WHO. International Histological Classification of Epithelial and Melanocytic Tumors of the Skin of Domestic Animals. *Bulletin of the World Health Organization*, v.3, p. 106, 1998.

CAPÍTULO 2

IDENTIFICAÇÃO DE MUTAÇÕES DO GENE TP53 DOS EXONS 5 AO 8 EM NEOPLASIAS MELANOCÍTIAS CUTÂNEAS ESPONTÂNEAS EM CÃES

RESUMO

Vinte e cinco neoplasias melanocíticas cutâneas caninas provenientes do arquivo do Laboratório de Patologia do Departamento de Veterinária da UFV, fixados em formol tamponado e embebidos em parafina, foram incluídos no estudo para detecção de mutações do gene tp53 nos exons 5 ao 8. Os casos foram avaliados por dois patologistas para definir o diagnóstico. O DNA extraído com protocolo fenol-clorofórmio foi sequenciado e analisado para detecção de mutações. Todas as neoplasias melanocíticas apresentaram mutações no éxon 5 e em íntrons, sendo que dois casos também apresentaram mutações individuais.

Palavras-chaves: caninos, melanoma, melanocitoma, pele, sequenciamento gênico

ABSTRACT

Twenty-five canine cutaneous melanocytic neoplasm from the archive of the Laboratory of Pathology of the Veterinary Department of the UFV, fixed in buffered formalin and embedded in paraffin, were included in the study to detect mutations of the tp53 gene in exons 5 to 8. Two pathologists evaluated the cases to define the diagnosis. DNA was extracted with phenol-chloroform protocol; it was sequenced and analyzed for mutation detection. All the melanocytic neoplasms presented mutations in the exon 5 and introns, and two cases presented individual mutations.

Keywords: canines, melanoma, melanocytoma, skin, gene sequencing

INTRODUÇÃO

Mutações genéticas sequenciais têm sido correlacionadas com o desenvolvimento e progressão de vários cânceres em medicina humana, estas alterações genéticas também têm sido relatadas em humanos com melanoma e modelos animais experimentais (Koenig et al., 2002; Benevenuto et al., 2012; Tanaka et al., 2013). O gene tp53 codifica uma proteína nuclear (P53 ou TP53) que é essencial para a manutenção da integridade do DNA e é considerada como

um dos fatores supressores de tumor mais importantes (Koenig et al., 2002; Oliveira et al., 2017). Mutações do tp53 demonstraram ter relação direta com o desenvolvimento e progressão do câncer, ocorrendo em 50-55% das neoplasias em humanos. A maioria destas mutações encontram-se nos exons 5 ao 8, sendo as substituições “*missense*” as mais frequentes (Hinds et al., 1990; Moura-Gallo et al., 2004).

Câncer de mama, sarcomas dos ossos e tecidos moles, tumores cerebrais e carcinomas adrenocorticais são frequentemente associados a mutações e polimorfismo deste gene (Wang et al., 2004; Petitjean et al., 2007). Outros tipos de câncer menos frequentes incluem leucemia, câncer de estômago e câncer colorretal e esôfago (Petitjean et al., 2007; Wang et al., 2010). Em cães existem alguns estudos realizados em tumores mamários, que demonstraram expressão diminuída e heterogênea com acúmulo no citoplasma da proteína TP53, assim como mutações do gene localizadas nos exons 4 ao 8 (Koenig et al., 2002; Souza et al., 2012; Oliveira et al., 2017).

As técnicas de biologia molecular oferecem ferramentas que permitem definir o diagnóstico e prognóstico, assim como monitoramento e decisões terapêuticas para doenças como o câncer (Scorsato e Telles, 2011). Os avanços tecnológicos e metodológicos da biologia molecular permitiram que amostras biológicas incluídas em parafina possam ser utilizadas como fonte de estudos genéticos retrospectivos de inúmeras doenças (Okello et al., 2010; Scorsato e Telles, 2011). O DNA pode ser eficientemente recuperado de tecidos embebidos em parafina através de vários protocolos de extração que estão descritos na literatura (Mesquita et al. 2001, Mirshahabi et al., 2007; Netto et al. 2015), porém, o protocolo fenol-clorofórmio parece ser o mais eficiente (Netto et al. 2015).

DNA de alta qualidade extraído de espécimes adequadamente preservados e armazenados podem suportar análises genéticas e epigenéticas (Pikor et al., 2011). A quantidade e qualidade, assim como o sucesso na amplificação dependem do processamento histológico (fixação e parafinização), tipo e quantidade do tecido, tempo e condições de armazenamento dos blocos de parafina. Tais fatores podem causar alterações significativas na estrutura e constituição do DNA (Ben-Ezra et al. 1991; Isola, J. et al. 1994; Barea et al., 2004; Santos et al., 2008; Vilanova-Costa et al., 2008).

As neoplasias melanocíticas são consideradas frequentes na cavidade oral em cães, e ocorrem com menos frequência na pele, olhos, aparelho ungueal e regiões de mucocutâneas (Goldschmidt e Hendrick, 2002; Smith et al 2002; Smedley et al., 2011). Além disso, as dificuldades na prática clínica de obter e conservar amostras adequadamente dificultam a realização de estudos, dessa forma blocos de parafina são uma fonte valiosa de material genético para a realização de técnicas de biologia molecular.

Dada a importância do gene *tp53* na patogenia de diversas neoplasias em humanos e animais, este estudo teve como objetivo realizar o sequenciamento dos exons 5 ao 8 do gene *tp53* em cães com neoplasias melanocíticas cutâneas espontâneas à partir de DNA extraído de material parafinado.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram incluídas no estudo 40 amostras de tecido provenientes do arquivo do Laboratório de patologia do Departamento de Veterinária da UFV, fixados em formol tamponado e embebidos em parafina, com diagnóstico de melanoma e melanocitomas cutâneos em cães. As lâminas histológicas coradas com HE ou despigmentadas foram avaliadas por 2 patologistas para definir o diagnóstico. Casos com comportamento biológico indeterminados não foram utilizados no estudo.

Dez cortes histológicos de 8 µm de espessura da amostra incluída em parafina foram cortados como micrótomo limpo para extração do DNA. O excesso de parafina ao redor do tecido foi retirado manualmente, com o auxílio de tesoura e pinça fina, o material foi transferido para um tubo de micro centrifugação de 2 mL e mantido à temperatura ambiente até o momento da extração. A desparafinização foi realizada utilizando dois banhos de xilol (1200 µl), vortexando vigorosamente por 10 segundos e centrifugando por 5 minutos a 20.200xg em temperatura ambiente (15-25°C), descartando-se o sobrenadante. O xilol foi retirado realizando dois banhos em etanol (95-100%) na mesma proporção utilizada no xilol (Cao et al., 2003; Nascimento et al. 2003). O pellet foi mantido a 37°C durante 15 a 30 minutos ou até o etanol residual evaporar. A extração do DNA foi realizada usando o protocolo fenol-clorofórmio (Netto et al. 2015) e a digestão das proteínas com solução de proteinase K (10µg/µl),

incubando “overnight” a 50-60°C em banho-maria. O DNA extraído foi quantificado com espectrofotômetro Nanovu® (GE), utilizando o fator de correção 37, sendo a integridade verificada com eletroforese em gel de agarose 2% e coradas com brometo de etídio (10mg/ml).

Os *primers* empregados para amplificar a sequência genômica do gene *tp53* dos exons 5 ao 8 (U62133.1, Genebank) foram desenhados por meio do programa PrimerQuest Idt (<https://www.idtdna.com/PrimerQuest/Home/Index>) (Tabela 1). A PCR convencional foi realizada sob as seguintes condições: 25 µl Go Taq® Green Master Mix 1x (Promega), 1.5 µl de cada primer (*forward* e *reverse*), 5 µl DNA, 10 µl BSA (10mg/ml) e 7 µl H₂O, com um volume final de 50 µl e 3 repetições por amostra. A reação realizada em termociclador (Veriti™ 96-Well, Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific) com ciclos de temperatura para desnaturação inicial a 95°C/2 minutos, seguida de 40 ciclos de desnaturação a 95°C/1 minuto, anelamento a 63 – 60°C/1minuto para o primer um e dois, respectivamente e extensão a 73°C/1:30 minutos, seguidos de extensão final a 73°C/5 minutos.

Tabela 1. Sequências específicas dos *primers* usados pra amplificação dos exons 5 ao 8 do gene *tp53* usando reação em cadeia da polimerase (PCR) em neoplasias melanocíticas em cães.

Exons	Primers	TA (°C)
5 e 6	1 F:GGAATAGACCCCGACCCCT R:GCAGAATGGGATGACCCACC	63
7 e 8	2 F: TGCATGGGAGGCATGAACCG R:TCCCCCTTCTTGTGGAAATTC	60

TA: Temperatura de anelamento

O resultado de PCR foi purificado do gel de agarose 2% usando o kit Wizard SV Gel and PCR clean-up System (Promega). Este protocolo foi realizado de acordo com as indicações do fabricante. Posteriormente, os amplicons foram liofilizados e enviados para sequenciamento pela técnica de Sanger no laboratório ACTGENE (Alvorada/RS). As sequências foram editadas, analisadas e comparadas com a sequência genômica do gene *tp53* dos exons 5 ao 8 (U62133.1, Genebank) com ajuda do *software* Bioedit versão 7.0.5.3 (Hall, 1999).

Os procedimentos laboratoriais de extração e amplificação foram realizados por um único pesquisador.

RESULTADOS

O DNA extraído do material parafinado encontrava-se degradado, e em algumas amostras não-viável para amplificação por PCR (figura 1A). Outra dificuldade enfrentada foi a alta concentração de pigmento melânico presente nas neoplasias melanocíticas cutâneas caninas que apresentou efeito negativo na amplificação (figura 1B), razão pelo qual foram acrescentados 50µg de BSA por cada 25 µl de reação (figura 1C), sendo possível amplificar e sequenciar os exons 5 ao 8 do gene tp53 em 25 casos de neoplasias cutâneas melanocíticas, dos quais, 17 eram melanomas e 8 melanocitomas.

Todas as neoplasias melanocíticas cutâneas sequenciadas apresentaram mutações do gene Tp53 (tabela 2, figura 2). Encontrando-se a adição do códon TAC, que codifica para o aminoácido tirosina, no éxon 5 (figura 3) e mutações (inserção, deleção e substituição) nos íntrons de melanomas e melanocitomas, no entanto, a inserção do TAC não estava no *open reading frame* aberto do éxon.

Tabela 2. Mutações nos exons 5 ao 8 do gene tp53 identificadas nas neoplasias melanocíticas cutâneas em cães.

Mutação	Localização	Exons
Exons 5-6/ íntrons		
Inserção 3 bases (TAC/ tirosina)	743-744-745	5
Inserção base (G)	974	Íntrons
Exons 7 e 8/ íntrons		
Substituição base (G por A)	1211	Íntrons
Inserção de base(A)	1492	Íntrons
Deleção base (G)	1555	Íntrons
Deleção base (G)	1566	Íntrons
Substituição de base (AG por GA)	1589-1590	Íntrons

Localização dos exons na sequência do gene TP53 dos exons 5 ao 8 (U62133.1, Genebank): 5, 743- 926; 6, 1007-1119; 7, 1342-1451; 8, 1714-1848.

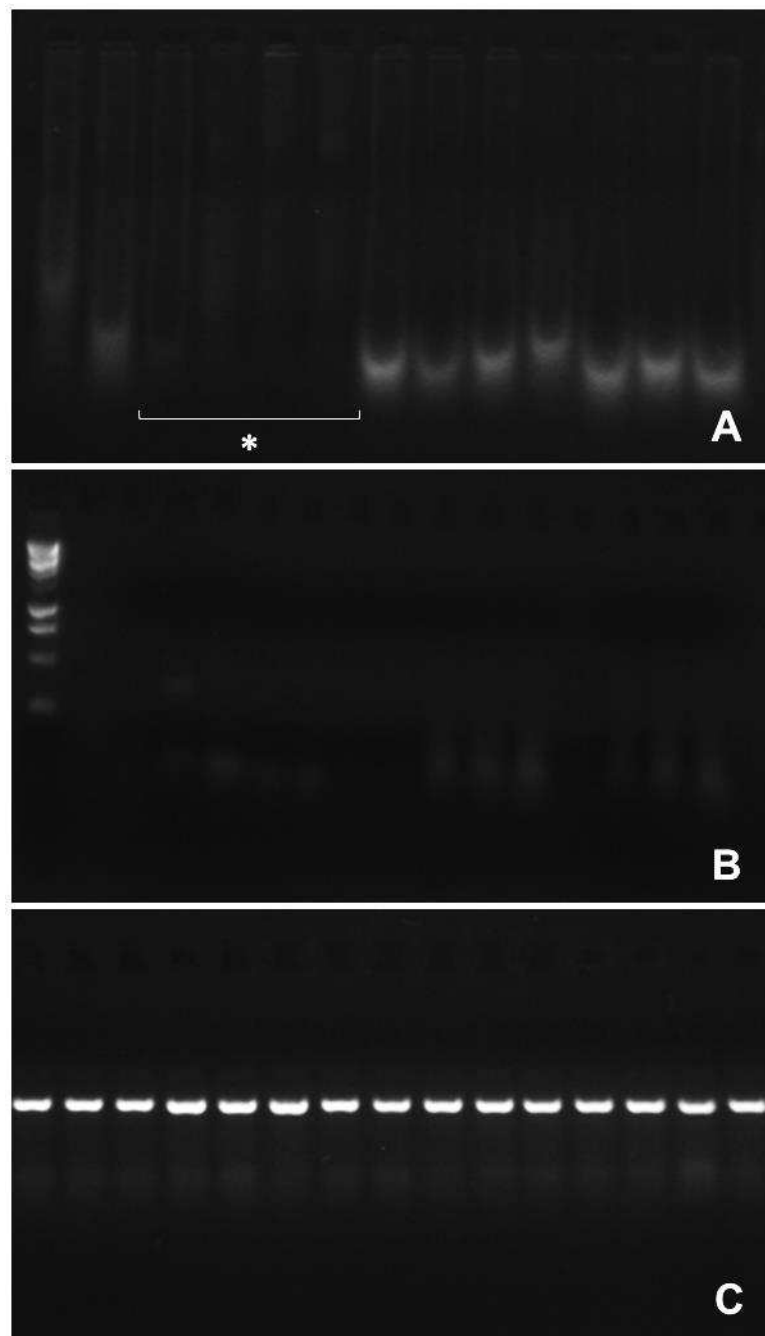


Figura 1. A. DNA extraído do material parafinado pela técnica fenol-clorofórmio nas neoplasias melanocíticas cutâneas em cães. Pode-se notar a degradação do DNA e em algumas amostras não foi possível a extração (*). B. produtos de PCR do gene TP53 dos exons 7 e 8 amplificados sem adição de BSA. C. Amplicons do gene TP53 dos exons 7 e 8 amplificados adicionando 50 μ g de BSA por cada 25 μ l de reação (10mg/ml).

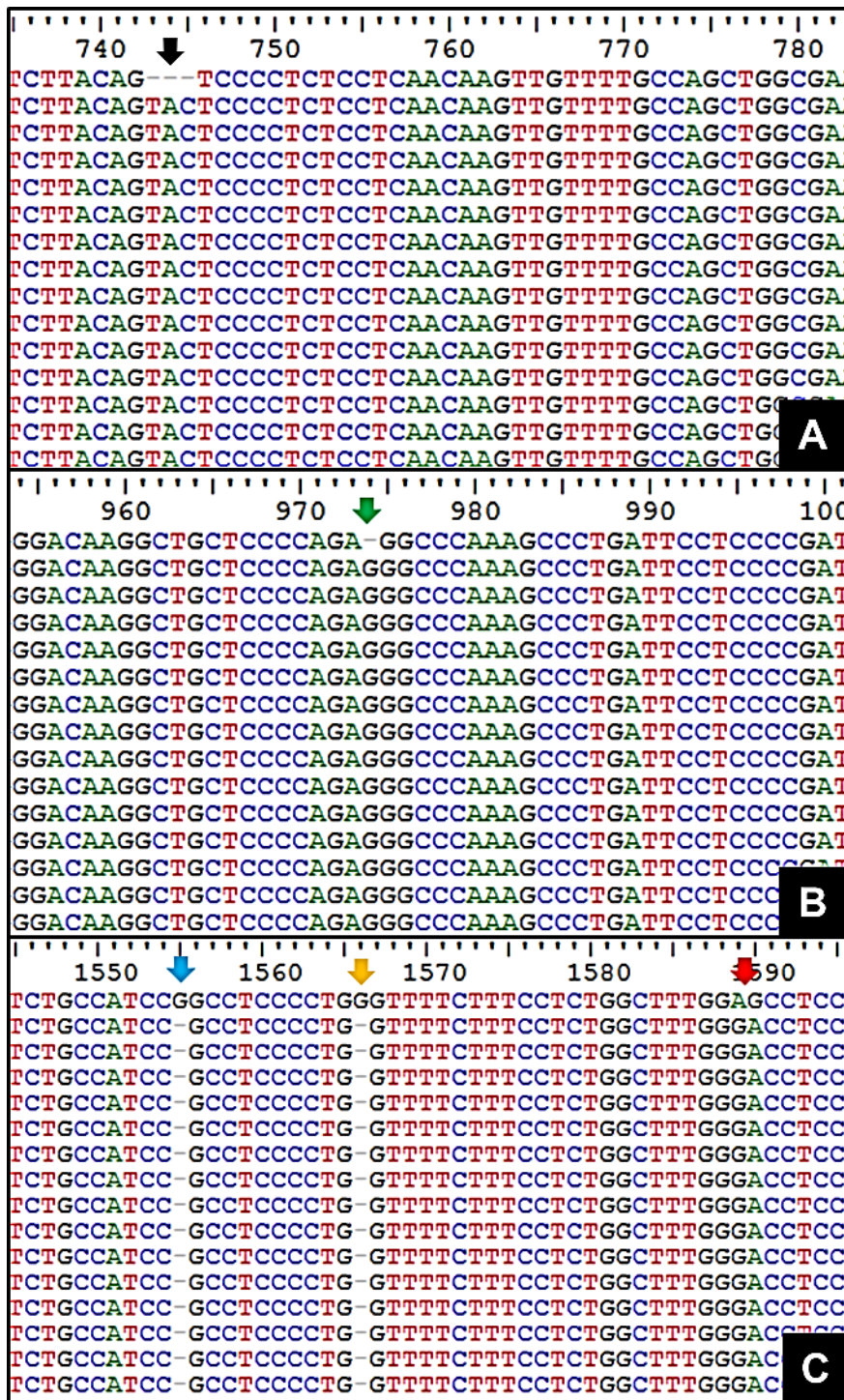


Figura 2. Mutações encontradas nas neoplasias melanocíticas cutâneas em cães. Nas três imagens a primeira linha corresponde a sequência do gene TP53 nos exons 5 ao 8 (U62133.1, Genbank) canino usado como referência. A. Adição de 3 bases que correspondem a inserção do códon TAC (seta preta). B. Inserção de base (seta verde). C. Deleção de base (seta azul e laranja) e substituição dois bases (seta vermelha).

tcc	cct	ctc	ctc	aac	aag	ttg	ttt	tgc	cag	ctg	gcg	aag	acc	tgc	ccc	gtg	cag	ctg	tgg
S	P	L	L	N	K	L	F	C	Q	L	A	K	T	C	P	V	Q	L	W
gtc	agc	tcc	cca	ccc	cca	ccc	aat	acc	tgc	gtc	cgc	gct	atg	gcc	atc	tat	aag	aag	tcg
V	S	S	P	P	P	P	N	T	C	V	R	A	M	A	I	Y	K	K	S
gag	ttc	gtg	acc	gag	gtt	gtg	cgg	cgc	tgc	ccc	cac	cat	gaa	cgc	tgc	tct	gac	agt	agt
E	F	V	T	E	V	V	R	R	C	P	H	H	E	R	C	S	D	S	S
gac																			
D																			
																			A
tac	tcc	ctc	ctc	aac	aag	ttg	ttt	tgc	cag	ctg	gcg	aag	acc	tgc	ccc	gtg	cag	ctg	
Y	S	P	L	L	N	K	L	F	C	Q	L	A	K	T	C	P	V	Q	L
tgg	gtc	agc	tcc	cca	ccc	cca	ccc	aat	acc	tgc	gtc	cgc	gct	atg	gcc	atc	tat	aag	aag
W	V	S	S	P	P	P	P	N	T	C	V	R	A	M	A	I	Y	K	K
tcg	gag	ttc	gtg	acc	gag	gtt	gtg	cgg	cgc	tgc	ccc	cac	cat	gaa	cgc	tgc	tct	gac	agt
S	E	F	V	T	E	V	V	R	R	C	P	H	H	E	R	C	S	D	S
agt	gac																		
S	D																		
																			B

Figura 3. Sequência de aminoácidos codificados pelo éxon 5 do gene TP53 em cães. A. Sequência de referência (U62133.1, Genbank) B. sequencias de neoplasias melanocíticas cutâneas, notar inserção do códon TAC (tirosina) no início da sequência. Área realçada em vermelho corresponde a ORF (*open reading frame*). Expsy Bioinformatics Resource portal (<https://web.expsy.org/translate/>)

DISCUSSÃO

O gene supressor de tumor tp53 codifica um fator de transcrição que é ativado em resposta a várias formas de estresse celular e exerce múltiplas funções antiproliferativas (Vogelstein et al., 2000). Alterações de TP53 parecem ser um evento tardio na progressão do melanoma. Tais alterações podem incluir a deleção do gene ou mutações que silenciam o gene, perturbam os domínios de ligação ao DNA ou alteram a estabilidade ou a localização subcelular da proteína. Entretanto, muitas outras proteínas que interagem com TP53 afetam sua estabilidade e localização subcelular (Levine, 1997; Hupp, 1999) assim, a superexpressão da proteína TP53 em células tumorais não implica necessariamente mutação ou perda do genet p53 (Dix, 1994; Hupp, 1999).

A maioria das mutações TP53 encontradas em neoplasias em humanos são substituições missense (75%), resultantes da substituição de um nucleotídeo que se agrupa dentro do domínio de ligação de DNA da proteína. Essas proteínas mutantes geralmente se acumulam no núcleo das células tumorais e são retidas em metástases à distância. Além disso, os mutações mais frequentes mostraram ser capazes de cooperar com oncogenes para transformação celular (Hinds et al., 1990).

Outras alterações incluem inserções e deleções (9%), mutações sem sentido ou nonsense (7%), mutações silenciosas (5%) e outras alterações

infrequentes (Olivier et al., 2002). Estes tipos de mutações nos exons 5 ao 8 são frequentemente encontradas em vários tipos de câncer (Petitjean et al, 2007, Souza et al., 2012; Oliveira et al., 2017).

Deleções da região que contém o gene TP53 já foram relatadas em melanomas orais em cães (Segoula et al., 2018). Neste estudo, os tumores sequenciados apresentaram inserção do códon TAC, que codifica para tirosina, no éxon 5 e mutações de substituição, inserção e deleção de bases em íntrons, com a mesma localização e frequência nos melanocitomas e melanomas. Porém, há diferença do comportamento biológico e fenotípica entre ambos os tumores.

Em tumores melanocíticos, o comportamento biológico é determinado a partir da atipia nuclear, taxa mitótica e pleomorfismo, existindo critérios definidos para atipia e o índice mitótico (Roels et al., 2001; Spangler e Kass, 2006; Bergin et al. 2011; Smedley et al., 2011). Considera-se então, que o diagnóstico de melanocitoma deve ser dado quando a contagem em dez campos de 400X é inferior a três mitoses e atipia discreta, já nos melanomas cutâneos a contagem é acima de três mitoses para melanomas cutâneos e 4 para lábios, podendo apresentar discreta a intensa atipia. Também, existe diferença na expressão do Ki67 entre ambos tipos de tumor. Sendo que o prognóstico será desfavorável em tumores melanocíticos exibindo atipia maior a 20% e marcação de Ki67 acima de 15% (Smedley et al., 2011). Além disso, os melanomas apresentam maior tamanho que os melanocitomas (Smith et al., 2002).

Na medicina humana, mutações do tp53 foram correlacionados com maior prevalência de tumores cerebrais, e com idade mais precoce de aparecimento de neoplasias mamárias. Mutações deste gene também são marcadores independentes de mau prognóstico em câncer de mama, e o tipo exato e a posição da mutação influenciam o desfecho clínico (Olivier et al., 2006; Petitjean et al., 2007).

Em cães, existem estudos realizados em tumores mamários, que demonstraram a expressão heterogênea da proteína TP53 e mutações do tp53 localizadas nos exons 4 ao 8 (Souza et al., 2012; Oliveira et al., 2017). Apesar disso, a expressão do gene tp53 não é considerada como um marcador individual de agressividade em carcinomas mamários caninos e outros critérios também devem ser avaliados para definir o prognóstico (Oliveira et al., 2017).

Roels et al. (2001) avaliaram a expressão da proteína TP53 em neoplasias melanocíticas de cães e gatos. Estes autores concluíram que o TP53 não se correlacionava significativamente com a sobrevivência dos animais incluídos no estudo.

Os resultados do presente estudo sugerem que mutações no gene *tp53*, nos exons 5 ao 8, não têm importância diagnóstica para neoplasias melanocíticas cutâneas em cães, pois, tanto as amostras de melanomas como de melanocitomas apresentaram os mesmos tipos de mutações. Apesar de não existir diferenças entre melanocitomas e melanomas as mutações de *tp53* podem ser importantes na carcinogênese em neoplasias melanocíticas, sendo necessários estudos em mutações em outros exons do *tp53*, expressão gênica, bem como o estudo de outros oncogenes podem elucidar os mecanismos moleculares que expliquem as diferenças fenotípicas entre melanocitomas e melanomas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAREA, J.A.; PARDINI, M.I.M.C.; GUSHIKEN, T. Extração de DNA de materiais de arquivo e fontes escassas: revisão e apontamentos sobre as possíveis aplicações. *NewsLab*, v. 63, p. 96–114, 2004.
- BENEVENUTO, B.A.; ESQUICHE, J.; CARLOS, R.; DELGADO, W.D.; MOSQUEDA, A.; ALMEIDA, O.P. Immunohistochemical Expression of p16, p21, p27 and Cyclin D1 in Oral Nevi and Melanoma. *Head and Neck Pathology*, v.6, n.3, p.297–304, 2012.
- BERGIN, I.L.; SMEDLEY, R.C.; ESPLIN, D.G.; SPANGLER, W.L.; KIUPEL, M. Prognostic Evaluation of Ki67 Threshold Value in Canine Oral Melanoma. *Veterinary Pathology*, v.48, n.1, p.48-41, 2011.
- CAO, W.; HASHIBE, M.; RAO, J.Y.; MORGENSTERN, H.; ZHANG, Z.F. Comparison of methods for DNA extraction from paraffin-embedded tissues and buccal cells. *Cancer Detection and Prevention*, v.27, n. 5, p. 397–404, 2003.
- DIX, B.; ROBBINS, P.; CARRELLO, S.; HOUSE, A.; IACOPETTA, B. Comparison of p53 gene mutation and protein overexpression in colorectal carcinomas. *British Journal of Cancer*, v.70, p. 585-590, 1994

GILLARD, M.; CADIEU, E.; DE BRITO, C.; ABADIE, J.; VERGIER, B.; DEVAUCHELLE, P.; Degorce, F.; Dréano, S.; Primot, A.; Dorso, L.; Lagadic, M.; Galibert, F.; Hédan, B.; Galibert, M.D.; André, C. Naturally occurring melanomas in dogs as models for non-UV pathways of human melanomas. *Pigment Cell Melanoma Research*, v.27, n. 1, p.90–102, 2014.

GOLDSCHMIDT, M.; HENDRICK, M. *Tumors of the Skin and Soft Tissues*; Iowa State Press: Ames, IA, USA, p. 78–84, 2002.

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41:95-98, 1999.

HERNANDEZ, B.; ADISSU, H.A.; WEI, B.R.; MICHAEL, H.T.; MERLINO, G.; SIMPSON, R.M. Naturally Occurring Canine Melanoma as a Predictive Comparative Oncology Model for Human Mucosal and Other Triple Wild-Type Melanomas. *International Journal of Molecular Sciences*, n. 19, v. 2, p. E394.

HINDS, P.W.; FINLAY, C.A.; QUARTIN, R.S.; BAKER, S.J.; FEARON, E.R.; VOGELSTEIN, B.; LEVINE A.J. Mutant p53 DNA clones from human colon carcinomas cooperate with ras in transforming primary rat cells: a comparison of the 'hot spot' mutant phenotypes. *Cell Growth Differ*, v.1, n.12, p.571-80, 1990.

HUPP T.R. Regulation of p53 protein function through alterations in protein-folding pathways, *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 55, p.88-95, 1999.

ISOLA, J.; DEVRIES, S.; CHU, L.; GHAZVINI, S.; WALDMAN, F. Analysis of change in DNA sequence copy number by comparative genomic hybridization in archival paraffinembedded tumor sample. *The American Journal of Pathology*, v.145, n.6, p.1301-8, 1994.

KOENIG, A.; BIANCO, S.; FOSMIRE, S.; WOJCIESZYN, J.; MODIANO, J. Expression and significance of p53, rb, p21/waf-1, p16/ink-4a, and PTEN tumor suppressors in canine melanoma. *Veterinary Pathology*, v.39, n.4, p.458-72, 2002.

LEVINE, A.J. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell*, v. 88, p. 323–331, 1997.

MIRSHAHABI, H.; MESHKAT, Z.; SOLEYMANJAH, H.; MOHAMMAD H. Z.; MESHKAT, M. Different DNA extraction methods for paraffin-embedded pathological samples, *Iranian Journal of Pathology*, v.2, n.4, p.159-164, 2007.

MESQUITA, R. A. et al. Avaliação de três métodos de extração de DNA de material parafinado para amplificação de DNA genômico pela técnica da PCR. *Pesquisa Odontológica Brasileira*, v.15, n.4, p. 314-9, 2001.

MOURA-GALLO, C.V.; SIMÃO, T.A.; RIBEIRO, F.S. et al. Mutações no gene TP53 em tumores malignos de mama: associação com fatores de risco e características clínico-patológicas, inclusive risco de óbito, em pacientes residentes no Rio de Janeiro. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, v.7, p.167-175, 2004.

NASCIMENTO, E.M.; SPINELLI, M.O.; RODRIGUES, C.J.; BOZZINI, N. Protocolo da extração de DNA de material parafinado para análise de microssatélites em leiomioma. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v. 39, n. 3, 2003.

NETTO, M.S.C.; ALVESA, A.L.C.; CARVALHO, E.F.; GARRIDO, R.G.; SILVA, D.A. DNA extraction and purification from archival material: Revisiting the standard operating procedure. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, v. 5, p. e574–e575, 2015.

OKELLO, J.B.A.; ZUREK, J.; DEVAULT, A.M.; KUCH, M.; OKWI, A.L.; SEWANKAMBO, N.K.; BIMENYA, G.S.; POINAR, D.; POINAR, H.N. Comparison of methods in the recovery of nucleic acids from archival formalin-fixed paraffin-embedded autopsy tissues. *Analytical Biochemistry*, n. 400, p. 110–117, 2010.

OLIVEIRA, T.F.; MAUÉS, T.; RAMUNDO, FIGUEIREDO, A.M.S.; DE MELLO, M.F.V.; EL-JAICK, K.B.; FERREIRA, M.L.G.; FERREIRA, A.M.R. TP53 gene expression levels and tumor aggressiveness in canine mammary carcinomas. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 29, n.6, p.865–868, 2017.

OLIVIER, M.; EELES, R.; HOLLSTEIN, M.; KHAN, M.A.; HARRIS, C.C.; HAINAUT, P. The IARC TP53 database: new online mutation analysis and recommendations to users. *Human Mutation*, v.19, p. 607–614, 2002.

OLIVIER, M.; LANGERØD, A.; CARRIERI, P.; BERGH, J.; KLAAR, S.; EYFJORD, J.; THEILLET, C.; RODRIGUEZ, C.; LIDEREAU, R.; BIÈCHE, I.; VARLEY, J.; BIGNON, Y.; UHRHAMMER, N.; WINQVIST, R.; JUKKOLA-VUORINEN, A.; NIEDERACHER, D.; KATO, S.; ISHIOKA, C.; HAINAUT, P.; BØRRESEN-DALE, A.L. The clinical value of somatic TP53 gene mutations in 1,794 patients with breast cancer. *Clinical Cancer Research*, v.12, p.1157–1167, 2006.

PETITJEAN, A.; ACHATZ, M.I.W.; BORRESEN-DALE, A.L.; HAINAUT, P.; OLIVIER, M. TP53 mutations in human cancers: functional selection and impact on cancer prognosis and outcomes. *Oncogene*, v.26, p. 2157–2165, 2007.

PIKOR, L.A.; ENFIELD, K.S.S.; CAMERON, H.; LAM, W.L. DNA Extraction from Paraffin Embedded Material for Genetic and Epigenetic Analyses. *Journal of Visualized Experiments*, v.49, p.e2763, 2011.

ROELS, S.; TILMANT, K.; DUCATELLE, R. p53 expression and apoptosis in melanomas of dogs and cats. *Research in Veterinary Science*, v. 70, p. 19-25, 2001.

SANTOS, M.C.; SAITO, C.P.; LINE, S.R. Extraction of genomic DNA from paraffin-embedded tissue sections of human fetuses fixed and stored in formalin for long periods. *Pathology - Research and Practice*, v.204, p. 633-6, 2008.

SCORSATO, A. P.; TELLES, J. E. Q. Fatores que interferem na qualidade do DNA extraído de amostras biológicas armazenadas em blocos de parafina. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v. 47, n. 5, p. 541, 2011.

SEGAOULA, Z.; PRIMOT, A.; LEPRETRE, F.; HEDAN, B.; BOUCHAERT, E.; MINIER, K.; MARESCAUX, L.; SERRES, F.; GALIÈGUE-ZOUITINA, S.; ANDRÉ, C.; QUESNEL, B.; THURU, X.; TIERNY D. Isolation and characterization of two canine melanoma cell lines: new models for comparative oncology. *BMC Cancer*, v.18, n.1, 1219, 2018.

SMEDLEY, R.C.; SPANGLER, W.L.; ESPLIN, D.G; KITCHELL, B.E.; BERGMAN, P. J. ; HO, H.Y.; BERGIN, I.L.; KIUPEL, M. Prognostic Markers for Canine Melanocytic Neoplasms: A Comparative Review of the Literature and Goals for Future Investigation. *Veterinary Pathology*, v.48, n.1, p.48-54, 2011.

SMITH S.H.; GOLDSCHMIDT, M.H.; MCMANUS, P.M. A Comparative review of melanocytic neoplasms. *Veterinary Pathology*, v.39, n.6, p.651-678, 2002.

SOUZA, D.M.B.; BARROS, M.G.O.; SILVA, J.S.C.; SILVA, M.B.; COLETO, Z.F.; JIMENEZ, G.C.; ADRIÃO, M.; WISCHRAL, A. Detection of mutations within exons 4 to 8 of the p53 tumor suppressor gene in canine mammary glands. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.64, n.2, p.341-348, 2012.

SPANGLER, W. L.; KASS, D.P.H. The Histologic and Epidemiologic Bases for Prognostic Considerations in Canine Melanocytic Neoplasia. *Veterinary Pathology*, v.43, n.2, p.136-149, 2006.

TANAKA, R.; KOYANAGI, K.; NARITA, N; KUO, C; HOON, B.C. Prognostic 1414
Molecular Biomarkers for Cutaneous Malignant Melanoma. *Journal of* 1415
Surgical Oncology, v.104, n.4, p.438–446, 2011.

VILANOVA-COSTA, C.A.S.T.; NÓBREGA, J.B.; CRUZ, R.S.A.D. Extração e
Purificação de DNA em material biológico parafinado, *Estudos*, v. 35, p. 143–152,
2008.

VOGELSTEIN, B.; LANE, D.; LEVINE, A.J. Surfing the p53, network. *Nature*, v.
408, p.307–310, 2000.

WANG, B.; WANG, D.; ZHANG, D.; LI, A.; LIU, D.; LIU, H.; JIN, H. Pro variant of
TP53 Arg72Pro contributes to esophageal squamous cell carcinoma risk:
evidence from a meta-analysis. *European Journal of Cancer Prevention*, v.19, n.
4, p.299-307, 2010.

WANG, Y.; KRINGEN, P.; KRISTENSEN, G.B.; HOLM, R.; BAEKELANDT, M.M.;
OLIVIER, M.; SKOMEDAL, H.; HAINAUT, P.; TROPÉ, C.G.; ABELER, V.M.;
NESLAND, J.M.; BORRESEN-DALE, A.L.; HELLAND, A. Effect of the codon 72
polymorphism (c.215G>C, p.Arg72Pro) in combination with somatic sequence
variants in the TP53 gene on survival in patients with advanced ovarian
carcinoma. *Human Mutation*, v. 4, p. 21–34, 2004.

CONCLUSÕES GERAIS

- As lesões melanocíticas foram constituídas por os subtipos celulares epitelióides fusiformes e células redondas, com predomínio de células epitelioides nos melanomas e redondas pequenas e epitelioides nos melanocitomas.
- A atipia/pleomorfismo nos melanomas variou de discreta a intensa, observando-se aumento proporcional do índice mitótico à medida que diminui o grau de diferenciação celular.
- A avaliação da atipia/pleomorfismo em células epitelioides é um procedimento eficiente, visto que estas células representam uma grande proporção nos tumores melanocíticos e são mais fáceis de avaliar que os núcleos das células fusiformes.
- As neoplasias melanocíticas cutâneas em cães apresentaram mutações do gene tp53 no éxon 5 e íntrons com a mesma localização e frequência nos melanocitomas e melanomas.

ANEXOS

Anexo 1. Caracterização dos cães acometidos por neoplasias melanocíticas.

Caso	Ficha	Neoplasia melanocítica	Raça	Idade (anos)	Sexo	Tamanho (cm)	Localização
1	3986	Melanoma	Cocker	10	F	0.5	Periocular
2	4212	Melanoma	SRD	7	F	NI	Cervical
3	4322	Melanoma	SRD	NI	M	2	Pálpebra
4	4775 A	Melanoma	Rottweiler	5	F	2	Digito
5	6071	Melanoma	Boxer	9	F	8	Abdome
6	6508 1	Melanoma	SRD	4	M	4	Orelha
7	79532	Melanoma	SRD	14	F	NI	Axila
8	87781A	Melanoma	Schnauzer	6	F	4	Abdome
9	70491	Melanoma	Rottweiler	10	F	3	Digito
10	74842	Melanoma	SRD	13	F	NI	Mamas
11	7734	Melanoma	SRD	11	F	NI	Digito
12	5631M	Melanoma	Pinscher	8	F	1.5	NI
13	5816	Melanoma	Beagle	17	M	1.5	Olho
14	420640	Melanoma	Teckel	13	M	0.8	Flanco
15	433606B2	Melanoma	SRD	10	M	1.3	NI
16	442917B1	Melanoma	Pit Bull	12	M	2	Abdome
17	44169 B1B	Melanoma	Dálmata	6	F	3.5	Abdome
18	446818	Melanoma	Shih Tzu	5	F	2	Membro pélvico
19	447468B2	Melanoma	Pinscher	12	F	1.8	Escapula
20	450920	Melanoma	SRD	2	F	3.8	Digito
21	454493	Melanoma	Lhasa Apso	8	F	1.0	Pálpebra
22	456078	Melanoma	NI	5	M	6.5	Abdome
23	28514 B1B	Melanoma	Schnauzer	10	F	1.3	Digito
24	464627B1	Melanoma	Labrador	12	F	2.5	Digito
25	151014 B1	Melanoma	SRD	13	F	1.0	Digito
26	472377B1	Melanoma	Labrador	14	F	3.5	Digito
27	473000	Melanoma	Dobermann	4	M	2.0	Membro pélvico
28	476086 ma-me	Melanoma	SRD	12	F	2.5- 1.5	Face
29	476931	Melanoma	Lhasa Apso	9	F	0.5	Olho
30	4105691	Melanoma	York Shire	12	M	1.6	Digito

31	4131954	Melanoma	Lhasa Apso	15	F	0.6	Pálpebra
32	90824	Melanoma	SRD	9	F		Abdome
33	559202	Melanoma	Pastor alemão	NI	F	1	Lábio
34	564038	Melanoma	Boxer	NI	M	2.8	Patela
35	578563	Melanoma	Rottweiler	NI	F	2.9	Lábio
36	547031	Melanoma	Labrador	NI	M	1.3	Digito
37	6239	Melanoma	Beagle	12	F	NI	Lábio
38	8699	Melanoma	Poodle	10	F	NI	Região pélvica
39	75761	Melanoma	Poodle	10	F	NI	Lábio
40	92653	Melanoma	SRD	13	F	NI	Lábio
41	4471021B1	Melanoma	Rottweiler	13	M	2.1	Lábio
42	412208 1	Melanoma	NI	16	.	2.0	Lábio
43	6653	Melanocitoma	Teckel	11	M	NI	Anus
44	80054	Melanocitoma	Pit Bull	10	M	0.3	Lábio
45	72595	Melanocitoma	Pit Bull	9	F	3	Pálpebra
46	88881	Melanocitoma	Rottweiler	7	M	NI	Cabeça
47	92163	Melanocitoma	SRD	NI	F	NI	Tíbia
48	9304	Melanocitoma	Teckel	13	M	1	Fêmur
49	93302	Melanocitoma	SRD	10	M	0.5	Pálpebra
50	15698	Melanocitoma	SRD	13	M	0.6	Não referido
51	414458	Melanocitoma	Rhodesian Ridgeback	6	F	0.5	Membro pélvico
52	437045	Melanocitoma	Shar-pei	13	F	1.5	Membro torácico
53	442037	Melanocitoma	SRD	NI	M	0.9	Abdome
54	27490	Melanocitoma	Teckel	12.5	F	0.6	NI
55	466379	Melanocitoma	Shar-pei	7	M	0.4	Face
56	491046	Melanocitoma	Schnauzer	6	F	0.5	Cabeça
57	491335	Melanocitoma	Schnauzer	6	M	0.5	Abdome
58	4108215	Melanocitoma	Pit Bull	13	M	0.5	Abdome
59	4124374	Melanocitoma	Teckel	8	F	0.8	Dorso
60	4136657	Melanocitoma	Teckel	11.3	M	0.7	NI
61	556234	Melanocitoma	Labrador	NI	F	1	NI
62	569872	Melanocitoma	Teckel	NI	F	0.6	Pálpebra
63	578632	Melanocitoma	Schnauzer	NI	F	2	NI
64	583310	Melanocitoma	Schnauzer	NI	M	0.5	NI
65	584043	Melanocitoma	Teckel	NI	F	.	NI

66	584315	Melanocitoma	Teckel	NI	M	0.5	Pálpebra
67	93752	Melanocitoma	Schnauzer	9	F	0.3	Escapula
68	457607	Melanocitoma	Shih Tzu	14.2	M	0.7	Região lombar
69	473021	Melanocitoma	SRD	7	M	0.5	Pálpebra

SRD = sem raça definida; NI = não informado; F = fêmea; M = macho. Canino 28 apresentou 2 neoplasias melanocíticas de localização próxima.

Anexo 2. Avaliação histopatológica individual das neoplasias melanocíticas incluídas no estudo.

Caso	Ficha	Neoplasia melanocítica	Pig	Inf. Pag	Ati. Jun	Ulc
1	3986	Melanoma	2	Ausente	Presente	Ausente
2	4212	Melanoma	1	Ausente	Ausente	Ausente
3	4322	Melanoma	1	Presente	Presente	Presente
4	4775 A	Melanoma	2	NA	NA	NA
5	6071	Melanoma	1	NA	NA	NA
6	6508 1	Melanoma	3	Presente	Presente	Ausente
7	79532	Melanoma	1	Ausente	Presente	Ausente
8	87781A	Melanoma	1	Ausente	Ausente	Ausente
9	70491	Melanoma	1	Ausente	Presente	Presente
10	74842	Melanoma	1	Ausente	Presente	Ausente
11	7734	Melanoma	1	NA	NA	NA
12	5631M	Melanoma	3	Ausente	Presente	Ausente
13	5816	Melanoma	3	Ausente	Presente	Ausente
14	420640	Melanoma	3	Ausente	Presente	Ausente
15	433606B2	Melanoma	1	Presente	Presente	Presente
16	442917B1	Melanoma	1	Presente	Ausente	Presente
17	44169 B1B	Melanoma	1	Ausente	Presente	Ausente
18	446818	Melanoma	2	Ausente	Ausente	Presente
19	447468B2	Melanoma	2	Ausente	Presente	Ausente
20	450920	Melanoma	1	Ausente	Presente	Presente
21	454493	Melanoma	1	Ausente	Presente	Presente
22	456078	Melanoma	1	Ausente	Presente	Presente
23	28514 B1B	Melanoma	3	Presente	Ausente	Ausente
24	464627B1	Melanoma	1	Ausente	Presente	Presente
25	151014 B1	Melanoma	1	Ausente	Ausente	Presente
26	472377B1	Melanoma	1	Ausente	Ausente	Presente
27	473000	Melanoma	2	Ausente	Presente	Presente
28	476086ma	Melanoma	1	Ausente	Presente	Presente
29	476086me	Melanoma	3	Ausente	Presente	Presente
30	476931	Melanoma	2	Presente	Presente	Presente
31	4105691	Melanoma	1	Presente	Presente	Presente

32	4131954	Melanoma	1	Ausente	Presente	Presente
33	90824	Melanoma	1	Presente	Presente	Presente
34	559202	Melanoma	2	Ausente	Presente	Ausente
35	564038	Melanoma	2	Ausente	Ausente	Ausente
36	578563	Melanoma	2	Ausente	Presente	Presente
37	547031	Melanoma	1	Ausente	Ausente	Ausente
38	6239	Melanoma	3	Ausente	Presente	Presente
39	8699	Melanoma	3	Presente	Presente	Presente
40	75761	Melanoma	3	Ausente	Presente	Ausente
41	92653	Melanoma	3	Ausente	Presente	Ausente
42	4471021B1	Melanoma	2	Ausente	Presente	Presente
43	412208 1	Melanoma	1	Ausente	Presente	Presente
44	6653	Melanocitoma	3	Ausente	Presente	Ausente
45	80054	Melanocitoma	2	Ausente	Presente	Ausente
46	72595	Melanocitoma	3	Ausente	Presente	Presente
47	88881	Melanocitoma	3	Ausente	Ausente	Ausente
48	92163	Melanocitoma	2	Ausente	Presente	Ausente
49	9304	Melanocitoma	3	Ausente	Presente	Ausente
50	93302	Melanocitoma	2	Ausente	Presente	Ausente
51	15698	Melanocitoma	3	Ausente	Ausente	Ausente
52	414458	Melanocitoma	2	Ausente	Ausente	Ausente
53	437045	Melanocitoma	3	Ausente	Ausente	Ausente
54	442037	Melanocitoma	2	Ausente	Presente	Presente
55	27490	Melanocitoma	3	Ausente	Presente	Ausente
56	466379	Melanocitoma	3	Ausente	Presente	Presente
57	491046	Melanocitoma	3	Ausente	Ausente	Presente
58	491335	Melanocitoma	2	Ausente	Presente	Ausente
59	4108215	Melanocitoma	3	Ausente	Ausente	Ausente
60	4124374	Melanocitoma	3	Ausente	Ausente	Ausente
61	4136657	Melanocitoma	3	Ausente	Presente	Presente
62	556234	Melanocitoma	3	Ausente	Presente	Presente
63	569872	Melanocitoma	3	Presente	Ausente	Ausente
64	578632	Melanocitoma	2	Presente	Presente	Presente
65	583310	Melanocitoma	2	Ausente	Presente	Ausente
66	584043	Melanocitoma	2	Ausente	Presente	Ausente

67	584315	Melanocitoma	2	Ausente	Presente	Presente
68	93752	Melanocitoma	1	Ausente	Ausente	Ausente
69	457607	Melanocitoma	1	Ausente	Ausente	Ausente
70	473021	Melanocitoma	3	Ausente	Ausente	Presente

Pig= pigmentação; Inf. pag= infiltrado pagetoide; Ati. jun= atividade juncional; Ulc= Ulceração; NA*=não avaliável. Neoplasias melanocíticas 28 e 29 pertencem ao mesmo indivíduo.

Anexo 3. Valores de morfometria por caso.

Ficha	Variável	Média ± DP	n	Máximo	Mínimo
151014B1	Diâmetro menor epitelioides (µm)	5.03 ± 0.97	300	9.50	2.42
	Diâmetro maior epitelioides (µm)	7.63 ± 1.8	300	14.64	4.38
	Área epitelioides (µm ²)	29.8 ± 11.79	300	96.07	12.93
	Diâmetro menor fusiformes (µm)	3.42 ± 0.91	183	6.46	1.27
	Diâmetro maior fusiformes (µm)	11.02 ± 1.98	183	17.34	6.61
	Área fusiformes (µm ²)	29.89 ± 11.12	183	70.50	10.52
15698	Diâmetro menor epitelioides (µm)	3.83 ± 0.66	300	6.00	2.31
	Diâmetro maior epitelioides (µm)	5.76 ± 1.17	300	9.47	2.36
	Área epitelioides (µm ²)	17.59 ± 5.79	300	41.16	7.76
	Diâmetro menor fusiformes (µm)	2.23 ± 0.64	300	4.30	0.82
	Diâmetro maior fusiformes (µm)	7.63 ± 1.73	300	15.44	4.13
	Área fusiformes (µm ²)	14.23 ± 5.76	300	34.68	2.91
27490	Diâmetro menor epitelioides (µm)	5.01 ± 1.14	239	8.27	2.45
	Diâmetro maior epitelioides (µm)	7.87 ± 1.98	239	13.10	3.83
	Área epitelioides (µm ²)	28.96 ± 12.08	239	68.28	8.74
	Diâmetro menor fusiformes (µm)	2.8 ± 0.9	178	5.53	1.03
	Diâmetro maior fusiformes (µm)	10.39 ± 2.06	178	16.86	5.06
	Área fusiformes (µm ²)	22.27 ± 9.04	178	59.19	2.14
28514B1B	Diâmetro menor epitelioides (µm)	4.64 ± 0.87	300	7.97	2.75
	Diâmetro maior epitelioides (µm)	6.48 ± 1.28	300	10.99	4.03
	Área epitelioides (µm ²)	23.76 ± 8.27	300	62.24	8.66
	Diâmetro menor fusiformes (µm)	2.4 ± 0.68	122	4.28	1.11
	Diâmetro maior fusiformes (µm)	8.98 ± 1.81	122	15.38	5.65
	Área fusiformes (µm ²)	17.81 ± 6.57	122	41.31	7.64
3986	Diâmetro menor epitelioides (µm)	3.9 ± 0.71	300	6.58	2.52
	Diâmetro maior epitelioides (µm)	6.31 ± 1.32	300	9.81	3.31
	Área epitelioides (µm ²)	19.13 ± 6.37	300	45.32	7.99
	Diâmetro menor fusiformes (µm)	2.51 ± 0.66	300	4.40	0.61
	Diâmetro maior fusiformes (µm)	8.61 ± 1.41	300	12.58	4.60
	Área fusiformes (µm ²)	17.13 ± 5.9	300	35.55	4.02
4105691	Diâmetro menor epitelioides (µm)	5.81 ± 1.04	300	9.63	3.68
	Diâmetro maior epitelioides (µm)	8.04 ± 1.83	300	28.17	4.83
	Área epitelioides (µm ²)	35.99 ± 11.69	300	91.13	7.89
	Diâmetro menor fusiformes (µm)	3.3 ± 1	174	5.51	1.34
	Diâmetro maior fusiformes (µm)	10.42 ± 1.9	174	16.33	6.26
	Área fusiformes (µm ²)	28.29 ± 11.45	174	56.51	8.77

Anexo 3. Valores de morfometria por caso (Cont.)

Ficha	Variável	Média ± DP	n	Máximo	Mínimo
4108215	Diâmetro menor epitelioides (µm)	4.11 ± 0.86	309	6.19	2.06
	Diâmetro maior epitelioides (µm)	6.96 ± 1.64	309	12.48	3.71
	Área epitelioides (µm ²)	22.19 ± 7.84	309	43.51	4.29
	Diâmetro menor fusiformes (µm)	2.27 ± 0.83	224	7.33	0.77
	Diâmetro maior fusiformes (µm)	9.08 ± 1.99	224	18.01	1.95
	Área fusiformes (µm ²)	16.36 ± 6.39	224	38.90	3.26
4122081	Diâmetro menor epitelioides (µm)	4.7 ± 0.88	300	7.53	2.85
	Diâmetro maior epitelioides (µm)	6.86 ± 1.4	300	11.95	3.88
	Área epitelioides (µm ²)	25.54 ± 8.96	300	64.60	10.84
	Diâmetro menor fusiformes (µm)	2.91 ± 0.91	300	5.73	0.95
	Diâmetro maior fusiformes (µm)	9.44 ± 1.89	300	17.50	5.63
	Área fusiformes (µm ²)	22.53 ± 10.11	300	66.42	5.94
4124374	Diâmetro menor epitelioides (µm)	4.53 ± 0.9	276	8.07	2.71
	Diâmetro maior epitelioides (µm)	8.09 ± 2.06	276	14.33	4.01
	Área epitelioides (µm ²)	29.09 ± 10.26	276	69.31	12.78
	Diâmetro menor fusiformes (µm)	2.49 ± 0.7	74	4.00	1.08
	Diâmetro maior fusiformes (µm)	10.66 ± 2.53	74	16.61	6.11
	Área fusiformes (µm ²)	22.27 ± 9.48	74	52.75	8.95
4131954	Diâmetro menor epitelioides (µm)	4.8 ± 0.86	300	8.72	1.52
	Diâmetro maior epitelioides (µm)	7.24 ± 1.35	300	12.43	4.64
	Área epitelioides (µm ²)	26.81 ± 8.03	300	74.51	12.02
	Diâmetro menor fusiformes (µm)	3.49 ± 0.73	134	5.06	1.76
	Diâmetro maior fusiformes (µm)	10.6 ± 1.7	134	14.98	7.25
	Área fusiformes (µm ²)	29.68 ± 9.37	134	53.96	10.64
4136657	Diâmetro menor epitelioides (µm)	4.59 ± 0.91	267	7.52	2.43
	Diâmetro maior epitelioides (µm)	7.86 ± 1.99	267	18.74	4.23
	Área epitelioides (µm ²)	27.83 ± 10.04	267	64.96	8.57
	Diâmetro menor fusiformes (µm)	2.39 ± 0.78	192	5.29	0.77
	Diâmetro maior fusiformes (µm)	9.5 ± 2.16	192	15.94	5.58
	Área fusiformes (µm ²)	18.79 ± 9.51	192	58.58	6.37
414458	Diâmetro menor epitelioides (µm)	3.98 ± 1.01	149	6.94	2.02
	Diâmetro maior epitelioides (µm)	6.14 ± 1.41	149	10.72	3.26
	Área epitelioides (µm ²)	19.97 ± 8.32	149	51.93	6.07
	Diâmetro menor fusiformes (µm)	2.11 ± 0.79	211	4.84	0.50
	Diâmetro maior fusiformes (µm)	8.54 ± 2.08	211	16.22	4.85
	Área fusiformes (µm ²)	15.47 ± 7.23	211	41.29	4.47

Anexo 3. Valores de morfometria por caso (Cont.)

Ficha	Variável	Média ± DP	n	Máximo	Mínimo
420640	Diâmetro menor epitelioides (µm)	4.62 ± 0.82	300	7.42	2.58
	Diâmetro maior epitelioides (µm)	6.5 ± 1.11	300	11.50	4.04
	Área epitelioides (µm ²)	23.68 ± 6.93	300	49.93	11.91
	Diâmetro menor fusiformes (µm)	2.71 ± 0.57	130	3.99	1.53
	Diâmetro maior fusiformes (µm)	8.02 ± 1.26	130	10.90	5.28
	Área fusiformes (µm ²)	17.94 ± 5.49	130	35.20	8.08
4212	Diâmetro menor epitelioides (µm)	4.75 ± 0.98	300	8.44	2.52
	Diâmetro maior epitelioides (µm)	7.11 ± 1.58	300	12.83	3.52
	Área epitelioides (µm ²)	25.97 ± 9.19	300	60.59	7.48
	Diâmetro menor fusiformes (µm)	2.89 ± 0.81	36	4.45	1.23
	Diâmetro maior fusiformes (µm)	9.38 ± 2.48	36	15.36	3.86
	Área fusiformes (µm ²)	21.74 ± 10.47	36	45.67	3.26
4322	Diâmetro menor epitelioides (µm)	5.43 ± 0.99	300	8.84	2.82
	Diâmetro maior epitelioides (µm)	7.18 ± 1.21	300	11.79	3.80
	Área epitelioides (µm ²)	29.95 ± 9.06	300	60.25	8.54
	Diâmetro menor fusiformes (µm)	2.56 ± 0.61	13	3.43	1.73
	Diâmetro maior fusiformes (µm)	8.96 ± 1.68	13	11.47	6.49
	Área fusiformes (µm ²)	18.54 ± 5.94	13	25.58	11.10
433606B2	Diâmetro menor epitelioides (µm)	4.72 ± 0.8	300	6.94	3.03
	Diâmetro maior epitelioides (µm)	6.68 ± 1.41	300	11.58	4.18
	Área epitelioides (µm ²)	24.37 ± 7.94	300	50.10	11.67
	Diâmetro menor fusiformes (µm)	2.74 ± 0.97	300	5.94	0.43
	Diâmetro maior fusiformes (µm)	9.89 ± 2.18	300	17.73	5.83
	Área fusiformes (µm ²)	21.93 ± 11.02	300	66.09	4.71
437045	Diâmetro menor epitelioides (µm)	5.09 ± 1.04	306	8.37	2.61
	Diâmetro maior epitelioides (µm)	7.23 ± 1.37	306	11.94	4.04
	Área epitelioides (µm ²)	28.57 ± 9.19	306	59.66	9.19
	Diâmetro menor fusiformes (µm)	3.14 ± 0.9	172	5.75	1.21
	Diâmetro maior fusiformes (µm)	11.31 ± 2.63	172	18.50	5.13
	Área fusiformes (µm ²)	28.15 ± 11.12	172	59.09	5.50
44169B1B	Diâmetro menor epitelioides (µm)	4.45 ± 0.71	300	7.49	2.86
	Diâmetro maior epitelioides (µm)	6.15 ± 1.16	300	10.56	4.01
	Área epitelioides (µm ²)	21.2 ± 6.53	300	52.54	10.05
	Diâmetro menor fusiformes (µm)	2.76 ± 0.62	209	4.71	1.38
	Diâmetro maior fusiformes (µm)	8.38 ± 1.25	209	13.21	5.07
	Área fusiformes (µm ²)	17.84 ± 5.41	209	40.12	6.58

Anexo 3. Valores de morfometria por caso (Cont.)

Ficha	Variável	Média ± DP	n	Máximo	Mínimo
442037	Diâmetro menor epitelioides (µm)	3.9 ± 0.92	300	6.61	1.71
	Diâmetro maior epitelioides (µm)	5.67 ± 1.51	300	12.04	2.61
	Área epitelioides (µm ²)	18.25 ± 7.39	300	49.60	6.81
	Diâmetro menor fusiformes (µm)	2.51 ± 0.75	300	5.00	0.71
	Diâmetro maior fusiformes (µm)	9.84 ± 2.21	300	18.47	3.70
	Área fusiformes (µm ²)	18.51 ± 6.74	300	48.04	5.02
442917B1	Diâmetro menor epitelioides (µm)	4.61 ± 0.84	300	8.05	2.98
	Diâmetro maior epitelioides (µm)	6.82 ± 1.25	300	10.98	4.47
	Área epitelioides (µm ²)	24.6 ± 7.96	300	66.99	12.02
	Diâmetro menor fusiformes (µm)	2.89 ± 0.82	250	5.52	1.00
	Diâmetro maior fusiformes (µm)	9.32 ± 1.66	250	14.58	4.12
	Área fusiformes (µm ²)	21.91 ± 8.32	250	56.30	6.24
446818	Diâmetro menor epitelioides (µm)	5.35 ± 0.93	300	8.62	3.28
	Diâmetro maior epitelioides (µm)	7.52 ± 1.32	300	12.54	4.50
	Área epitelioides (µm ²)	31.3 ± 9.52	300	69.91	13.57
	Diâmetro menor fusiformes (µm)	3.18 ± 1.05	170	6.07	1.00
	Diâmetro maior fusiformes (µm)	9.96 ± 2.3	170	17.73	5.76
	Área fusiformes (µm ²)	25 ± 12.24	170	82.92	5.71
4471021B	Diâmetro menor epitelioides (µm)	5.15 ± 0.91	300	10.30	3.36
	Diâmetro maior epitelioides (µm)	7.29 ± 1.37	300	12.24	4.35
	Área epitelioides (µm ²)	29.95 ± 10.04	300	93.49	12.67
	Diâmetro menor fusiformes (µm)	3.03 ± 0.95	173	5.45	0.96
	Diâmetro maior fusiformes (µm)	10.8 ± 2.62	173	24.90	6.05
	Área fusiformes (µm ²)	27.57 ± 14.68	173	118.29	7.51
447468B2	Diâmetro menor epitelioides (µm)	5.06 ± 0.79	300	8.63	3.34
	Diâmetro maior epitelioides (µm)	6.96 ± 1.16	300	10.99	4.60
	Área epitelioides (µm ²)	26.93 ± 7.76	300	66.67	14.53
	Diâmetro menor fusiformes (µm)	3.07 ± 0.81	155	5.45	1.52
	Diâmetro maior fusiformes (µm)	9.98 ± 2.03	155	18.68	6.05
	Área fusiformes (µm ²)	23.35 ± 8.85	155	51.42	7.48
450920	Diâmetro menor epitelioides (µm)	6.38 ± 1.24	300	10.58	3.79
	Diâmetro maior epitelioides (µm)	8.57 ± 1.76	300	15.25	5.14
	Área epitelioides (µm ²)	42.98 ± 15.94	300	101.33	19.18
	Diâmetro menor fusiformes (µm)	4.01 ± 1.14	214	8.24	1.19
	Diâmetro maior fusiformes (µm)	12.6 ± 3.19	214	32.74	7.65
	Área fusiformes (µm ²)	40.96 ± 20.01	214	142.51	12.75

Anexo 3. Valores de morfometria por caso (Cont.)

Ficha	Variável	Média ± DP	n	Máximo	Mínimo
454493	Diâmetro menor epitelioides (µm)	5.42 ± 0.97	300	8.86	3.15
	Diâmetro maior epitelioides (µm)	7.73 ± 1.39	300	11.57	4.90
	Área epitelioides (µm ²)	32.5 ± 10.29	300	67.26	14.85
	Diâmetro menor fusiformes (µm)	3.07 ± 0.87	74	6.08	1.44
	Diâmetro maior fusiformes (µm)	10.29 ± 1.85	74	15.19	7.27
	Área fusiformes (µm ²)	25.04 ± 9.24	74	57.57	12.04
456078	Diâmetro menor epitelioides (µm)	5.01 ± 0.8	300	7.82	3.20
	Diâmetro maior epitelioides (µm)	7.26 ± 1.23	300	12.09	4.59
	Área epitelioides (µm ²)	27.84 ± 8	300	60.94	15.62
	Diâmetro menor fusiformes (µm)	3.14 ± 0.68	153	5.09	1.22
	Diâmetro maior fusiformes (µm)	9.27 ± 1.35	153	13.71	6.70
	Área fusiformes (µm ²)	22.67 ± 7.04	153	46.98	8.99
457607	Diâmetro menor epitelioides (µm)	4.46 ± 1.17	180	7.97	1.45
	Diâmetro maior epitelioides (µm)	7.5 ± 1.86	180	14.39	3.63
	Área epitelioides (µm ²)	22.82 ± 8.47	180	56.79	10.89
	Diâmetro menor fusiformes (µm)	2.08 ± 0.58	182	3.86	0.84
	Diâmetro maior fusiformes (µm)	9.2 ± 2.4	182	22.23	4.74
	Área fusiformes (µm ²)	16.09 ± 6.23	182	37.95	4.06
464627B1	Diâmetro menor epitelioides (µm)	5.68 ± 1.31	300	12.01	2.47
	Diâmetro maior epitelioides (µm)	8.09 ± 1.79	300	15.20	4.51
	Área epitelioides (µm ²)	36.46 ± 15.41	300	118.09	12.72
	Diâmetro menor fusiformes (µm)	3.33 ± 0.98	225	6.37	1.39
	Diâmetro maior fusiformes (µm)	11.12 ± 2.23	225	17.60	6.47
	Área fusiformes (µm ²)	30.46 ± 13.06	225	79.16	8.97
466379	Diâmetro menor epitelioides (µm)	4.22 ± 0.72	300	6.27	2.09
	Diâmetro maior epitelioides (µm)	6.89 ± 1.52	300	12.26	4.14
	Área epitelioides (µm ²)	22.42 ± 6.87	300	42.90	7.49
	Diâmetro menor fusiformes (µm)	2.19 ± 0.69	205	4.37	0.87
	Diâmetro maior fusiformes (µm)	8.5 ± 1.79	205	14.40	3.15
	Área fusiformes (µm ²)	15.47 ± 6.3	205	32.15	4.36
472377B1	Diâmetro menor epitelioides (µm)	5.33 ± 0.99	300	9.42	3.10
	Diâmetro maior epitelioides (µm)	7.53 ± 1.56	300	13.30	4.64
	Área epitelioides (µm ²)	31.2 ± 11.8	300	78.42	8.30
	Diâmetro menor fusiformes (µm)	3.87 ± 0.87	224	7.68	1.57
	Diâmetro maior fusiformes (µm)	12.06 ± 2.18	224	19.93	7.39
	Área fusiformes (µm ²)	37.05 ± 12.88	224	94.31	12.48

Anexo 3. Valores de morfometria por caso (Cont.)

Ficha	Variável	Média ± DP	n	Máximo	Mínimo
473000	Diâmetro menor epitelioides (µm)	5.07 ± 0.81	300	7.77	3.34
	Diâmetro maior epitelioides (µm)	7.45 ± 1.38	300	12.98	4.70
	Área epitelioides (µm ²)	29.33 ± 8.68	300	69.67	12.31
	Diâmetro menor fusiformes (µm)	3.1 ± 0.76	148	5.16	1.61
	Diâmetro maior fusiformes (µm)	10.4 ± 1.77	148	15.43	7.16
	Área fusiformes (µm ²)	25.83 ± 9.09	148	60.84	10.08
473021	Diâmetro menor epitelioides (µm)	4.15 ± 0.91	300	6.93	2.24
	Diâmetro maior epitelioides (µm)	7.19 ± 1.79	300	14.11	3.60
	Área epitelioides (µm ²)	23.66 ± 9.16	300	55.71	9.14
	Diâmetro menor fusiformes (µm)	2.05 ± 0.88	235	4.97	0.69
	Diâmetro maior fusiformes (µm)	9.05 ± 2.39	235	16.21	3.00
	Área fusiformes (µm ²)	15.36 ± 8.63	235	63.85	3.80
476086ma	Diâmetro menor epitelioides (µm)	4.99 ± 0.96	300	10.62	3.00
	Diâmetro maior epitelioides (µm)	7.07 ± 1.36	300	13.28	4.27
	Área epitelioides (µm ²)	27.7 ± 10.39	300	113.21	10.38
	Diâmetro menor fusiformes (µm)	3.31 ± 0.88	300	6.24	1.60
	Diâmetro maior fusiformes (µm)	10.56 ± 2.26	300	18.31	5.92
	Área fusiformes (µm ²)	28.14 ± 12	300	77.21	9.45
476086me	Diâmetro menor epitelioides (µm)	4.92 ± 0.85	300	8.06	2.97
	Diâmetro maior epitelioides (µm)	6.96 ± 1.5	300	12.73	4.40
	Área epitelioides (µm ²)	26.9 ± 9.92	300	77.93	11.85
	Diâmetro menor fusiformes (µm)	3.31 ± 0.94	111	5.76	1.33
	Diâmetro maior fusiformes (µm)	10.65 ± 2.02	111	17.36	6.59
	Área fusiformes (µm ²)	29.15 ± 11.5	111	67.83	11.38
476931	Diâmetro menor epitelioides (µm)	5.23 ± 1.12	300	8.61	2.64
	Diâmetro maior epitelioides (µm)	7.24 ± 1.51	300	11.96	4.31
	Área epitelioides (µm ²)	29.88 ± 11.33	300	72.18	11.86
	Diâmetro menor fusiformes (µm)	3.11 ± 0.7	129	4.75	1.54
	Diâmetro maior fusiformes (µm)	9.39 ± 1.45	129	14.98	5.72
	Área fusiformes (µm ²)	22.9 ± 7.69	129	53.19	9.48
4775A	Diâmetro menor epitelioides (µm)	4.31 ± 0.73	300	6.90	2.72
	Diâmetro maior epitelioides (µm)	5.72 ± 0.94	300	9.96	3.45
	Área epitelioides (µm ²)	18.84 ± 5.73	300	52.30	9.15
	Diâmetro menor fusiformes (µm)	1.83 ± 0.64	8	3.10	1.03
	Diâmetro maior fusiformes (µm)	6.41 ± 0.48	8	7.10	5.85
	Área fusiformes (µm ²)	8.95 ± 2.81	8	14.09	5.76

Anexo 3. Valores de morfometria por caso (Cont.)

Ficha	Variável	Média ± DP	n	Máximo	Mínimo
491046	Diâmetro menor epitelioides (µm)	4.38 ± 0.78	260	6.56	2.58
	Diâmetro maior epitelioides (µm)	7.45 ± 1.62	260	12.31	3.85
	Área epitelioides (µm ²)	26.34 ± 8.32	260	56.57	10.15
	Diâmetro menor fusiformes (µm)	2.49 ± 0.73	75	4.48	1.08
	Diâmetro maior fusiformes (µm)	9.57 ± 2.06	75	16.96	5.07
	Área fusiformes (µm ²)	20.02 ± 7.31	75	39.27	6.29
491335	Diâmetro menor epitelioides (µm)	4.61 ± 0.86	328	7.53	2.68
	Diâmetro maior epitelioides (µm)	7.91 ± 1.98	328	15.08	4.13
	Área epitelioides (µm ²)	29.18 ± 10.35	328	79.11	10.91
	Diâmetro menor fusiformes (µm)	2.69 ± 0.68	129	5.06	1.21
	Diâmetro maior fusiformes (µm)	10.33 ± 2.24	129	20.84	6.80
	Área fusiformes (µm ²)	23.11 ± 9.11	129	70.52	9.90
547031	Diâmetro menor epitelioides (µm)	6.64 ± 1.34	300	11.40	3.39
	Diâmetro maior epitelioides (µm)	10.39 ± 10.06	300	95.79	4.80
	Área epitelioides (µm ²)	42.67 ± 15.98	300	98.55	5.10
	Diâmetro menor fusiformes (µm)	3.44 ± 1.18	8	5.31	2.20
	Diâmetro maior fusiformes (µm)	10.12 ± 1.87	8	12.88	7.70
	Área fusiformes (µm ²)	29.24 ± 11.58	8	49.63	16.94
556234	Diâmetro menor epitelioides (µm)	5.71 ± 0.84	251	8.27	3.37
	Diâmetro maior epitelioides (µm)	8.41 ± 1.45	251	13.06	5.01
	Área epitelioides (µm ²)	36.09 ± 8.77	251	70.84	16.84
	Diâmetro menor fusiformes (µm)	3.06 ± 0.72	13	4.14	1.71
	Diâmetro maior fusiformes (µm)	10.57 ± 2.34	13	16.58	7.37
	Área fusiformes (µm ²)	24.28 ± 10.69	13	44.04	9.71
559202	Diâmetro menor epitelioides (µm)	4.73 ± 0.8	300	9.47	3.10
	Diâmetro maior epitelioides (µm)	6.73 ± 1.26	300	11.88	3.85
	Área epitelioides (µm ²)	25.11 ± 8.34	300	77.63	8.73
	Diâmetro menor fusiformes (µm)	2.95 ± 0.89	249	6.00	0.98
	Diâmetro maior fusiformes (µm)	9.96 ± 2.25	249	17.32	5.70
	Área fusiformes (µm ²)	23.54 ± 10.73	249	77.63	6.74
5631M	Diâmetro menor epitelioides (µm)	5.51 ± 0.83	102	8.62	3.70
	Diâmetro maior epitelioides (µm)	7.57 ± 1.27	102	11.77	5.29
	Área epitelioides (µm ²)	32.69 ± 9.5	102	67.70	18.07
	Diâmetro menor fusiformes (µm)	3.5 ± 0.74	18	4.88	2.43
	Diâmetro maior fusiformes (µm)	9.06 ± 1.61	18	12.85	6.32
	Área fusiformes (µm ²)	25.23 ± 9.14	18	42.66	12.10

Anexo 3. Valores de morfometria por caso (Cont.)

Ficha	Variável	Média ± DP	n	Máximo	Mínimo
564038	Diâmetro menor epitelioides (µm)	4.91 ± 0.86	300	7.86	3.04
	Diâmetro maior epitelioides (µm)	7.2 ± 1.43	300	12.45	4.49
	Área epitelioides (µm ²)	27.76 ± 9.34	300	65.92	13.01
	Diâmetro menor fusiformes (µm)	2.87 ± 1.1	244	7.48	0.09
	Diâmetro maior fusiformes (µm)	9.66 ± 2.09	244	21.68	3.13
	Área fusiformes (µm ²)	23.13 ± 13.77	244	155.06	5.54
569872	Diâmetro menor epitelioides (µm)	5.19 ± 1.82	278	32.01	2.66
	Diâmetro maior epitelioides (µm)	8.97 ± 6.89	278	120.38	4.45
	Área epitelioides (µm ²)	33.18 ± 8.25	278	55.09	17.04
	Diâmetro menor fusiformes (µm)	2.97 ± 0.73	50	4.63	1.47
	Diâmetro maior fusiformes (µm)	10.33 ± 1.94	50	16.47	6.51
	Área fusiformes (µm ²)	23.76 ± 7.86	50	43.85	9.95
578563	Diâmetro menor epitelioides (µm)	4.95 ± 0.83	300	8.75	3.34
	Diâmetro maior epitelioides (µm)	6.92 ± 1.34	300	13.44	4.42
	Área epitelioides (µm ²)	27.46 ± 9.75	300	91.12	12.79
	Diâmetro menor fusiformes (µm)	3.32 ± 0.89	278	6.05	1.12
	Diâmetro maior fusiformes (µm)	10.18 ± 2.15	278	17.45	5.73
	Área fusiformes (µm ²)	27.78 ± 12.16	278	80.01	8.03
578632	Diâmetro menor epitelioides (µm)	4.6 ± 1.07	153	6.97	2.15
	Diâmetro maior epitelioides (µm)	7.55 ± 1.8	153	12.62	2.71
	Área epitelioides (µm ²)	26.67 ± 9.34	153	61.72	6.42
	Diâmetro menor fusiformes (µm)	1.81 ± 0.66	188	5.15	0.62
	Diâmetro maior fusiformes (µm)	9.07 ± 2.12	188	16.54	4.97
	Área fusiformes (µm ²)	13.04 ± 5.84	188	31.65	3.73
5816	Diâmetro menor epitelioides (µm)	5.43 ± 0.97	300	8.39	3.34
	Diâmetro maior epitelioides (µm)	7.41 ± 1.2	300	12.34	4.47
	Área epitelioides (µm ²)	30.88 ± 9.74	300	73.74	13.01
	Diâmetro menor fusiformes (µm)	3.07 ± 0.67	45	5.24	1.92
	Diâmetro maior fusiformes (µm)	9.3 ± 1.91	45	15.02	6.72
	Área fusiformes (µm ²)	21.46 ± 8.67	45	53.32	10.37
583310	Diâmetro menor epitelioides (µm)	4.07 ± 0.74	300	6.30	2.39
	Diâmetro maior epitelioides (µm)	6.19 ± 1.24	300	9.78	4.09
	Área epitelioides (µm ²)	19.35 ± 5.7	300	43.79	8.34
	Diâmetro menor fusiformes (µm)	2.38 ± 0.72	136	5.63	1.15
	Diâmetro maior fusiformes (µm)	8.72 ± 1.41	136	14.52	4.90
	Área fusiformes (µm ²)	15.11 ± 5.83	136	36.16	4.99

Anexo 3. Valores de morfometria por caso (Cont.)

Ficha	Variável	Média ± DP	n	Máximo	Mínimo
584043	Diâmetro menor epitelioides (µm)	4.64 ± 0.8	300	6.79	2.61
	Diâmetro maior epitelioides (µm)	7.14 ± 1.22	300	10.94	4.20
	Área epitelioides (µm ²)	25.5 ± 6.2	300	44.80	11.15
	Diâmetro menor fusiformes (µm)	2.88 ± 0.54	37	4.07	1.89
	Diâmetro maior fusiformes (µm)	8.95 ± 1.31	37	13.06	5.83
	Área fusiformes (µm ²)	19.29 ± 6.05	37	36.67	10.81
584315	Diâmetro menor epitelioides (µm)	4.78 ± 1.2	283	8.88	2.06
	Diâmetro maior epitelioides (µm)	7.53 ± 2.3	283	32.96	3.86
	Área epitelioides (µm ²)	26.5 ± 10.22	283	54.39	8.55
	Diâmetro menor fusiformes (µm)	1.8 ± 0.6	73	3.58	0.86
	Diâmetro maior fusiformes (µm)	7.6 ± 1.48	73	10.71	4.20
	Área fusiformes (µm ²)	10.68 ± 4.19	73	20.56	4.12
6071	Diâmetro menor epitelioides (µm)	6.82 ± 1.36	300	10.96	3.36
	Diâmetro maior epitelioides (µm)	9.17 ± 1.59	300	13.65	4.51
	Área epitelioides (µm ²)	49.13 ± 16.27	300	102.16	13.38
	Diâmetro menor fusiformes (µm)	4.51 ± 0.99	124	6.72	1.98
	Diâmetro maior fusiformes (µm)	12.01 ± 2.29	124	19.71	7.36
	Área fusiformes (µm ²)	43.18 ± 15.8	124	100.01	10.65
6239	Diâmetro menor epitelioides (µm)	3.88 ± 0.65	139	5.63	2.52
	Diâmetro maior epitelioides (µm)	5.65 ± 0.88	139	9.12	4.06
	Área epitelioides (µm ²)	16.62 ± 4.67	139	28.60	9.75
	Diâmetro menor fusiformes (µm)	1.86 ± 0.52	175	3.44	0.77
	Diâmetro maior fusiformes (µm)	7.86 ± 1.43	175	11.88	4.83
	Área fusiformes (µm ²)	11.58 ± 4.46	175	24.00	3.83
65081	Diâmetro menor epitelioides (µm)	5.48 ± 1	300	8.92	3.31
	Diâmetro maior epitelioides (µm)	7.79 ± 1.56	300	12.64	4.60
	Área epitelioides (µm ²)	33.17 ± 10.86	300	70.46	12.42
	Diâmetro menor fusiformes (µm)	2.74 ± 0.73	112	4.48	0.73
	Diâmetro maior fusiformes (µm)	9.19 ± 1.53	112	12.82	6.12
	Área fusiformes (µm ²)	20.2 ± 7.23	112	42.83	4.06
6653	Diâmetro menor epitelioides (µm)	4.25 ± 0.65	164	6.42	3.12
	Diâmetro maior epitelioides (µm)	6.19 ± 1.01	164	8.91	4.18
	Área epitelioides (µm ²)	20.41 ± 6.05	164	44.84	11.38
	Diâmetro menor fusiformes (µm)	2.08 ± 0.61	99	3.79	0.79
	Diâmetro maior fusiformes (µm)	7.93 ± 1.08	99	11.65	5.06
	Área fusiformes (µm ²)	12.98 ± 4.61	99	29.65	4.69

Anexo 3. Valores de morfometria por caso (Cont.)

Ficha	Variável	Média ± DP	n	Máximo	Mínimo
70491	Diâmetro menor epitelioides (µm)	4.99 ± 0.87	300	7.75	3.18
	Diâmetro maior epitelioides (µm)	7.06 ± 1.34	300	11.67	4.57
	Área epitelioides (µm ²)	27.02 ± 9.04	300	58.88	12.29
	Diâmetro menor fusiformes (µm)	2.81 ± 0.66	64	4.97	1.65
	Diâmetro maior fusiformes (µm)	9.89 ± 2.08	64	16.25	6.32
	Área fusiformes (µm ²)	20.95 ± 7.27	64	45.32	8.90
72595	Diâmetro menor epitelioides (µm)	4.88 ± 0.78	179	6.97	3.03
	Diâmetro maior epitelioides (µm)	7.81 ± 1.43	179	12.02	4.98
	Área epitelioides (µm ²)	29.71 ± 7.57	179	50.53	15.53
	Diâmetro menor fusiformes (µm)	2.41 ± 0.63	49	3.61	0.71
	Diâmetro maior fusiformes (µm)	9.17 ± 1.33	49	11.80	6.34
	Área fusiformes (µm ²)	16.4 ± 4.42	49	25.05	5.37
74842	Diâmetro menor epitelioides (µm)	4.78 ± 0.87	243	7.32	2.74
	Diâmetro maior epitelioides (µm)	7.03 ± 1.63	243	15.75	3.71
	Área epitelioides (µm ²)	26.09 ± 10.12	243	84.32	11.19
	Diâmetro menor fusiformes (µm)	3.32 ± 0.88	117	5.91	1.65
	Diâmetro maior fusiformes (µm)	10.99 ± 2.09	117	18.42	7.13
	Área fusiformes (µm ²)	28.36 ± 10.84	117	58.05	12.33
75761	Diâmetro menor epitelioides (µm)	4.98 ± 0.81	300	7.52	3.21
	Diâmetro maior epitelioides (µm)	6.98 ± 1.31	300	12.09	3.96
	Área epitelioides (µm ²)	27.34 ± 8.33	300	57.17	1.05
	Diâmetro menor fusiformes (µm)	2.74 ± 0.82	120	4.55	1.13
	Diâmetro maior fusiformes (µm)	9 ± 1.69	120	14.10	5.82
	Área fusiformes (µm ²)	20.87 ± 9.62	120	52.64	5.81
7734	Diâmetro menor epitelioides (µm)	4.61 ± 0.82	300	8.36	3.03
	Diâmetro maior epitelioides (µm)	6.2 ± 1.24	300	10.91	3.70
	Área epitelioides (µm ²)	21.77 ± 7.7	300	59.09	8.75
	Diâmetro menor fusiformes (µm)	2.66 ± 0.57	43	4.29	1.55
	Diâmetro maior fusiformes (µm)	8.86 ± 1.9	43	14.54	5.94
	Área fusiformes (µm ²)	18.56 ± 6.9	43	44.41	7.52
79532	Diâmetro menor epitelioides (µm)	4.66 ± 0.86	300	7.16	2.69
	Diâmetro maior epitelioides (µm)	7.02 ± 1.47	300	12.60	3.76
	Área epitelioides (µm ²)	25.05 ± 8.63	300	62.83	8.10
	Diâmetro menor fusiformes (µm)	2.73 ± 0.78	260	5.48	1.03
	Diâmetro maior fusiformes (µm)	9.41 ± 2.1	260	17.17	5.21
	Área fusiformes (µm ²)	20.04 ± 9.02	260	69.82	4.60

Anexo 3. Valores de morfometria por caso (Cont.)

Ficha	Variável	Média ± DP	n	Máximo	Mínimo
80054	Diâmetro menor epitelioides (µm)	5.71 ± 0.91	300	7.97	3.51
	Diâmetro maior epitelioides (µm)	8.35 ± 2.57	300	43.19	5.32
	Área epitelioides (µm ²)	35.18 ± 7.87	300	58.35	8.18
	Diâmetro menor fusiformes (µm)	2.54 ± 0.79	36	3.91	0.93
	Diâmetro maior fusiformes (µm)	9.44 ± 1.76	36	13.77	6.13
	Área fusiformes (µm ²)	18.77 ± 7.92	36	36.61	6.02
8699	Diâmetro menor epitelioides (µm)	4.94 ± 0.75	139	7.33	3.51
	Diâmetro maior epitelioides (µm)	6.76 ± 1.15	139	9.61	4.61
	Área epitelioides (µm ²)	26.23 ± 7.7	139	49.68	12.69
	Diâmetro menor fusiformes (µm)	2.31 ± 0.53	6	3.31	1.82
	Diâmetro maior fusiformes (µm)	8.25 ± 1.41	6	10.60	6.57
	Área fusiformes (µm ²)	14.62 ± 3.43	6	18.76	10.31
87781A	Diâmetro menor epitelioides (µm)	5.3 ± 0.89	300	7.56	3.10
	Diâmetro maior epitelioides (µm)	7.21 ± 1.17	300	11.46	4.76
	Área epitelioides (µm ²)	29.16 ± 8.19	300	63.08	12.89
	Diâmetro menor fusiformes (µm)	2.57 ± 0.76	82	4.55	1.11
	Diâmetro maior fusiformes (µm)	9.76 ± 2.02	82	14.83	6.15
	Área fusiformes (µm ²)	20.68 ± 8.76	82	54.17	7.65
88881	Diâmetro menor epitelioides (µm)	4.24 ± 0.77	139	6.41	1.15
	Diâmetro maior epitelioides (µm)	6.08 ± 1.05	139	9.89	4.28
	Área epitelioides (µm ²)	20.1 ± 5.56	139	36.41	7.67
	Diâmetro menor fusiformes (µm)	1.93 ± 0.69	110	4.23	0.61
	Diâmetro maior fusiformes (µm)	8.65 ± 1.6	110	14.28	5.19
	Área fusiformes (µm ²)	13.55 ± 5.67	110	38.61	4.96
90824	Diâmetro menor epitelioides (µm)	6.48 ± 1.07	273	10.28	4.18
	Diâmetro maior epitelioides (µm)	9.12 ± 1.54	273	13.48	6.15
	Área epitelioides (µm ²)	45.31 ± 13.6	273	97.63	20.32
	Diâmetro menor fusiformes (µm)	3.73 ± 0.99	92	6.22	1.82
	Diâmetro maior fusiformes (µm)	10.61 ± 1.85	92	15.89	7.32
	Área fusiformes (µm ²)	31.02 ± 12.68	92	64.49	12.39
92163	Diâmetro menor epitelioides (µm)	5.06 ± 0.93	300	8.74	2.91
	Diâmetro maior epitelioides (µm)	8.49 ± 1.87	300	14.26	4.14
	Área epitelioides (µm ²)	32.46 ± 10.23	300	70.33	13.37
	Diâmetro menor fusiformes (µm)	2.81 ± 0.77	96	4.82	1.00
	Diâmetro maior fusiformes (µm)	10.6 ± 1.89	96	14.47	6.56
	Área fusiformes (µm ²)	22.23 ± 8.77	96	44.98	8.79

Anexo 3. Valores de morfometria por caso (Cont.)

Ficha	Variável	Média ± DP	n	Máximo	Mínimo
92653	Diâmetro menor epitelioides (µm)	5.20 ± 0.77	300	7.80	3.52
	Diâmetro maior epitelioides (µm)	6.96 ± 1.05	300	10.79	4.28
	Área epitelioides (µm ²)	29.11 ± 7.45	300	60.06	13.68
	Diâmetro menor fusiformes (µm)	2.71 ± 0.66	5	3.25	1.69
	Diâmetro maior fusiformes (µm)	9.58 ± 0.94	5	10.58	8.48
	Área fusiformes (µm ²)	18.47 ± 2.89	5	21.56	14.43
9304	Diâmetro menor epitelioides (µm)	4.69 ± 0.70	300	7.27	2.91
	Diâmetro maior epitelioides (µm)	7.25 ± 2.50	300	30.29	4.32
	Área epitelioides (µm ²)	24.7 ± 6.27	300	49.88	5.48
	Diâmetro menor fusiformes (µm)	2.55 ± 0.62	37	3.80	1.53
	Diâmetro maior fusiformes (µm)	9.36 ± 1.89	37	13.94	6.38
	Área fusiformes (µm ²)	16.68 ± 5.99	37	34.24	8.48
93302	Diâmetro menor epitelioides (µm)	5.41 ± 0.87	300	8.78	3.43
	Diâmetro maior epitelioides (µm)	8.08 ± 1.40	300	14.17	4.60
	Área epitelioides (µm ²)	33.13 ± 8.09	300	63.90	17.34
	Diâmetro menor fusiformes (µm)	2.62 ± 0.72	64	4.18	0.97
	Diâmetro maior fusiformes (µm)	9.05 ± 1.56	64	11.93	6.28
	Área fusiformes (µm ²)	16.85 ± 5.9	64	32.03	3.89
93752	Diâmetro menor epitelioides (µm)	5.34 ± 0.98	300	7.78	2.87
	Diâmetro maior epitelioides (µm)	8.14 ± 1.71	300	22.78	4.29
	Área epitelioides (µm ²)	32.86 ± 10.08	300	76.77	12.81
	Diâmetro menor fusiformes (µm)	2.59 ± 0.71	123	4.39	1.03
	Diâmetro maior fusiformes (µm)	8.76 ± 1.65	123	14.79	5.46
	Área fusiformes (µm ²)	17.45 ± 6.92	123	44.33	5.48