

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Patologia

Ivy Nayra Nascimento Gonçalves

**EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DE C-KIT E DETECÇÃO DE
INTERN TANDEM DUPLICATIONS NO EXON 11 EM MELANOMAS
CANINOS CUTÂNEOS E DA CAVIDADE ORAL**

Belo Horizonte

Fevereiro de 2018

Ivy Nayra Nascimento Gonçalves

**EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DE C-KIT E DETECÇÃO DE
INTERN TANDEM DUPLICATIONS NO EXON 11 EM MELANOMAS
CANINOS CUTÂNEOS E DA CAVIDADE ORAL**

Versão Final

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais como parte dos requisitos para a obtenção do título de mestre.

Orientador: Prof. Dr. Enio Ferreira

Co-orientadora: Prof. Dra. Istefani Luciene D. da Silva

Belo Horizonte

2018

G643e Gonçalves, Ivy Nayra Nascimento.
Expressão imuno-histoquímica de C-kit e detecção de Intern Tandem Duplications no Exon 11 em melanomas caninos cutâneos e da cavidade oral [manuscrito]. / Ivy Nayra Nascimento Gonçalves. - - Belo Horizonte: 2018.
52f.: il.
Orientador (a): Enio Ferreira.
Coorientador (a): Istefani Luciene D. da Silva.
Área de concentração: Patologia Geral.
Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Proteínas Proto-Oncogênicas c-kit. 2. Melanoma. 3. Sequências de Repetição em Tandem. 4. Dissertações Acadêmicas. I. Ferreira, Enio. II. Silva, Istefani Luciene D. da. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.

NLM : QZ 360



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

UFMG

ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DA ALUNA

IVY NAYRA NASCIMENTO GONÇALVES

Realizou-se, no dia 27 de fevereiro de 2018, às 08:30 horas, C3241, Departamento de Patologia, Instituto de Ciências Biológicas, Campus Pampulha - UFMG, da Universidade Federal de Minas Gerais, a defesa de dissertação, intitulada *Expressão Imuno-histoquímica de c-Kit e detecção de ITD no exon-11 em melanoma caninos cutâneos e da cavidade oral.*, apresentada por IVY NAYRA NASCIMENTO GONÇALVES, número de registro 2016662748, graduada no curso de BIOMEDICINA, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em PATOLOGIA, à seguinte Comissão Examinadora: Prof(a). Enio Ferreira - Orientador (Universidade Federal de Minas Gerais), Prof(a). Istéfani Luciene Dayse da Silva (Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais), Prof(a). Geovanni Dantas Cassali (UFMG), Prof(a). Marina Rios de Araujo (CDTN).

A Comissão considerou a dissertação:

Aprovada

Reprovada

Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por mim e pelos membros da Comissão.
Belo Horizonte, 27 de fevereiro de 2018.

Prof(a). Enio Ferreira (Doutor)

Prof(a). Istéfani Luciene Dayse da Silva (Doutora)

Prof(a). Geovanni Dantas Cassali (Doutor)

Prof(a). Marina Rios de Araujo (Doutora)

AGRADECIMENTOS

- A todos aqueles, que, à sua própria maneira, alegraram os meus dias durante esses 2 anos:
- Ao meu irmãozinho de mestrado, Emerson, que me deu uma mão e os dois braços quando eu estava mais perdida do que cego em tiroteio;
- Ao Enio, pela ótima orientação acadêmica, pelos vários conselhos amigos e por sempre me convencer que as coisas vão “ficar bem”;
- A Istefani, por continuar participando da minha vida acadêmica tão ativamente e por ser minha referência dentro da biomedicina;
- A Taty, por sempre falar o que eu queria falar, mas não tinha coragem, haha. Além de todas as dicas e conselhos diários;
- A Fernando, Renato, Júlia, Larissa, Débora, Ju e Ana Alta por sempre estarem dispostos a ajudar no que fosse necessário no laboratório (ou fora dele);
- A Aline, por divertir minhas tardes no laboratório, tornando qualquer tarefa mais agradável;
- Ao Lado A do LPC, por proporcionarem uma convivência tão agradável durante esses 24 meses, além da companhia diária para a majestosa hora do café!;
- A Rachel, por continuar sendo minha “lab partner” mesmo estando fisicamente distante;

Muito obrigada, pessoinhas!

EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DE C-KIT E DETECÇÃO DE *INTERN TANDEM DUPLICATIONS* NO EXON 11 EM MELANOMAS CANINOS CUTÂNEOS E DA CAVIDADE ORAL

RESUMO:

A c-Kit é um receptor transmembrânico de tirosina quinase, e é codificado pelo gene *KIT*. É demonstrado que a c-Kit participa de processos carcinogênicos em diversas neoplasias, apresentando expressões aberrantes e, por vezes, mutações no gene *KIT*. Dentre as mutações c-Kit já descritas, as *ITD* se destacam por culminarem com a ativação constitutiva da proteína em algumas neoplasias, adquirindo assim, uma importância no desenvolvimento de terapias-alvo para o tratamento de alguns tipos de tumores. A expressão de c-Kit e mutações em seu respectivo gene já foram identificadas em diferentes tipos de melanoma, mas seu mecanismo de ação nessa neoplasia ainda carece de futuras investigações, tanto de humanos quanto em diferentes espécies animais. Dessa forma, este trabalho teve como objetivo a avaliação da expressão imuno-histoquímica de c-Kit e sua correlação com os critérios histopatológicos de melanomas caninos orais e cutâneos tal como a identificação de mutações do tipo *ITD* no exon 11 do gene *KIT*. Foram utilizados 80 casos de melanoma (26 orais e 54 cutâneos), fixados em formol e incluídos em parafina, selecionados do acervo do Laboratório de Patologia Comparada da UFMG. A expressão proteica da c-Kit foi avaliada por meio de imuno-histoquímica para CD117 (Policlonal), correlacionando os resultados com as características histopatológicas tumorais e com o índice de proliferação celular obtido por meio de imuno-histoquímica para Ki-67 (MIB-1). A identificação de polimorfismos do tipo *ITD* no exon 11 foi avaliada por meio da técnica de PCR convencional. Cerca de 35% dos melanomas apresentaram positividade para c-Kit. Nos casos cutâneos, houve correlação positiva dentre as avaliações imuno-histoquímicas para c-Kit e a proliferação celular (expressão de Ki-67), fato não observado em melanomas orais. Em relação à pesquisa de mutações *ITD*, nenhuma amostra apresentou tal alteração. Dessa forma, conclui-se que, apesar de presente tanto em melanomas orais e cutâneos em cães, a c-Kit desempenha um papel diferenciado em cada tipo de tumor, podendo estar intimamente relacionado à proliferação celular de tumores cutâneos. Além disso, a ausência de mutações *ITD* nessas amostras não descarta a inexistência de outras mutações gênicas, que, portanto, devem ser investigadas com um propósito compreender seu papel no desenvolvimento dessa neoplasia e gerarem possíveis alvos terapêuticos.

Palavras-chave: c-Kit; melanoma; intern tandem duplication; dog.

IMMUNOHISTOCHEMICAL EXPRESSION OF C-KIT AND DETECTION OF EXON 11 INTERN TANDEM DUPLICATIONS- IN CUTANEOUS CANINE AND ORAL CAVITY MELANOMA.

ABSTRACT:

C-Kit is a transmembrane receptor tyrosine kinase, and is encoded by the *KIT* gene. It has already been shown that c-Kit participates in carcinogenic processes in several neoplasias, presenting aberrant expressions and, sometimes, mutations in the *KIT* gene. Among the c-Kit mutations already described, the ITDs stand out for culminating with the constitutive activation of the protein in some neoplasias, thus acquiring an importance in the development of target therapies for the treatment of some types of tumors. The expression of c-Kit and mutations in their respective gene have already been identified in different types of melanoma, but their mechanism of action in this neoplasia still lacks future investigations, both in humans and in different animal species. Thus, this work aimed to evaluate the immunohistochemical expression of c-Kit and its correlation with the histopathological features of oral and cutaneous canine melanomas such as the identification of *ITD*-like mutations in exon 11 of the *KIT* gene. We used 80 cases of melanoma (26 oral and 54 cutaneous), fixed in formaldehyde and included in paraffin blocks, selected from the collection of the Comparative Pathology Laboratory of UFMG. Protein expression of c-Kit was assessed by immunohistochemistry for CD117 (Polyclonal), correlating its results with tumor histopathological characteristics and the cell proliferation index obtained by immunohistochemistry for Ki-67 (MIB- 1). The identification of *ITD*-like polymorphisms in exon 11 was evaluated by means of the conventional PCR technique. About 35% of melanomas were positive for c-Kit. In cutaneous cases, there was a positive correlation between immunohistochemical evaluations for c-Kit with cell proliferation (Ki-67 expression), a fact that was not observed among the oral cases. Regarding the research of *ITD* mutations, no sample presented such alteration. Thus, it is concluded that, although present in both oral and cutaneous melanomas in dogs, c-Kit plays a differentiated role in each type of tumor, and may be closely related to cellular proliferation in cutaneous tumors. Moreover, the absence of *ITD* mutations in these samples does not rule out the lack of other gene mutations, which, therefore, should be investigated with a purpose to understand their role in the development of this neoplasm and generate possible therapeutic targets.

Keywords: c-Kit; melanoma; intern tandem duplication; dog.

LISTA DE FIGURAS

Artigo - Figura 1: Number of positive and negative cases, oral and cutaneous, under IHC for c-Kit.....	p.41
Artigo – Figura 2: Photomicrographs of canine melanoma tissue, stained for c-Kit (A and B) and Ki-67 (C and D) proteins under IHC assay. Amplification of 40x A. Arrows: strong c-Kit staining, showing KIT pattern I (membrane-associated staining). B. Arrowheads: strong focal cytoplasmic staining, KIT pattern II. Arrows: Strong diffuse cytoplasmic staining, KIT pattern III. C. Low-proliferation melanoma tissue. Arrows: nuclear staining for Ki-67 under IHC essay. D. High-proliferation melanoma tissue. Arrows: nuclear staining for Ki-67 under IHC essay	p.42
Artigo – Figura 3: c-Kit samples after PCR for exon 11 and revelation in polyacrylamide gel amplifying around 190bp (c-Kit wild-type)	p.43

LISTA DE ABREVIATURAS

CDK4 – *Cyclin Dependent Kinase 4* (Ciclina dependente de quinase 4)

CETEA – Comitê de Ética em Experimentação Animal

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

GIST – *Gastrointestinal Stromal Tumor* (Tumor gastrointestinal)

GNAQ – *Guanine Nucleotide-binding Protein G(q) Subunit Alpha* (Proteína G (q), subunidade alfa, ligante de guanina)

HE – Hematoxilina e Eosina

IHC – *Immunohistochemistry* (Imuno-histoquímica)

ITD – *Intern Tandem Duplication*

MCT - Mastocitoma

ng – Nanograma

pb – Pares de bases

PBS – Tampão fosfato-salino

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

PTEN – *Phosphatase And Tensin Homolog* (Fosfatase Homóloga à Tensina)

SCF – Stem Cell Factor (Fator de Células Tronco)

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

µL - Microlitro

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	10
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	11
2.1. O melanoma.....	11
2.2. Desenvolvimento do melanoma.....	15
2.3. c-Kit e neoplasias.....	17
2.4. c-Kit e o melanoma.....	20
2.5. Uso de inibidores de c-Kit como tratamento do melanoma.....	20
3. JUSTIFICATIVA.....	21
4. HIPÓTESE.....	21
5. OBJETIVO GERAL.....	22
6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
7. MATERIAL E MÉTODOS.....	22
7.1. Avaliação e classificação histológica.....	22
7.2. Procedimento da imuno-histoquímica	23
7.3. Interpretação da imuno-histoquímica.....	24
7.4. Identificação de polimorfismos.....	25
7.5. Análise estatística.....	26
8. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
ARTIGO.....	27
9. CONCLUSÕES.....	44
10. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	44
11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45
12. ANEXOS.....	52

1. INTRODUÇÃO

Representando cerca de 5% dos cânceres de pele diagnosticados no Brasil em humanos, o melanoma possui alto nível de letalidade, sendo responsável por aproximadamente 85% dos óbitos decorrentes da manifestação de neoplasias cutâneas no país. Em humanos, a etiologia do melanoma está associada a características étnicas, genéticas e ambientais de cada indivíduo. O desenvolvimento da doença é mais comum em indivíduos caucasianos, com olhos claros e que sofrem maior exposição à radiação ultravioleta (MENDES; KOIFMAN, 2010).

O melanoma, em geral, apresenta características similares em todas as espécies, portanto, estudos sobre essa neoplasia em animais pode contribuir para um melhor entendimento da biologia do câncer também em humanos (SMITH *et al.*, 2016). Em cães, o melanoma compreende a neoplasia que mais acomete os olhos e a cavidade oral desses animais (CAMARGO; CONCEIÇÃO; COSTA, 2008). Na pele, essa neoplasia representa 0.8 a 2% de todos os tumores caninos cutâneos (NISHIYA *et al.*, 2016).

Trabalhos prévios que buscaram uma correlação entre a expressão/mutação no gene *KIT* e o desenvolvimento de melanomas caninos são escassos e apresentam resultados contraditórios. Sobre melanomas cutâneos em cães, Chu *et al.*, (2013) mostraram que há a presença de expressão proteica de c-Kit tanto quanto a presença de mutações *KIT* presentes no éxon 11. Por outro lado, estudos conduzidos por Murakami *et al.*, (2011) relataram a ausência de mutações *KIT* nos éxons 11 e 17, apesar de positividade quanto à expressão proteica. No mesmo ano (2012), estudos conduzidos por Newman *et al.* corroboraram com os estudos de Murakami *et al.* quanto à presença da expressão proteica de c-Kit em melanomas orais. Porém, esse apresentou resultados que indicam que, nesse tipo de neoplasia, a expressividade de c-Kit poderia ser considerada um bom fator prognóstico, levando à uma hipótese contrária do que é observado em outros tipos de neoplasias.

Diante do aparente papel contraditório da c-Kit em melanomas, torna-se necessária a execução estudos que esclareçam a função biológica da proteína no desenvolvimento de neoplasias melanocíticas. É possível que a proteína apresente expressões proteicas aberrantes tal como mutações no gene *KIT* em melanomas caninos orais e cutâneos, que podem estar correlacionadas com comportamentos diversos, como apoptose, diferenciação e proliferação celular, de acordo com o sítio primário da lesão. Dessa forma, estudos futuros poderão avaliar o papel, tanto prognóstico quanto preditivo, da c-Kit na espécie canina, contribuindo para o

desenvolvimento de terapias-alvo com uma melhor resposta terapêutica em melanomas dessa espécie.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1) O Melanoma

O melanoma é uma neoplasia agressiva, que acomete os melanócitos. A doença se estabelece a partir do momento em que os melanócitos, devido às alterações genéticas, começam a se multiplicar de forma desordenada, iniciando processos de formações de novos vasos sanguíneos e disseminação (MILLER; JR, 2006). Os melanócitos possuem origem neuroectodérmica e, durante seu processo de maturação, migram da crista neural. O sítio de migração dessas células é majoritariamente a camada basal da epiderme, onde são responsáveis pela produção de melanina. Porém, também é possível encontrar melanócitos em regiões de mucosa, cavidade ocular, trato urogenital, leptomeninges e trato respiratório. Após migrarem da crista neural, os melanócitos produzem uma população de células tronco, processo responsável por sua renovação celular. Esse mecanismo confere aos melanomas uma característica agressiva e de alto índice de metástases (MORT; JACKSON; PATTON, 2015; TSAO *et al.*, 2012). Frequentemente, no caso de melanomas, a disseminação ocorre para outros sítios do organismo, caracterizando assim o processo de metástase. A alta capacidade metastática do melanoma caracteriza o principal fator de letalidade dessa neoplasia (MILLER; JR, 2006).

O melanoma cutâneo, quando comparado a outros sítios de ocorrência em humanos, é o subtipo de melanoma mais prevalente, correspondendo a cerca de 90% dos diagnósticos desse tipo de neoplasia (ALI; YOUSAF; LARKIN, 2013). Além disso, apesar de sua baixa prevalência quando comparado aos tumores de pele não-melanoma, sua incidência vem crescendo progressivamente, em todo o mundo, nas últimas décadas. A incidência nos anos 30 era de 1:1500 (proporção entre indivíduos afetados e saudáveis, respectivamente), e em 2000 esses números aumentaram para 1:75. Nova Zelândia e Austrália lideram o ranking mundial de novos casos de melanoma por ano. Nesses países, em 2012, a taxa de novos casos dessa neoplasia foi de 35 casos para cada 100.000 habitantes, em cada um dos países (CLAESON, 2016). No Brasil, anualmente, são esperados cerca de 6.000 novos casos, resultando em 1.300 mortes (VAZQUEZ *et al.*, 2015). Uma vez que o país apresenta grande diversidade demográfica, a incidência da neoplasia também varia de região a região, sendo as regiões sul e sudeste as mais

afetadas. No geral, o Brasil ocupa a posição de 15º entre os países com maior incidência desse tipo de neoplasia no mundo (BAKOS, 2006; WAINSTEIN; BELFORT, 2004).

O melanoma é uma neoplasia multifatorial que, em sua maioria se estabelece a partir da junção de fatores etiológicos genéticos e também ambientais. Porém, alguns fatores, mesmo quando presentes isoladamente, não podem ser ignorados. Dentre as etiologias com mais importância clínica estão a predisposição hereditária e exposição aos raios UV, além de características específicas da pele de cada indivíduo e outros fatores como imunossupressão. Cerca de 8 a 14% dos indivíduos diagnosticados com a doença possuem histórico familiar de melanoma e, além disso, acredita-se que cerca de 10% dos indivíduos afetados que apresentam mais de um melanoma primário, são portadores de uma alteração genética relacionada à predisposição hereditária (CARVALHO *et al.*, 2004; LINDOR *et al.*, 2008). Assim, O desenvolvimento da doença é mais comum em indivíduos caucasianos, com olhos claros e que sofrem maior exposição à radiação ultravioleta (CARVALHO *et al.*, 2004; MENDES; KOIFMAN, 2010).

Do ponto de vista clínico, a progressão do melanoma cutâneo não depende unicamente das características genéticas presentes nas células tumorais, mas também depende de fatores característicos do corpo do paciente, como por exemplo, a capacidade do sistema imune. Dados clínicos juntamente com experimentos realizados em modelos animais, sugerem que um sistema imune competente é um grande ponto a favor do paciente (JACOBS *et al.*, 2012; LADÁNYI *et al.*, 2007). No processo, tanto a imunidade inata quanto a imunidade adquirida, participam ativamente. A partir da sinalização das células dendríticas, os linfócitos T citotóxicos são ativados e participam como principais componentes do sistema imune no combate contra a neoplasia (LADÁNYI *et al.*, 2007). Outros dados também sugerem que as células B também participam ativamente na proteção do organismo contra o desenvolvimento do melanoma (CHIARUTTINI *et al.*, 2017). Por outro lado, o papel dos macrófagos ainda não foi bem compreendido no caso de melanomas, e algumas pesquisas mostram dados controversos sobre o assunto (TÍMÁR, 2013).

Melanomas orais são um subtipo de melanoma raro, com prevalência variando entre 0,2 a 8% de todos os casos de melanoma e que compreendem 0,5% de todas as neoplasias malignas orais. Apesar de sua baixa incidência, o melanoma oral apresenta um prognóstico mais desfavorável em relação ao cutâneo, apresentando um índice de sobrevida após 5 anos entre 15-38%, mostrando-se assim potencialmente fatal (NADER MARTA *et al.*, 2007; PADHYE;

D'SOUZA, 2011). Esse tipo de tumor se desenvolve de forma silenciosa, e muitas vezes, indolor, o que dificulta o diagnóstico no estágio inicial da doença. Mesmo quando apresenta lesões detectáveis, as características histopatológicas do tumor, principalmente quando esses não são pigmentados, se confundem com diversas outras neoplasias, dificultando o correto diagnóstico de melanoma (URATANI; VARGAS; JORGE, 2004). Além disso, a excisão tumoral pode ser difícil, devido à localidade da lesão, o que pode contribuir para o potencial letal dessa neoplasia (KAI-YUAN HSIAO, 2015). A maior agressividade do melanoma oral quando comparado ao cutâneo pode estar relacionado à sua posição anatômica, onde a proximidade com a estrutura óssea e musculatura da cabeça e do pescoço pode ser um fator facilitador para a disseminação tumoral nessas estruturas. Além disso, a alta vascularidade da mucosa oral pode estar relacionada com o alto número de metástases à distância encontradas nessa neoplasia. É relatado também, em pacientes com melanoma oral a alta ocorrência de metástases a distância no pulmão e/ou fígado (RAPIDIS *et al.*, 2003). Apesar do melanoma cutâneo estar relacionado à exposição a raios UV, a etiologia do melanoma de mucosa ainda não é bem compreendida. Algumas alterações genéticas, como a alterações relacionada à c-Kit, já foram relatadas, porém, aparentemente, essas alterações por si não seriam suficientes para iniciar o processo de malignidade, necessitando assim de outras alterações no microambiente celular (ALI; YOUSAF; LARKIN, 2013).

No cão, essa neoplasia é comumente encontrada na cavidade oral, lábios, pele, olhos e dígitos, sendo a cavidade oral e a pele os sítios mais acometidos (NISHIYA *et al.*, 2016). O melanoma é considerado a neoplasia que mais acomete a cavidade oral da espécie canina (BERGMAN, 2007). O melanoma canino não apresenta predisposição relacionado ao sexo, e tendem a acometer raças que possuem a pele intensamente pigmentada (CAMARGO; CONCEIÇÃO; COSTA, 2008). Alguns aspectos moleculares do melanoma canino já foram estudados em caráter comparativo em relação a neoplasia em humanos, levando-se em consideração análises genéticas para *CDK4*, *NRAS*, *BRAF*, *PTEN*, *GNAQ* e *KIT*, porém, investigações mais aprofundadas são necessárias para a melhor compreensão sobre o desenvolvimento do melanoma nessa espécie (NISHIYA *et al.*, 2016).

Dentre os marcadores moleculares utilizados para avaliar a progressão do melanoma está o Ki-67. O Ki-67 é uma proteína expressa em quase todas as fases do ciclo celular (não é expressa somente na fase G0) e trata-se de um biomarcador consideravelmente sensível que pode ser útil na avaliação prognóstica e no monitoramento terapêutico do paciente (ANTONIO *et al.*,

2010; BROWN; GATTER, 2002; CARLSON *et al.*, 2005; GIMOTTY *et al.*, 2005). Estudos anteriores mostraram o uso do Ki-67 como um fator prognóstico independente, útil para avaliar o risco de desenvolvimento de metástases em melanomas (GIMOTTY *et al.*, 2005). Além disso, a marcação imuno-histoquímica para Ki-67 é considerada mais fidedigna do que a contagem de mitoses na massa tumoral (WEINSTEIN *et al.*, 2014).

Além do índice de proliferação celular, outros critérios histopatológicos devem ser considerados na análise de melanomas. O melanoma pode apresentar duas principais variações de morfologia celular: células fusiformes e epitelióides. Aparentemente, tipos histológicos epitelióide apresentam maior alteração na cromatina, o que está relacionado a uma maior agressividade em neoplasias pigmentadas (CHI *et al.*, 1993). Por vezes, tumores com predominância de células fusiformes tendem a apresentar tecido desmoplásico entre seus componentes histológicos (WEISSINGER *et al.*, 2014). A desmoplasia, considerada na medicina humana como um subtipo de melanoma e não somente um achado histológico, trata-se da deposição de tecido conjuntivo fibroso em meio ao estroma tumoral. Ainda não se sabe se o aspecto possível desmoplásico dessa neoplasia confere um pior ou melhor prognóstico ao paciente (PASCHOAL *et al.*, 2012). A presença de atividade juncional é descrita no melanoma humano como um subtipo chamado de melanoma lentiginoso. Esse tipo de atividade consiste na migração de melanócitos da camada basal da epiderme para a porção mais externa dessa mesma camada. Muitas vezes, o acúmulo de vários melanócitos fora da camada basal da epiderme é descrito como “melanoma *in situ*”. Por vezes, essa migração pode ocorrer também em lesões melanocíticas benignas, como em nevus lentiginosos (KING, 2011). Os tumores pigmentados tendem a apresentar um comportamento diverso aos tumores amelanóticos. Em humanos, os grânulos de melanina tumorais exercem influência sobre os melanócitos neoplásicos, facilitando o desenvolvimento de metástases (SLOMINSKI; ZMIJEWSKI; SLOMINSKI, 2015). Porém, na espécie canina, os tumores orais amelanóticos apresentam maiores índices proliferativos quando comparados aos pigmentados (TEIXEIRA *et al.*, 2015).

2.2) Desenvolvimento do Melanoma

O nevo melanocítico benigno é resultado de uma superprodução de novos melanócitos que formam pequenos tumores, mas sem indícios de malignidade. Quase todos os indivíduos saudáveis apresentam nevus benignos ao longo da vida, e, na grande maioria, tais tumores não apresentam risco à saúde, mas, alguns estudos sugerem que indivíduos que apresentam grande quantidade de nevus, possuem maior predisposição a desenvolverem melanoma no futuro

(GOLDSTEIN; TUCKER, 2013). Estudos prévios mostraram que é possível a evolução de nevos displásicos para melanomas, portanto, esse tipo específico de lesão, além de um fator de risco, é considerado um precursor do melanoma cutâneo (DE SOUZA; FISCHER; DE SOUZA, 2004; GOLDSTEIN; TUCKER, 2013).

Os melanomas de crescimento radial, vertical e metastático já são os tumores malignos propriamente ditos (MILLER; JR, 2006). Compreende-se como crescimento radial a fase em que a doença atinge a camada papilar da derme. Os tumores de crescimento vertical são mais invasivos que os de crescimento radial, e possuem maior probabilidade de se desenvolverem na forma metastática (BEDROSIAN *et al.*, 2000).

O melanoma pode apresentar diferentes tipos de metástases. O tumor pode se disseminar por via linfática ou hematogênica, mas a grande parte das metástases iniciais irá acontecer na drenagem dos linfonodos regionais. As metástases do tipo regional podem se apresentar como metástases satélites, que geralmente se localizam em locais de dois centímetros do sítio primário da doença, como metástases em trânsito, que é localizada entre o sítio inicial da doença e o linfonodo regional mais próximo da lesão. Além disso, pode-se apresentar também como metástase linfonoidal, quando o próprio linfonodo é acometido. Já as metástases distantes acometem locais que não são próximos do sítio inicial da neoplasia. Dentre os sítios mais comumente acometidos pela metástase à distância estão o tecido celular subcutâneo, o cérebro, fígado e pulmão (DIMATOS *et al.*, 2009). Infelizmente, nos casos de melanomas, a camada cutânea da derme oferece uma grande rede de vasos capilares que podem ser utilizados como vias de disseminação do câncer. Diferentemente de outras neoplasias, a disseminação do melanoma ocorre pelos vasos sanguíneos e linfonodos já presentes no tecido, sendo prioritária para a formação de novos vasos (angiogênese) para se espalhar (TÍMÁR, 2013).

Inúmeras alterações genéticas ocorrem na transformação neoplásica de melanócitos, entre elas a modificação no gene *P53*, um gene responsável pelo reparo de mutações ou indução de apoptose nos casos em que os danos gênicos são irreparáveis (OZAKI; NAKAGAWARA, 2011). Testes imunohistoquímicos encontraram uma expressão aumentada de *P53* em lesões pré-cancerosas de neoplasias de pele do tipo não-melanoma. Por outro lado, quando os ensaios foram direcionados a neoplasias do tipo melanoma, os resultados foram variados. Pode-se encontrar uma grande variação da expressão de *P53* dentre as amostras de melanoma, o que nos leva a crer que outros processos estão relacionados a esse tipo de carcinogênese, como a

ativação de outros proto-oncogenes (DE SOUZA; FISCHER; DE SOUZA, 2004; RO *et al.*, 1993; WEISS *et al.*, 1995).

Após os danos no DNA, as células neoplásicas sofrem ação de outros fatores para continuar sua progressão. A proteína quinase ativadora de mitose pode ser indevidamente ativada, levando assim à reprodução das células melanocíticas. A ativação dessa via pode resultar em mutações do tipo *NRAS* e *BRAF*. Essas mutações estão presentes em 15 e 50% dos melanomas diagnosticados, respectivamente (MILLER; JR, 2006). As mutações *BRAF* estão relacionadas ao diagnóstico de melanoma em indivíduos jovens e que não tiveram exposição crônica à radiação UV. Por outro lado, a presença de mutações dos tipos *NRAS 31* está associada ao desenvolvimento de tumores nas extremidades do corpo. Atualmente, *BRAF* e *NRAS* estão sendo estudadas como alvos terapêuticos no tratamento do melanoma (EKEDAHL *et al.*, 2013).

Além das mutações *NRAS* e *BRAF*, outras mutações como *KIT*, *PTEN*, *CDKN2A (P16)*, e mais recentemente, *MITF*, *MEK1*, *MEK2*, *GNAQ* e *GNA11* já foram identificadas como possíveis alterações de levariam ao desenvolvimento de diferentes subtipos de melanoma humano (HODIS *et al.*, 2013; MEHNERT; KLUGER, 2015; SAINI *et al.*, 2012; TSAO *et al.*, 2012). Contudo, estudos mais aprofundados, correlacionando com outros marcadores prognósticos associados, local de ocorrência, relação com sobrevida precisam ser explorados em maior profundidade.

2.3) c-Kit e Neoplasias

c-Kit é um receptor transmembrânico de tirosina quinase e é codificado pelo gene *KIT* que está localizado no cromossomo humano 4q12 (MATTEI, 1987; SAINI *et al.*, 2012; SEBOLT-LEOPOLD; ENGLISH, 2006). A primeira identificação dessa molécula ocorreu em um vírus responsável pelo desenvolvimento de leucemias em felinos e posteriormente foi identificada também em camundongos (DECASTRO *et al.*, 1994). O mecanismo de ação do c-Kit é complexo, e seu correto funcionamento apresenta importante papel na regulação homeostática e do desenvolvimento de diversos tipos celulares, incluindo células hematológicas, germinativas e melanocíticas. Estudos realizados com camundongos, em que houve um bloqueio da expressão do c-Kit, mostraram que as cobaias se apresentaram com diminuição da pigmentação do pelo, inférteis e anêmicos (GRICHNIK, 2006). Por ser uma molécula essencial para o crescimento e maturação dos melanócitos, sua expressão pode ser relacionada ao

desenvolvimento do melanoma. Em neoplasias, mutações oncogênicas permitem que o c-Kit se ligue a vários substratos, e esse processo acarreta em diversas alterações celulares que podem favorecer o crescimento tumoral (LENNARTSSON; RONNSTRAND, 2012; LIN *et al.*, 2006; RIVERA *et al.*, 2008). Além disso, a análise c-Kit, que atua como um receptor de fator de crescimento em melanomas, se faz útil devido à sua importância na migração e diferenciação dos melanócitos em sua fase embrionária (MARTÍ; SOROLLA; YERAMIAN, 2012).

Ativações mutacionais no gene *KIT* estão relacionadas ao aparecimento de diversas neoplasias, tais como leucemias, neoplasias do trato gastrointestinal, e neoplasias de células germinativas (WILLMORE *et al.*, 2004). As características das mutações são diversificadas, podendo se apresentar como substituições de bases nitrogenadas ou até mesmo como complexos processos de inserções e deleções (CORLESS *et al.*, 2002; RIVERA *et al.*, 2008; WILLMORE *et al.*, 2004). O principal ligante do c-Kit, o fator de células tronco, constitui o receptor proteico que, segundo Carvajal *et al.*, (2011), “sofre dimerização, autofosforilação e ativação de várias vias de sinalização, dessa forma, mediando o crescimento das células tumorais, a proliferação, metástase e inibição da apoptose.” Para Martí *et al.* (2011), a entendimento do papel da c-Kit no desenvolvimento de neoplasias é importante, mas não deve ser avaliado de forma isolada. É necessário compreender a associação da c-Kit com outros tipos de mutações e quais alterações celulares poderão predispor ao aparecimento da doença.

A proteína possui cinco domínios do tipo imunoglobulina, que são codificados pelos éxons de número um ao nove, que fazem parte da composição do domínio extracelular da molécula. Possui também um domínio transmembrânico que é codificado pelo éxon 10, e um domínio intracelular, que são comandados pelos éxons 11 ao 21. O domínio intracelular pode ser separado em duas categorias distintas: domínio justamebrana de regulação negativa e domínio citoplasmático de tirosina quinase (LETARD *et al.*, 2008). Como resultado de um *splicing* alternativo, duas isoformas da c-Kit já foram encontradas tanto em humanos quanto em camundongos, e mais recentemente, em cães. As duas isoformas se diferem pela presença ou ausência de 4 resíduos de aminoácidos (chamados de GNNK) na porção justamembrana da proteína. Existe grande variação entre a distribuição das diferentes isoformas em diferentes tecidos, e, apesar de o papel desempenhado pelas diferentes isoformas ainda não serem claros, alguns trabalhos indicam uma predominância da isoforma GNNK- em algumas neoplasias (CHEN *et al.*, 2016; LETARD *et al.*, 2008). De acordo com estudos anteriores, a isoforma GNNK- está é predominante no mieloma múltiplo humano (MONTERO *et al.*, 2008). Na

mastocitose sistêmica, a c-Kit GNNK- aparenta conferir resistência das células neoplásicas em relação aos tratamentos convencionais (CHAN *et al.*, 2013). No cão, recentemente foi reportado uma maior incidência da isoforma GNNK- em hemangiossarcomas (CHEN *et al.*, 2016). Essas isoformas também foram descritas em melanomas, sendo sugerido que a avaliação de suas distribuições pode auxiliar na predição de sensibilidade à drogas usadas no tratamento dessa neoplasia (PHUNG; STEINGRÍMSSON; RÖNNSTRAND, 2013).

Estudos realizados por Xu *et al.*, (2014), avaliaram a frequência de mutações *KIT* nos éxons 2, 9, 10, 11, 13, 14, 15, 17 e 18, em tumores gastrointestinais. Das mutações encontradas, a maior parte presente no éxon 11 - sendo do tipo deleção, troca de sentido e inserção - pertenciam aos domínios transmembranico e citoplasmáticos, que é o componente do domínio de regulação enzimática. Os resultados encontrados sugerem que a proteína c-Kit possui grande importância na progressão e regulação de neoplasias gastrointestinais.

Amplificações e mutações *KIT* são encontradas também em tumores gastrointestinais. Estudos realizados por Demetri *et al.*, (2002) mostraram que a utilização de drogas inibidoras de c-Kit constitui uma via favorável de tratamento para aqueles indivíduos que são portadores de mutações *KIT* e que possuem resistência a outros tratamentos, como a quimioterapia. Nesse estudo, foram avaliados 147 pacientes, e, após o tratamento de imatinib, mesmo considerando que grande parte dos pacientes estudados já apresentava extenso quadro de metástase, 88% dos pacientes ainda estavam vivos após um ano de início do tratamento. No ano 2000, estudos similares conduzidos por DeMatteo *et al.*, mostrou que os pacientes com tumores metastáticos tratados com imatinib obtiveram uma média de sobrevivência de 19 meses. Pacientes que, além de metástase apresentava também recorrência local da doença, a média de sobrevivência foi menor, mas ainda significativa (nove meses).

Em 2010, Tetsu *et al.*, estudaram alterações genéticas de origem *KIT* em carcinomas de adenóides císticos de glândulas salivares. Foram analisadas 17 amostras em que, 15 das amostras, o que corresponde a 88%, apresentaram expressar a proteína c-Kit. Dentre os resultados positivos, foi-se ainda avaliado a presença de mutações na proteína. O estudo avaliou, através do método de reação em cadeia da polimerase (PCR), os produtos dos éxons 9, 11, 13 e 17. No resultado da análise mutacional, foram encontradas duas mutações do tipo de troca de sentido, localizadas nos éxons 13 e 17. Ao final dos experimentos, os autores concluíram que, apesar de a expressão da c-Kit ser um fator importante na iniciação desse tipo

de neoplasia, a mesma não é responsável pela manutenção desse tipo de tumor. As avaliações mutacionais da proteína c-Kit geralmente são realizadas nos éxons 9, 11, 13 e 17, e isso se deve ao fato que, em neoplasias como seminomas, leucemias e neoplasias do trato gastrointestinal, as alterações relacionadas ao ganho de função da molécula são encontradas nas regiões a que esses éxons pertencem (HIROTA et al., 1998).

Dentre as mutações de relevância que podem ser encontradas no éxon 11, estão as mutações *KIT* denominadas *Intern Tandem Duplication (ITD)*. Tais mutações consistem na repetição de uma sequência de bases nitrogenadas, podendo variar seu tamanho de 3 a 79 pares de base (pb) (JONES, 2004). A presença dessa mutação resulta na autofosforilação da proteína, gerando uma ativação constitutiva da c-Kit, mesmo na ausência do fator de células tronco (*stem cell factor – SCF*). Esse tipo de mutação já foi identificado em tumores gastrointestinais humanos, sugerindo uma relação entre a presença de *ITDs* e um melhor prognóstico do paciente (LASOTA et al, 2003; JONES, 2004). De forma controversa, na medicina veterinária, *ITDs* estão intimamente relacionadas a um pior prognóstico em mastocitomas caninos, onde cerca de 30 a 50% dos tumores que apresentam a mutação são classificados como auto grau e possuem maior chance de recorrência após excisão cirúrgica (ZAVODOVSKAYA, 2004; AMAGAI, 2013; THOMPSON, 2015; JONES, 2004).

2.4) c-Kit e o Melanoma

A presença de mutações e do aumento da expressão de c-Kit em melanomas ainda é controverso. Melanomas humanos de mucosa, acrais e cutâneos não-induzidos por exposição crônica ao sol apresentaram mutações *KIT*, porém, nenhuma alteração foi encontrada em melanomas cutâneos induzidos por exposição solar crônica (CURTIN et al, 2006).

Ainda existem muitas contradições em relação à expressão da c-Kit e mutações *KIT* em melanomas primários e metastáticos. Avaliações sobre a expressão de c-Kit em ambos os melanomas mostraram que, a expressão da proteína tende a diminuir com a progressão da doença, e que essa menor expressão seria um fator importante para a transição da fase de crescimento radial para a fase mais invasora, de crescimento vertical da doença (BAR-ELI, 2001). Concordando com as afirmações de Bar-Eli, outro estudo realizado por Aslani *et al.*, (2015) avaliou a expressão de c-K em 50 amostras, incluindo melanomas cutâneos e de mucosa, tanto em suas formas primárias como metastáticas. Nesse estudo, os tumores metastáticos

apresentaram menor expressão de c-Kit quando comparados aos tumores primários cutâneos e de mucosa. Estes estudos, porém, contrastam pesquisas anteriores em que foi encontrado alta expressão de c-Kit em melanomas de mucosa metastáticos (CARVAJAL *et al.*, 2011; SARI ASLANI; GERAMIZADEH; DEGHANIAN, 2015; SATZGER *et al.*, 2008).

2.5) Uso de Inibidores de c-Kit Como Tratamento do Melanoma

Mutações *KIT* são frequentes em melanomas de mucosa ou acrais. Por esse motivo, drogas que levam à inibição do gene *KIT* são candidatas a comporem uma nova terapia contra o melanoma. Devido ao fato de os chineses, diferentemente de outras populações, apresentarem alto índice de melanomas acrais e de mucosa e, sendo a mutação *KIT* um dos tipos de mutações mais prevalentes em asiáticos, investigações sobre terapia alvo para c-Kit é uma das prioridades nessa população (KONG *et al.*, 2011). Estudos prévios avaliaram o uso do imatinib em pacientes de melanoma que apresentavam expressão positiva para c-Kit e/ou mutações no gene *KIT*. Foi-se observado uma resposta clínica em cerca de 50% dos pacientes, com maior eficácia no grupo que apresentava mutações *KIT*. No mesmo trabalho, foi sugerida a hipótese de que a presença de mutações *NRAS* poderiam estar associadas à resistência do tumor contra inibidores de tirosina quinase (HODIS *et al.*, 2013).

Guo *et al.* (2011) também desenvolveu ensaios clínicos sobre o uso de imatinib em pacientes com melanomas. Em seu trabalho, foram avaliados o uso do fármaco em pacientes com melanoma metastáticos que expressão c-Kit e/ou apresentavam mutações no gene *KIT*. De forma geral, maior parte dos pacientes tiveram regressão do tamanho do tumor ou uma desaceleração na progressão na neoplasia.

O número de ensaios clínicos utilizando inibidores de c-Kit em melanomas tendem a crescer em todo o mundo. Através desses ensaios, espera-se identificar fatores que influenciam na sensibilidade ou na resistência dos diferentes tipos de fármacos inibidores de c-Kit e desenvolver novos inibidores que possam auxiliar na terapia de melanomas metastáticos, considerando qual o tipo de mutação que possui melhor resposta a cada tipo de fármaco. Além disso, estudos atuais procuram identificar se existem variações clínicas relacionadas a diferentes prognósticos em casos em que só há amplificações c-Kit, casos em que só há mutações e casos que ambas alterações estejam presentes além de também compreender os mecanismos responsáveis pelo desenvolvimento de resistência dos tumores aos fármacos (MARTÍ *et al.*, 2011).

3. JUSTIFICATIVA

Por se tratar de uma neoplasia agressiva, de alta letalidade e de difícil tratamento, o diagnóstico precoce em cães compõe um fator importante para o aumento da sobrevivência do animal. Muitos pacientes não respondem bem aos tratamentos convencionais aplicados ao melanoma e a ressecção cirúrgica do tumor, dependendo da sua localização e grau de extensão, pode comprometer a qualidade de vida do animal. Portanto, estudos que relacionam a c-Kit ao desenvolvimento neoplásico do melanoma devem ser estimulados com a finalidade de melhorar a avaliação do quadro prognóstico do paciente e também com o intuito do desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas baseadas na inibição do receptor de tirosina quinase. Além de beneficiar a qualidade de vida dos cães portadores dessa neoplasia, estudos posteriores poderão utilizar tais resultados como base comparativa para pesquisas relacionadas ao melanoma humano.

4. HIPÓTESE

A expressão da c-Kit pode estar relacionada a mutação no éxon 11 do tipo *ITD* e se correlacionar com características histológicas de comportamento agressivo em melanomas cutâneos e orais em cães.

5. OBJETIVO GERAL

Determinar a expressão da c-Kit a ocorrência de mutações do tipo *ITD* no éxon 11 e sua relação com características histopatológicas melanomas cutâneos e da mucosa oral em cães.

6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Classificar, de acordo com os critérios histopatológicos empregados em diagnósticos e caninos, melanomas caninos (cutâneo e oral, pigmentado e não pigmentado).
- Caracterizar a expressão imuno-histoquímica Ki-67 e c-Kit em células neoplásicas de melanomas caninos (cutâneo e oral).
- Identificar a presença de *ITD* no éxon 11 do gene *KIT* em amostras de melanoma canino oral e cutâneo.

- Correlacionar a expressão de c-Kit com os parâmetros histopatológicos em melanomas caninos cutâneos e orais.
- Correlacionar a expressão de c-Kit com o índice de proliferação celular (Ki-67) em melanomas caninos cutâneos e orais.

7. MATERIAIS E MÉTODOS

7.1) Avaliação e classificação histológica

Para a execução desse trabalho foram utilizadas 80 amostras de melanoma canino (26 orais e 54 cutâneos), obtidas do acervo do Laboratório de Patologia Comparada, do Departamento de Patologia Geral, da Universidade Federal de Minas Gerais. Todas as amostras foram fixadas em formal tamponado e armazenadas em blocos de parafina. Foram utilizados os casos obtidos através da excisão cirúrgica dos tumores entre os anos de 2006 e 2017. Para a avaliação histológica, foram preparadas lâminas contendo cortes contendo 4µm de cada amostra. Posteriormente, os casos foram corados por hematoxilina e eosina (HE) e avaliados, de forma independente, por dois patologistas experientes para a confirmação do diagnóstico e subsequente classificação histológica seguindo os critérios do *International Histological Classification of Tumors of Domestic Animals*, estabelecido pela Organização Mundial de Saúde. O trabalho foi realizado de acordo com os princípios éticos para uso de animais em experimentação e após aprovação pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/CEUA) da Universidade Federal de Minas Gerais, submetido com número de protocolo 08/2016.

Dentre as características histopatológicas, foram avaliados o grau de pigmentação do tumor – através de uma escala sem quantitativa que apresentava os escores 0 (não-pigmentado), 1 (pigmentação de até 25% das células tumorais), 2 (pigmentação de 26-50% das células tumorais) e 3 (mais de 50% das células tumorais apresentando pigmento) –, a morfologia das células tumorais (fusiformes, apresentando morfologia semelhante aos fibroblastos, ou epitelióides, apresentando morfologia mais arredondada), presença de atividade juncional (apresentando o padrão pagetóide e/ou lentiginoso), presença de desmoplasia e evidência de invasão vascular tumorais (êmbolo neoplásico).

7.2) Procedimento da imuno-histoquímica

Para a imunohistoquímica, foram realizados cortes de 4µm, que foram fixados em lâminas gelatinizadas para maior adesão. Foram realizados ensaios para a avaliação de Melan-A (clone A103, diluição 1:100) e Melanoma Antigen (clone PNL-2, diluição 1:100) (ambos utilizados para a confirmação diagnóstica de melanoma em tumores amelanóticos e pigmentados), CD117 (c-kit) (clone CD117, diluição 1:800) e Ki-67 (avaliação do índice proliferativo) (clone MIB-1, diluição 1:50). O experimento foi realizado através do método do complexo estreptavidina-peroxidase. Primeiramente, todas as lâminas foram submetidas ao processo de desparafinização, através de banhos de 15 minutos em dois recipientes contendo Xilol, e reidratação, através de banhos de 3 minutos em álcoois com diluições decrescentes (100, 90, 80 e 70%) e 10 minutos em água destilada. A recuperação antigênica foi realizada através de calor pressurizado (Pascal®), com solução de citrato pH 6,0 (DakoCytomation Target Retrieval Solution) diluído a uma concentração de 10%, a uma temperatura de 125°C por 40 minutos, e posteriormente resfriado em temperatura ambiente por 20 minutos. Todas as lâminas foram incubadas com os respectivos anticorpos primários, por um período de 18 horas (*overnight*), a 4°C, de acordo com a Tabela 1. A amplificação da reação foi realizada através do sistema de amplificação comercial Novolink (Novolink Polymer Detection Sistem; Leica Biosystems, Newcastle upon Tyne, UK) de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante. A reação entre antígenos e anticorpos foi realizada através da revelação com o cromógeno 3,3' tetraclorido de diaminobenzidina (DAB) (Dako) por 3 minutos. Após a lavagem do cromógeno, os tecidos foram contra corados por Giemsa, diluído a 20%, por um período de 30 minutos. Posteriormente, as lâminas foram submetidas a um processo de diferenciação em ácido acético glacial a 1% e álcool isopropílico, desidratadas e montadas com Entellan® (Merck).

Para a obtenção dos controles negativos, os respectivos anticorpos primários foram substituídos por tampão fosfato-salino (PBS). Como controle positivo interno para Melan-A, Melanoma Antigen e Ki-67 foi-se observado a marcação positiva do epitélio basal epiderme. Para o CD117 (c-kit), a marcação positiva de mastócitos foi utilizada como controle positivo.

Tabela 1. Anticorpos utilizados no procedimento de imuno-histoquímica e suas respectivas especificações.

Anticorpo	Fonte	Clone	Amplificação	Recuperação
KI-67	DAKO	MIB-1	Novo-Link	Citrato + Calor pressurizado
CD117 (c-kit)	DAKO	Policlonal	Novo-Link	Citrato + Calor pressurizado

Melan-A	DAKO	A103	Novo-Link	Citrato + Calor pressurizado
Melanoma Antigen	Santa Cruz	PNL-2	Novo-Link	Citrato + Calor pressurizado

7.3) Interpretação da imuno-histoquímica

Positividade para Melan-A e PNL-2 foi identificada através da presença de marcação citoplasmática de cor amarronzada e sua avaliação se deu pela abordagem semiquantitativa (SMEDLEY *et al.*, 2011). Para a determinação do índice proliferativo por meio da imuno-histoquímica para Ki-67, foi realizado a identificação de áreas *hot spots* no tumor, onde foram contadas um total de 500 células tumorais, em uma magnificação de 400x. Dentro do total de células contadas, foi-se realizado o cálculo de porcentagem do número de células que apresentavam marcação citoplasmática amarronzada, obtendo-se assim, o índice proliferativo daquela amostra.

Células c-Kit positivo foram avaliadas de acordo com o percentual de células marcadas, assumindo os seguintes escores semiquantitativos: 0 = <5%, 1 = 5 – 50%, 2 = 51 – 95% e 3 = ≥95% das células marcadas (TORRES-CABALA *et al.*, 2014); de acordo com a intensidade da marcação, considerando 0 = ausência de marcação (-), 1 = marcação fraca (+), 2 = marcação moderada (++) e 3 = marcação forte (+++); e também de acordo com o sítio celular que apresenta a marcação, sendo padrão KIT 1 = marcação estritamente associada à membrana celular, padrão KIT 2 = marcação citoplasmática, apresentando padrão de marcação focal, perinuclear ou pontilhado, padrão KIT 3 = marcação citoplasmática difusa. Nos casos em que amostras apresentaram marcação simultânea em diferentes sítios celulares, prevaleceu o padrão KIT de maior número (KIT 3 > KIT 2 > KIT 1), sendo necessário, porém, que pelo menos 10% das células tenham apresentado as características descritas para o padrão KIT designado (KIUPEL *et al.*, 2004).

7.4) Identificação de polimorfismos

Para a identificação de polimorfismos no gene *KIT*, foi realizado um ensaio de reação em cadeia da polimerase (PCR). Para isso, foi-se realizada a extração de DNA das amostras fixadas em formal, armazenadas em blocos de parafina, através da utilização do *RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation Kit* (Ambion), seguindo-se as instruções fornecidas pelo fabricante. Após extração, o DNA obtido foi quantificado e teve sua relação de absorvância em 280/260nm

avaliados através do *NanoDrop Nucleic Acid Quantification* (Thermo Fisher Scientific). Foram selecionadas as amostras que apresentaram uma concentração de DNA superior a 25ng/ μ L e aquelas que apresentaram um valor de relação de absorvâncias superior a 1.5.

Para o procedimento de PCR e possível identificação de *ITD*, foi usado o par de primers (THOMPSON *et al.*, 2016) descritos na Tabela 2, que contém a sequência correspondente ao éxon e íntron 11 do gene *KIT*. Como controle positivo da reação, foram utilizadas sequências de GAPDH, especificamente desenhados para a espécie canina.

Tabela 2. Primers, *forward* e *reverse*, do gene *KIT* utilizados para a identificação de polimorfismos.

	Sequência do primer	Tamanho do produto (pb)
c-Kit forward	5' CCC ATG TAT GAA GTA CAG TGG AAG 3'	190bp
c-Kit reverse	5' GTT CCC TAA AGT CAT TGT TAC ACG 3'	

O volume total da reação para cada amostra foi de 25 μ L, contendo 1 μ L de DNA, possuindo uma concentração mínima de 25ng/ μ L e uma concentração média dentre as amostras de 100ng/ μ L. Além disso, para cada caso foram utilizados 0,5 μ L do primer *c-Kit forward* e 0,5 μ L do primer *c-Kit reverse*; 0,5 μ L de *Amplitaq* (AmpliAq Gold DNA Polymerase, Thermo Fisher Scientific); 0,5 μ L de desoxinucleotídeo trifosfato (dNTP-mix) e 2,5 μ L de tampão para PCR. Foram-se realizados 40 ciclos, seguindo as seguintes condições: 95°C por 2 minutos, 95°C por 15 minutos, 57°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos e 72°C por 5 minutos. Os produtos da amplificação foram visualizados através de eletroforese de gel de poliacrilamida a 10%.

Após a eletroforese, a presença de *ITD* poderia ser identificada através da inserção de 3 – 79pb no produto da amplificação, resultando em um produto total de tamanho variando entre 193 – 269pb, em contraste com o *KIT wild type*, que possui um produto de tamanho de 190pb (JONES *et al.*, 2004; THOMPSON *et al.*, 2016).

7.5) Análise Estatística

Para a análise estatística, foi utilizada o *software InStat (GraphPad Software)*, versão 3.0. O teste de correlação de *Spearman* foi utilizado para estimar a relação entre os critérios de marcação da expressão imuno-histoquímica para c-Kit com os diferentes parâmetros histológicos avaliados. Com o objetivo de ser avaliar as proporções tal como as possíveis

divergências entre as frequências observadas para cada variável, foram utilizados os testes de *Qui-Quadrado* e o Teste Exato de *Fisher*. Os testes de *Mann-Whitney* e *Kruskal-Wallis* foram utilizados para a comparação de média entre dados não paramétricos do estudo. Foram consideradas resultados estatisticamente significativos aqueles que apresentaram $P \leq 0,05$.

8. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados serão apresentados na forma de artigo científico que se encontra na norma do periódico ao qual será submetido.

Artigo: **Expressão de c-Kit e identificação de *ITD* em melanomas caninos orais e cutâneos.** Este trabalho será submetido ao *BMC Veterinary Research*, que possui Qualis CAPES B2 na área de avaliação Medicina II e fator de impacto de 2.07.

ARTIGO

c-Kit expression and *ITD* identification in canine, oral and cutaneous, melanoma

Ivy Nayra. N. Gonçalves^a, Emerson S. Veloso^a, Tatiany Luiza Silveira^a, Geovanni Dantas Cassali^a, Renata Toscano Simões^b, Mariana Rodrigues Ottoni^b, Istefani L. D. da Silva^a, Enio Ferreira^a

^aDepartment of General Pathology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais

^bInstitute of Education e Research of Santa Casa

Corresponding Author: Enio Ferreira, enioferreira@icb.ufmg.br

Abstract

C-Kit, a transmembrane receptor tyrosine kinase, participates in carcinogenic processes in several neoplasias, presenting aberrant expressions and, sometimes, mutations in the *KIT* gene, already described as the *ITDs*. The expression of c-Kit and mutations in their respective gene have already been identified in different types of melanoma, but their mechanism of action in this neoplasia still lacks future investigations. Thus, this work aimed to evaluate the immunohistochemical expression of c-Kit and its correlation with the histopathological features of oral and cutaneous canine melanomas such as the identification of *ITD*-like mutations in exon 11 of the *KIT* gene. We used 80 cases of melanoma (26 oral and 54 cutaneous), fixed in formaldehyde and embedded in paraffin, selected from the collection of the Comparative Pathology Laboratory of UFMG. Protein expression of c-Kit was assessed by immunohistochemistry for CD117 (Polyclonal), correlating its results with tumor histopathological characteristics and the cell proliferation index obtained by immunohistochemistry for Ki-67 (MIB-1). The identification of *ITD*-like polymorphisms in exon 11 was evaluated by means of the conventional PCR technique. About 35% of melanomas were positive for c-Kit. Among cutaneous cases, there was a positive correlation between immunohistochemical evaluations for c-Kit with cell proliferation (Ki-67 expression), a fact that was not repeated when only oral cases were evaluated. Regarding the research of *ITD* mutations, no sample presented such alteration. Thus, it is concluded that, although present in both oral and cutaneous melanomas in dogs, c-Kit plays a differentiated role in each type of tumor, and may be closely related to cellular proliferation in cutaneous tumors. Moreover, the absence of *ITD* mutations in these samples does not rule out the lack of other gene mutations, which, therefore, should be investigated with a purpose to understand their role in the development of this neoplasm and generate possible therapeutic targets.

Keywords: c-Kit; melanoma; intern tandem duplication; dog.

Background

Melanoma is the most aggressive type of skin cancer and its incidence has been raising worldwide annually, especially among Caucasian population [1,2]. Besides the epidermis, this cancer may develop from any anatomic site that contains melanocytic cells, as respiratory tract, urogenital, gastrointestinal tract and oral mucosa [3,4]. According to the Nacional Cancer Institute, in 2017 are expected more than 87,000 new cases of cutaneous melanoma just in the United States, with a death estimation of 9,730 from those. On the other hand, the oral melanoma has a 5-year survival rate ranging from 15% to 38% [5].

Due to the increasing number of people diagnosed with this disease and to its malignancy potential, the study of this tumor in animals are valuable and necessary for a better understanding of its biology and behavior at a molecular level. In this way, the dog is a useful tool in melanoma's comprehension, considering that it allows deep studies about tumors spontaneously developed in those animals besides to the fact that this species neoplasms often share, with humans, many histopathological features, signaling pathways and etiological factors, what make them comparable at a molecular level [6]. Besides that, veterinarian studies about this disease are still scarce, so, more researchers about this type of cancer in dogs are needed.

Oral melanoma is the most common canine neoplasm that affects the oral cavity. It presents a very diverse biologic behavior, poor prognosis and it may be found in gingiva, lips, tongue and hard palate. About the cutaneous type, it represents approximately 7% of all malignant neoplasms diagnosed in the skin of dogs [7,8]. To determine the prognostic values, the use of immunohistochemistry essays for KI-67 is already well established, as well as the evaluation of the mitosis index by analyzing the tumor tissue under H&E staining. Because they both are associated with cell proliferation, high scores of it indicate a poorer prognosis in melanoma [9]. Besides that, the analysis of alterations in some genes, as NRAS, BRAS, and KIT, is useful not just as a prognostic, but also as a predictive value [10].

c-Kit is a transmembrane receptor of tyrosine kinase, encoded by the KIT gene that is located on the human chromosome 4q12 [11,12]. It has the Stem Cell Factor (SCF) as a ligand, and it belongs to the plate-derived growth factor family of the tyrosine kinases [13]. The mechanism of action of C-KIT is complex, and its correct functioning plays an important role in the

homeostatic regulation and development of several cell types, including hematological, germinative and melanocytic cells.

Mutations in the KIT gene are related to the appearance of several neoplasms. The mutations are diverse and may occur as a gain or loss of function mutation. More than 500 diverse c-Kit mutations have been already described in human's tumors, but it is still unknown the amount of them that work as a driver mutation in the neoplastic process. In canine mast cell tumors, internal tandem duplications (*ITD*), localized in exon 11 of the juxtamembrane domain of KIT have been already investigated. This alteration can lead to an autophosphorylation of KIT without the presence of SCF binding [14,15].

For a better understanding of melanoma mechanisms in dogs and also to increase the comprehension of the c-Kit as a predictive and prognostic tool in these tumors, the present study attempts to evaluate the immunohistochemistry expression of c-Kit as well as identify the presence of *ITD* in canine, cutaneous and oral, melanomas.

1. Material and Methods

Histologic evaluation and classification

The tissues obtained for this study consisted of 80 canine melanomas (26 oral and 54 cutaneous) retrieved from the archive of the Comparative Pathology Laboratory, Department of Pathology, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil. Sections of 4- μ m sections from formalin-fixed and paraffin-embedded tissues were stained with hematoxylin and eosin (H&E). Each sample was re-examined independently by two pathologists (E.F. and T.S.) to confirm the diagnosis according to the criteria of the International Histological Classification of Tumors of Domestic Animals established by the World Health Organization.

The following clinicopathological features evaluated the degree of pigmentation, as well its presence or absence, the morphology of neoplastic cells (spindle or epithelioid), the presence of junctional activity (lentiginous and pagetoid types), desmoplastic tissue and tumor vascular invasion. Pigmentation degree was estimated by a subjective scale ranging from 0 (non-pigmentation), 1 (pigment until 25% of neoplastic cells), 2 (pigmentation in 26-50% of neoplastic cells) to 3 (pigment in >50% of neoplastic cells).

Immunohistochemistry procedure

For immunohistochemistry, 4µm sections were prepared for the detection of Melan-A, PNL-2, CD117 (c-Kit) and Ki-67. The experiment was carried out by the streptavidin-peroxidase complex method with a commercial detection anti-mouse/anti-rabbit system (Novolink Polymer Detection System; Leica Biosystems, Newcastle upon Tyne, UK) according to the manufacturer's instructions. Antigen retrieval was performed by Pascal® in citrate buffer pH 6,0 (DakoCytomation Target Retrieval Solution) in 125°C for 40 minutes, followed by cooling for 20 minutes at room temperature. All sections were incubated with the primary specific antibody: Melan-A (1:100 dilution, Clone A103; Dako, Glostrup, Denmark), Melanoma Antigen (1:100 dilution, Clone PNL2; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA), CD117 (1:800 dilution, Polyclonal; Dako, Glostrup, Denmark), and Ki-67 (1:50 dilution, Clone MIB-1; Dako, Glostrup, Denmark) for 18h at 4 °C. The antibody reaction products were observed by revealing with the chromogen 3,3' -diaminobenzidine tetrachloride (DAB) in DAB diluent for 3 minutes. After the last washing in distilled water, sections were counterstained with GIEMSA for the period of 30 minutes, differentiated in a solution of glacial acetic acid 1% and isopropyl alcohol, dehydrated and mounted. The primary antibody was replaced with phosphate-buffered saline (PBS) for negative controls and this study also included adequate positive controls. The positive control used for CD117 antibody was tissue mastocytes staining; epidermis was used as an internal positive control for Melan-A, Melanoma Antigen, and Ki-67.

Analysis of immunoreactivity

Positivity for Melan-A and Melanoma Antigen were identified by the presence of distinct brown cytoplasmic labeling and were evaluated by a semiquantitative method previously described [16]. C-Kit positive cells were evaluated according to the number of stained cells, in a semiquantitative way, assuming the scores 0 = <5%, 1 = 5 – 50%, 2 = 51 – 95% and 3 = ≥95% of positivity [17]; according to the intensity of staining, considering 0 = absence (-), 1 = weak staining (+), 2 = moderate staining (++) , and 3 = strong staining (+++); and also according to the cellular site of the staining: KIT-staining pattern 1 = membrane-associated , KIT-staining pattern 2 = focal or stippled cytoplasmic and KIT-staining pattern 3 = diffuse cytoplasmic marking [18].

To determine the Ki-67 index, hot spot areas were searched and it was counted 500 tumor cells per slide, with the help of a microscopic grid, at high magnification ($\times 400$) and the index was expressed as a percentage. Oral samples with more than 54% and cutaneous samples with more than 34% of Ki-67 index were considered high-proliferative (media + 1 value of standard deviation).

Polymorphisms identification

For the polymorphism identification, it was performed a standard polymerase chain reaction (PCR). To do so, formalin-fixed paraffin-embedded tissue blocks (FFPE) DNA were extracted using the RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation Kit (Ambion), following the steps according to the manufacturer instructions. Extracted DNA was quantified and had its 260/280nm absorbance value checked by NanoDrop Nucleic Acid Quantification (Thermo Fisher Scientific). Absorbances values higher than 1.5 were considered for this study. For the PCR procedure and possibly identifications of c-Kit *ITD*, it was used a pair of primers [15], as described in Table 1, that contains c-Kit exon and intron 11. As a reaction positive control, it was used the canine GAPDH primer.

Table 1. c-Kit forward and reverse primers used for polymorphism identification

	Primer Sequence	Product Size (bp)
c-Kit forward	5' CCC ATG TAT GAA GTA CAG TGG AAG 3'	190bp
c-Kit reverse	5' GTT CCC TAA AGT CAT TGT TAC ACG 3'	

A total reaction volume of 25 μ L was prepared containing 1 μ L of extracted DNA, considering each sample with a minimum concentration of 25nL of DNA (average concentration: 100 ng/ μ L) per 1 μ L of the sample. Besides that, it was used 0.5 μ L of forward and 0.5 μ L of reverse c-Kit primer, 0.5 μ L of Amplitaq (AmpliTaQ Gold DNA Polymerases, Thermo Fisher Scientific), 0,5 μ L of deoxynucleotide triphosphate (dNTP-mix) and 2,5 μ L of PCR reaction buffer. It was performed 40 cycles with the following cycling conditions for c-Kit amplification: 95°C for 2 minutes; 95°C for 15 minutes; 57°C for 30 seconds; 72°C for 30 seconds and 72°C for 5 minutes. The visualization of the amplified products was performed by polyacrylamide gel electrophoresis on 10%.

After electrophoresis, *ITD*'s presence could be identified by an insertion ranging from 3 to 79 base pairs (bp), resulting in a total size amplification ranging between 193 – 269bp, in contrast with c-Kit wild type, which has a product size of 190bp [14,15].

Statistical analysis

The statistical software InStat (GraphPad Software) version 3.0 was used for statistical analysis. Spearman's correlation test was used to estimate the relationship between the staining patterns of different antibodies used and also different histopathological features. In order to be able to evaluate the proportions, as well as the possible divergences between the observed frequencies for each variable, the Chi-Square and Fisher's Exact Test, were used. The Mann-Whitney and Kruskal-Wallis tests were used to compare the mean between non-parametric data from the study. To denote statistically significant differences, it was considered all analyses that showed a $P \leq 0.05$.

2. Results

Diagnosis confirmation

All cases included in this work had its diagnosis confirmed by two adept veterinarian pathologists (E.F and T.S). Besides that, all samples had positive staining immunohistochemistry for Melan-A and/or PNL-2.

Histological features

Samples were analyzed taking to count the following histological features: pigmentation, the morphology of neoplastic cells (spindle or epithelioid), the presence of junctional activity (lentiginous and pagetoid types), desmoplastic tissue and tumor vascular invasion, in both cutaneous and oral samples (Table 2). When correlated to c-Kit positivity by immunohistochemistry, it was found a significant and positive correlation between c-Kit-positive cells and the oral samples ($P = 0.0139$), also between it and the epithelioid morphology ($P = 0.0363$). From c-Kit-positive samples, it was compared the KIT pattern with pigmentation and a significant and positive correlation was found between it ($P = 0.0072$). No correlation was found among the other features and c-Kit-positive samples.

Table 2. Summarization of all samples' histological features that were analyzed.

	Histologic Type		Junctional Activity				Pigmentation Degree			
	Spindle	Epithelioid	Lentiginous	Pegetoid	Desmoplastic		0	1	2	3
					Tissue	Vascular				
Oral	4	22	9	9	7	13	12	12	1	1
Cutaneous	19	35	16	12	26	25	6	27	11	10

Immunohistochemistry analysis for c-Kit

From the immunohistochemistry procedure, from the 80 cases studied, 28 (35%) samples were, anyhow, positive for c-Kit staining. Oral samples showed positivity in 14/26 (54%), on the other hand, cutaneous samples had 14/58 (24%) of positivity for c-Kit (Figure 1). Under chi-square analysis, c-Kit positivity for the oral samples was statistically higher than positivity for the cutaneous samples ($P = 0.0142$). All positive samples, mucosal and cutaneous, presented a low or medium number of marked cells, ranging from 5 to 95% of staining. No samples showed a score 3 ($\geq 95\%$) about the number of c-Kit-positive cells. The intensity ranged from light (42%) to strong staining (28%). About the stained cell location, it was found positive marking showing either KIT I, II or III patterns, with most of the cases presenting a diffuse cytoplasmic positivity. 9 (32%) of the positive samples were marked in two different cellular regions (diffuse cytoplasm and membrane; diffuse cytoplasm and stippled cytoplasm or stippled cytoplasm and membrane) (Figure 2 – A and B).

Among the positive samples, it was performed a Spearman's test correlating each IHC c-Kit characteristic (number of marked cells, staining intensity and KIT pattern) with all histological features previously described. All tests showed non-significant results ($P > 0.05$), except by a positive correlation between KIT pattern and tumor pigmentation ($P = 0.0072$; $r = 0.50$). By using the Kruskal-Wallis test, when c-Kit staining intensity scores 1 and 2 were analyzed, it was found that the samples with stronger intensity were more pigmented ($P = 0,0322$).

From all cases undergone to Ki-67 immunohistochemistry, only 55 samples showed to be reactive to this antibody, so, only those cases were evaluated (Figure 2 – C and D). When correlated to immunohistochemistry Ki-67 results, positive c-Kit cases showed positive and

weak correlation taking to account the number of positive cases ($P = 0.0121$; $r = 0.34$), number of neoplastic cells stained ($P = 0.0054$; $r = 0.37$), marking intensity ($P = 0.0144$; $r = 0.33$) and KIT pattern ($P = 0.0109$; $r = 0.34$). Once the samples were divided in two groups, according to its anatomical origins (oral and cutaneous samples), the cutaneous group still presented a statistical correlation with c-Kit parameters, except by the number of positive cases, as following: number of neoplastic cells stained ($P = 0.0452$; $r = 0.33$), marking intensity ($P = 0.0429$; $r = 0.33$) and KIT pattern ($P = 0.0357$; $r = 0.36$).

Exon 11 c-Kit ITD identification

From the 80 paraffin blocks available, unfortunately, it was possible to perform DNA extraction with an integral nucleic acid of only 18 samples, due to the quality and age of the material available (Table 3). All extracted samples amplified the c-Kit wild-type exon 11 (190bp) and also the canine GAPDH as a positive control (Figure 3). No samples showed a 238 – 259bp amplification as expected in case of presence of *ITDs*.

Table 3. Number of cases with integral nucleic acid after DNA extraction, divided according to its original location and c-Kit positivity under IHC.

	Oral	Cutaneous
c-Kit +	8	8
c-Kit -	1	1
Total	9	9

3. Discussion

High expression or c-Kit mutation have been already associated with different types of cancer, in both humans and dogs. In humans, a study carried out in 2004 showed a c-Kit IHC expression in 100% of gastrointestinal stromal tumors (GISTs) and 36% of cutaneous malignant melanomas [19]. Two other studies, both published in 2008, showed higher IHC c-Kit expression for human mucosal melanoma. The first had 100% of c-Kit-positive cases in human mucosal melanoma of the head/neck, while the second one showed around 90% of c-Kit positivity in human's oral mucosal melanomas [20,21]. Among dog malignant neoplasms, it has been described a 100% of IHC c-Kit positivity in canine cutaneous mast cell tumors

(MCTs) and also in GISTs [22,23]. According to previous literature, around 78% of canine cutaneous melanoma are positive for c-Kit under IHC, and 51% of canine oral melanomas show this positivity [24,25]. Our results corroborate with the previous findings in canine oral melanomas, but, we had a lower number of cutaneous positive samples compared to Murakami's study in 2012 [24].

Although its high protein expression, c-Kit's role in melanoma is still not well established as in other neoplasms. While its expression is already considered a maker of poorer prognosis as well as a target for treatment in human and canine cancers, c-Kit has a controversial position among subtypes of melanoma [26]. When correlated with the tumor histological features, our results didn't show any correlation between IHC c-Kit expression and parameters that may suggest higher aggressiveness, as the presence of neoplastic embolus, what is in accordance to Gomes [25] previous reports. In melanomas, the c-Kit expression might be related to other processes, like cellular proliferation, rather than participate actively in the development of the histological features analyzed.

It was found a correlation between c-Kit IHC expression and a higher proliferative activity in the cutaneous samples, visualized through Ki-67 evaluation. This may be explained by the proliferative role of c-Kit in non-pathological situations in different types of cells, and also to c-Kit participation in human pancreatic cancer and dog's MCT [27,28].

Differences found between oral and cutaneous samples, according to c-Kit protein expression found, might suggest that each tumor has its particularity and should be considered a distinct type of neoplasm. In the same way, c-Kit itself can lead to different molecular downstream according to the tumor's particularities and microenvironment. Besides that, it is possible that the presence of different c-Kit isoform variants, resultant from an alternative mRNA splicing, may play distinct roles in the carcinogenesis process [29]. In human, two major c-Kit isoforms have been studied. They differ in the presence or absence of four amino acids (GNNK) in the protein juxtamembrane region. GNNK+ and GNNK- c-Kit isoforms present different functions and its prevalence are also distinct in a large number of normal tissues and neoplasms. It looks like the GNNK- are generally more abundant and present a higher oncogenic potential [30]. In 2013, a study showed that the evaluation of these c-Kit variants could help to predict melanoma drug sensitivity [31]. So, as in humans, these two variants were also described in canine tissue and associated with tumorigenesis in dog's hemangiosarcoma [32]. So, it is possible that oral

and cutaneous samples present a different number of each isoform variant, what would explain the apparently distinct role of c-Kit in that tumor, but, due to the small structural variance between the isoforms, it is not possible to distinguish them by the IHC approach only.

The presence of exon 11 *ITDs* was already described in canine GISTs and MCTs. In MCTs, the presence of *ITDs* leads to a constitutive activation of KIT, independent of its ligand (SCF) presence, thus, it's related to a poorer MCTs prognosis associated with a higher histologic grade [22,23]. However, when canine mucosal melanoma was screened for this same mutation, no positive results were found. Another study, also carried out in canine melanomas, showed a small number of cases harboring exon 11 c-Kit mutations, but those mutations were point mutations, and not *ITDs* [24,33]. Those previous work matches to our finds, and suggest that, besides the absence of exon 11 *ITD*, the mutational screening is still a useful tool when it comes to melanoma prognosis and treatment. Further investigations to better understand the c-Kit mechanism in this neoplasm are necessary, including the distinction between c-Kit isoforms among melanoma types and mutational screening looking for polymorphisms beyond exon 11 *ITDs*, like in éxons 13 and 17. This screening can help in the improvement of new alternative therapies, using those mutations as targets for new drugs and, as a consequence, bettering the overall survival.

4. Conclusions

In conclusion, we observed that although the absence of *ITD* in the samples analyzed, c-Kit is still expressed in canine, cutaneous and oral, melanomas. The oral samples expressed more c-Kit than the cutaneous case. Although, c-Kit looks to play a role in the proliferation of cutaneous melanoma, evidenced by Ki-67 analysis.

5. Declarations

Fundings

This research was supported by CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento e Pesquisa), and FAPEMIG (Fundação de amparo à pesquisa do Estado de Minas Gerais).

Competing interests

None of the authors has any financial or personal relationships that could inappropriately influence the content of this paper.

6. References

1. Rastrelli M, Tropea S, Rossi CR, Alaibac M. Melanoma: epidemiology, risk factors, pathogenesis, diagnosis and classification. *In Vivo (Brooklyn)*. [Internet]. 2014;28:1005–11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25398793>
2. Ali Z, Yousaf N, Larkin J. Melanoma epidemiology, biology and prognosis. *Eur. J. Cancer, Suppl.* [Internet]. Elsevier Ltd; 2013;11:81–91. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejcsup.2013.07.012>
3. Tsao H, Chin L, Garraway LA, Fisher DE. Melanoma: From mutations to medicine. *Genes Dev.* 2012;26:1131–55.
4. Satyamoorthy K, Herlyn M. Cellular and molecular biology of human melanoma. *Cancer Biol. Ther.* 2002;1:14–7.
5. Green TL, Greenspan D, Hansen LS. Oral melanoma: report of case. *J. Am. Dent. Assoc.* [Internet]. 1986;113:627–9. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002817786340169>
6. Atherton MJ, Morris JS, McDermott MR, Lichty BD. Cancer immunology and canine malignant melanoma: A comparative review. *Vet. Immunol. Immunopathol.* [Internet]. Elsevier B.V.; 2016;169:15–26. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetimm.2015.11.003>
7. Bongiovanni L, D'Andrea A, Porcellato I, Ciccarelli A, Malatesta D, Romanucci M, et al. Canine cutaneous melanocytic tumours: Significance of β -catenin and survivin immunohistochemical expression. *Vet. Dermatol.* 2015;26.
8. Bergman PJ. Canine Oral Melanoma. *Clin. Tech. Small Anim. Pract.* 2007;22:55–60.

9. Weinstein D, Leininger J, Hamby C, Safai B. Diagnostic and prognostic biomarkers in melanoma. *J. Clin. Aesthet. Dermatol.* [Internet]. 2014;7:13–24. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25013535> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4086529>
10. Goldinger SM, Murer C, Stieger P, Dummer R. Targeted therapy in melanoma - the role of BRAF, RAS and KIT mutations. *Eur. J. Cancer, Suppl.* [Internet]. Elsevier Ltd; 2013;11:92–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejcsup.2013.07.011>
11. Sebolt-Leopold JS, English JM. Mechanisms of drug inhibition of signalling molecules. *Nature.* 2006;441:457–62.
12. Saini M, Jha AN, Abrari A, Ali S. Expression of proto-oncogene KIT is up-regulated in subset of human meningiomas. *BMC Cancer* [Internet]. 2012;12:212. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3443037&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
13. Alexeev V, Yoon K. Distinctive role of the cKit receptor tyrosine kinase signaling in mammalian melanocytes. *J. Invest. Dermatol.* [Internet]. Elsevier Masson SAS; 2006;126:1102–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/sj.jid.5700125>
14. Jones CLR, Grahn RA, Chien MB, Lyons LA, London CA. Detection of c-kit mutations in canine mast cell tumors using fluorescent polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Vet. Diagnostic Investig.* [Internet]. 2004;16:95–100. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15053358
15. Thompson JJ, Morrison JA, Pearl DL, Boston SE, Wood GA, Foster RA, et al. Receptor Tyrosine Kinase Expression Profiles in Canine Cutaneous and Subcutaneous Mast Cell Tumors. *Vet. Pathol.* [Internet]. 2016;53:545–58. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0300985815610388>
16. Smedley RC, Lamoureux J, Sledge DG, Kiupel M. Immunohistochemical Diagnosis of Canine Oral Amelanotic Melanocytic Neoplasms. *Vet. Pathol.* [Internet]. 2011;48:32–40.

Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0300985810387447>

17. Torres-cabala CA, Wang W, Trent J, Yang D, Chen S, Kim KB, et al. NIH Public Access. 2014;22:1446–56.
18. Kiupel M, Webster JD, Kaneene JB, Miller R, Yuzbasiyan-Gurkan V. The Use of KIT and Tryptase Expression Patterns as Prognostic Tools for Canine Cutaneous Mast Cell Tumors. *Vet. Pathol.* [Internet]. 2004;41:371–7. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1354/vp.41-4-371>
19. Went PT, Dirnhofer S, Bundi M, Mirlacher M, Schraml P, Mangialaio S, et al. Prevalence of KIT expression in human tumors. *J. Clin. Oncol.* 2004;22:4514–22.
20. Rivera RS, Nagatsuka H, Gunduz M, Cengiz B, Gunduz E, Siar CH, et al. C-kit protein expression correlated with activating mutations in KIT gene in oral mucosal melanoma. *Virchows Arch.* 2008;452:27–32.
21. Satzger I, Schaefer T, Kuettler U, Broecker V, Voelker B, Ostertag H, et al. Analysis of c-KIT expression and KIT gene mutation in human mucosal melanomas. *Br. J. Cancer.* 2008;99:2065–9.
22. Takanosu M, Amano S, Kagawa Y. Analysis of c-KIT exon 11 mutations in canine gastrointestinal stromal tumours. *Vet. J.* [Internet]. Elsevier Ltd; 2016;207:118–23. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2015.10.051>
23. Webster JD, Kiupel M, Yuzbasiyan-Gurkan V. Evaluation of the kinase domain of c-KIT in canine cutaneous mast cell tumors. *BMC Cancer.* 2006;6:85.
24. Murakami A, Mori T, Sakai H, Murakami M, Yanai T, Hoshino Y, et al. Analysis of KIT expression and KIT exon 11 mutations in canine oral malignant melanomas. *Vet. Comp. Oncol.* 2011;9:219–24.
25. Gomes J, Queiroga FL, Prada J, Pires I. Study of c-kit immunoexpression in canine cutaneous melanocytic tumors. *Melanoma Res.* [Internet]. 2012;22:195–201. Available from:

<http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00008390-201206000-00003>

26. Saleem M, Babaei A, Press D. Receptor tyrosine kinase (c-Kit) inhibitors : a potential therapeutic target in cancer cells. 2016;2443–59.
27. Boissan M, Feger F, Guillosson JJ, Arock M. c-Kit and c-kit mutations in mastocytosis and other hematological diseases. *J. Leukoc. Biol.* 2000;67:135–48.
28. Yasuda A, Sawai H, Takahashi H, Ochi N, Matsuo Y, Funahashi H, et al. The stem cell factor/c-kit receptor pathway enhances proliferation and invasion of pancreatic cancer cells. *Mol. Cancer* [Internet]. 2006;5:46. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17044945>
29. Lennartsson J, Ronnstrand L. Stem Cell Factor Receptor/c-Kit: From Basic Science to Clinical Implications. *Physiol. Rev.* [Internet]. 2012;92:1619–49. Available from: <http://physrev.physiology.org/cgi/doi/10.1152/physrev.00046.2011>
30. Théou N, Tabone S, Saffroy R, Le Cesne A, Julié C, Cortez A, et al. High expression of both mutant and wild-type alleles of c-kit in gastrointestinal stromal tumors. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 2004;1688:250–6.
31. Phung B, Steingrímsson E, Rönstrand L. C-Kit isoforms predict melanoma drug sensitivity. *Mol. Cell. Biol.* 2013;73.
32. Chen Y-C, Liao J-W, Hsu W-L, Chang S-C. Identification of the two KIT isoforms and their expression status in canine hemangiosarcomas. *BMC Vet. Res.* [Internet]. *BMC Veterinary Research*; 2016;12:142. Available from: <http://bmcvetres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12917-016-0772-y>
33. Chu PY, Pan SL, Liu CH, Lee J, Yeh LS, Liao AT. KIT gene exon 11 mutations in canine malignant melanoma. *Vet. J.* [Internet]. Elsevier Ltd; 2013;196:226–30. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2012.09.005>

FIGURES

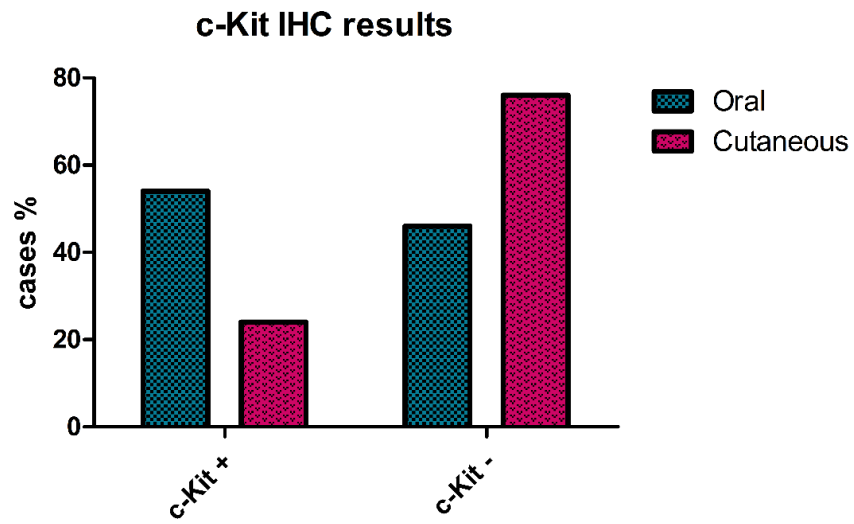


Figure 1. Number of positive (weak, moderate or strong staining) and negative (absence staining) cases, oral and cutaneous, under IHC for c-Kit.

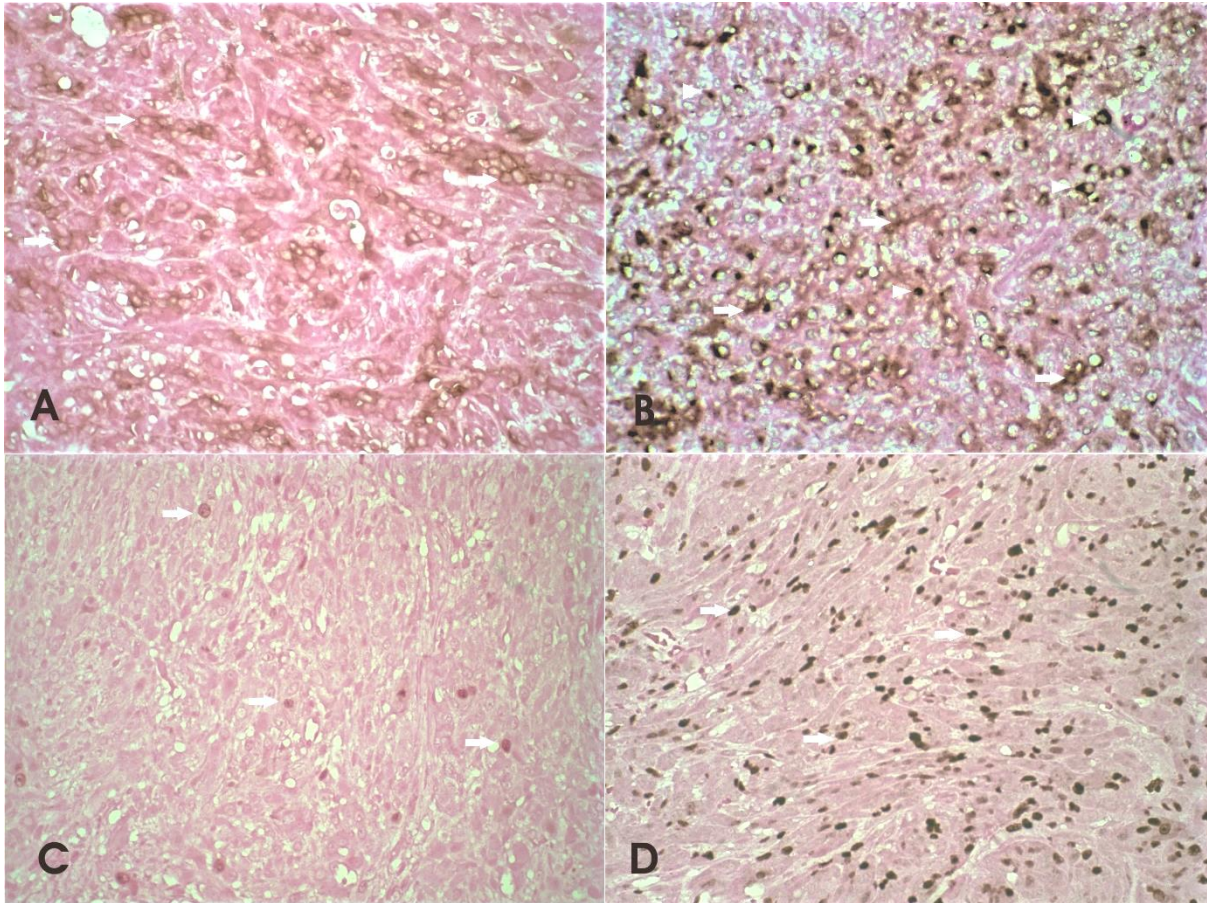


Figure 2. Photomicrographs of canine melanoma tissue, stained for c-Kit (A and B) and Ki-67 (C and D) proteins under IHC assay. Amplification of 40x **A.** Arrows: strong c-Kit staining, showing KIT pattern I (membrane-associated staining). **B.** Arrowheads: strong focal cytoplasmic staining, KIT pattern II. Arrows: Strong diffuse cytoplasmic staining, KIT pattern III. **C.** Low-proliferation melanoma tissue. Arrows: cytoplasmic staining for Ki-67 under IHC assay. **D.** High-proliferation melanoma tissue. Arrows: nuclear staining for Ki-67 under IHC assay.

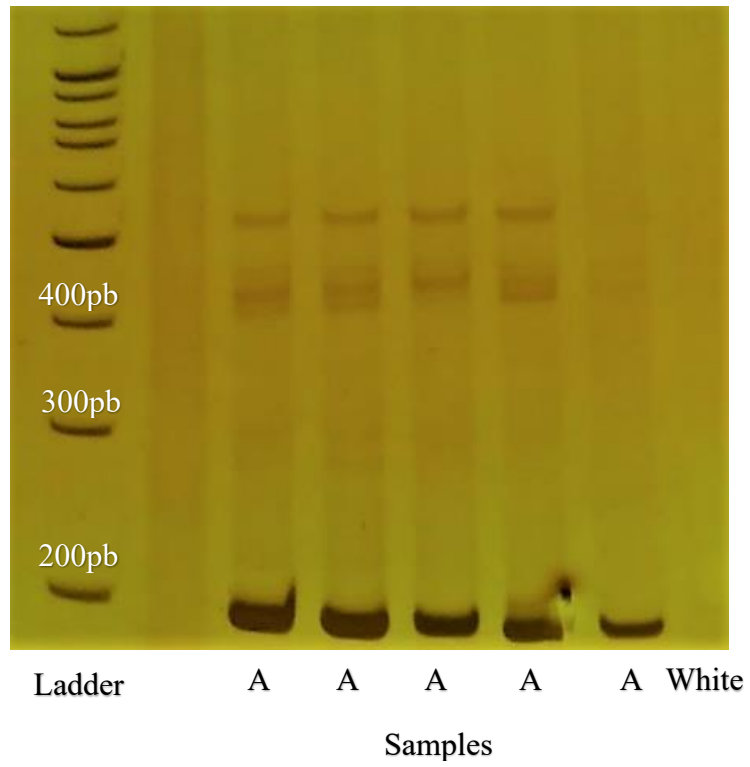


Figure 3. c-Kit samples after PCR for exon 11 and revelation in 10% polyacrylamide gel amplifying around 190bp (c-Kit wild-type).

9. CONCLUSÕES

- Cerca de 35% dos melanomas caninos expressam c-Kit por meio da técnica de imuno-histoquímica;
- É observada uma maior ocorrência de expressão de c-kit em melanomas orais, em relação à melanomas cutâneos;
- Em melanomas cutâneos, um maior índice de proliferação celular, evidenciado pela Ki-67, está diretamente correlacionada com uma marcação imuno-histoquímica para c-Kit forte, citoplasmática e em um maior número de células neoplásicas;
- Não são observadas relações entre a expressão de c-Kit e características histomorfológicas compatíveis com comportamento agressivo (presença de êmbolo, atividade juncional ou desmoplasia).
- Melanomas caninos orais e cutâneos não apresentam mutação *KIT* do tipo *ITD* no éxon 11.

10. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Após a análise dos resultados é possível concluir que, apesar da ausência de mutações *ITD* no éxon 11, os melanomas caninos cutâneos e orais expressam c-Kit, sendo que a expressão oral é superior a cutânea. Além disso, a c-Kit aparenta possuir um papel relacionado com a proliferação celular em melanomas caninos cutâneos, fato evidenciado pela imuno-histoquímica para Ki-67 quando comparado com a intensidade, padrão *KIT* e número de células neoplásicas marcadas para c-Kit. Assim, investigações futuras para uma maior compreensão do mecanismo exercido pela c-Kit nessa neoplasia são necessárias, incluindo a distinção entre as diferentes isoformas da c-Kit dentre os diferentes tipos de melanoma, além de análises mutacionais que visam a identificação de polimorfismos genéticos além das *ITD* no éxon 11.

Dessa maneira, o estudo de mutação em outros éxon além do 11, como o 13 e o 17, são necessários para uma maior compreensão da c-Kit em melanomas. Dentro do aspecto terapêutico, é possível que a identificação de mutações auxilie no desenvolvimento de terapias-alvo, contribuindo assim com o aumento da sobrevida nesses casos de melanoma. Além disso, alguns estudos sugerem que a marcação imuno-histoquímica para c-Kit pode auxiliar na identificação de tumores mais agressivos e com alta probabilidade de se desenvolver metástases. Portanto, estudos direcionados à expressão de c-Kit em melanomas metastáticos também carecem de maior atenção.

11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA DISSERTAÇÃO

ALEXEEV, Vitali; YOON, Kyonggeun. Distinctive role of the cKit receptor tyrosine kinase signaling in mammalian melanocytes. *Journal of Investigative Dermatology*, v. 126, n. 5, p. 1102–1110, 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/sj.jid.5700125>>.

ALI, Z.; YOUSAF, N.; LARKIN, J. Melanoma epidemiology, biology and prognosis. *European Journal of Cancer, Supplement*, v. 11, n. 2, p. 81–91, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejcsup.2013.07.012>>.

ANTONIO, Jorge *et al.* A proteína p16 e o melanoma cutâneo. v. 54, n. 1, p. 81–91, 2010.

ATHERTON, Matthew J. *et al.* Cancer immunology and canine malignant melanoma: A comparative review. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 169, p. 15–26, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetimm.2015.11.003>>.

BAKOS, Lúcio. Melanoma cutâneo: Estudos de base populacional no Brasil. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v. 81, n. 5, p. 402, 2006.

BAR-ELI, Menashe. Gene regulation in melanoma progression by the AP-2 transcription factor. *Pigment Cell Research*, v. 14, n. 2, p. 78–85, 2001.

BEDROSIAN, I *et al.* Incidence of sentinel node metastasis in patients with thin primary melanoma (< or = 1 mm) with vertical growth phase. *Annals of Surgery Oncology*, p. 262–7, 2000.

BERGMAN, Philip J. Canine Oral Melanoma. *Clinical Techniques in Small Animal Practice*, v. 22, n. 2, p. 55–60, 2007.

BOISSAN, M *et al.* c-Kit and c-kit mutations in mastocytosis and other hematological diseases. *Journal of leukocyte biology*, v. 67, n. February, p. 135–148, 2000.

BONGIOVANNI, Laura *et al.* Canine cutaneous melanocytic tumours: Significance of β -catenin and survivin immunohistochemical expression. *Veterinary Dermatology*, v. 26, n. 4, 2015.

BROWN, D. C.; GATTER, K. C. Ki67 protein: The immaculate deception? *Histopathology*, v. 40, n. 1, p. 2–11, 2002.

CAMARGO, Luciane Pires De; CONCEIÇÃO, Lissandro Gonçalves; COSTA, Paulo Renato Dos Santos. Neoplasias melanocíticas cutâneas em cães: estudo retrospectivo de 68 casos (1996-2004). *Braz. j. vet. res. anim. sci.*, v. 45, n. 2, p. 138–152, 2008. Disponível em: <<http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?IsisScript=iah/iah.xis&src=google&base=LILACS&lang=p&nextAction=lnk&exprSearch=487424&indexSearch=ID>>.

CARLSON, J. Andrew *et al.* Molecular diagnostics in melanoma. *Journal of the American Academy of Dermatology*, v. 52, n. 5, p. 743–775, 2005.

CARVAJAL, Richard D *et al.* KIT as a Therapeutic Target in Metastatic Melanoma Richard. *Jama*, v. 305, n. 22, p. 2327–2334, 2011.

CARVALHO, Charles André *et al.* Melanoma hereditário: Prevalência de fatores de risco em um grupo de pacientes no Sul do Brasil. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v. 79, n. 1, p. 53–60, 2004.

CHAN, Eunice Ching *et al.* KIT GNNK splice variants: Expression in systemic mastocytosis and influence on the activating potential of the D816V mutation in mast cells. *Exp Hematol*, 2013.

CHEN, Yi-Chen *et al.* Identification of the two KIT isoforms and their expression status in canine hemangiosarcomas. *BMC Veterinary Research*, v. 12, n. 1, p. 142, 2016. Disponível em: <<http://bmcvetres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12917-016-0772-y>>.

CHI, H. I *et al.* Epithelioid cell melanomas have greater DNA ploidy abnormalities than spindle cell melanomas : cytological evidence for a higher malignant potential of the former. v. 15, p. 410–414, 1993.

CHIARUTTINI, Giulia *et al.* B cells and the humoral response in melanoma: The overlooked players of the tumor microenvironment. *OncImmunity*, v. 6, n. 4, p. 1–11, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/2162402X.2017.1294296>>.

CHU, Pei Yi *et al.* KIT gene exon 11 mutations in canine malignant melanoma. *Veterinary Journal*, v. 196, n. 2, p. 226–230, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2012.09.005>>.

CLAESON, Magdalena. *Epidemiology of cutaneous malignant melanoma*. [S.l.: s.n.], 2016. v. 3.

CORLESS, Christopher L. *et al.* KIT mutations are common in incidental gastrointestinal stromal tumors one centimeter or less in size. *American Journal of Pathology*, v. 160, n. 5, p. 1567–1572, 2002.

DE SOUZA, Sonia R.P.; FISCHER, Frida M.; DE SOUZA, José M.P. Bronzeamento e risco de melanoma cutâneo: Revisão da literatura. *Revista de Saude Publica*, v. 38, n. 4, p. 588–598, 2004.

DECASTRO, CM *et al.* The c-kit proto-oncogene receptor is expressed on a subset of human CD3-CD4-CD8- (triple-negative) thymocytes. *Exp Hematol*, p. 1025–33, 1994.

DEMATTEO, R P *et al.* Two hundred gastrointestinal stromal tumors: recurrence patterns and prognostic factors for survival. *Annals of surgery*, v. 231, n. 1, p. 51–8, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10636102>%5Cn<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC1420965>>.

DEMETRI, George D. *et al.* in *Advanced Gastrointestinal Stromal Tumors*. v. 347, n. 7, p. 472–480, 2002.

- DIMATOS, Dimitri Cardoso *et al.* Melanoma Cutâneo No Brasil Skin Melanoma in Brazil. *Arquivos Catarinenses de Medicina*, v. 38, 2009.
- EKEDAHL, H. *et al.* The clinical significance of BRAF and NRAS mutations in a clinic-based metastatic melanoma cohort. *British Journal of Dermatology*, v. 169, n. 5, p. 1049–1055, 2013.
- GIMOTTY, Phyllis A. *et al.* Biologic and prognostic significance of dermal Ki67 expression, mitoses, and tumorigenicity in thin invasive cutaneous melanoma. *Journal of Clinical Oncology*, v. 23, n. 31, p. 8048–8056, 2005.
- GOLDINGER, Simone M. *et al.* Targeted therapy in melanoma - the role of BRAF, RAS and KIT mutations. *European Journal of Cancer, Supplement*, v. 11, n. 2, p. 92–96, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejcsup.2013.07.011>>.
- GOLDSTEIN, Alisa M; TUCKER, Margaret A. Dysplastic Nevi and Melanoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers*, p. 528–532, 2013.
- GOMES, Joana *et al.* Study of c-kit immunoexpression in canine cutaneous melanocytic tumors. *Melanoma Research*, v. 22, n. 3, p. 195–201, 2012. Disponível em: <<http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00008390-201206000-00003>>.
- GREEN, T.L.; GREENSPAN, Deborah; HANSEN, Louis S. Oral melanoma: report of case. *The Journal of the American Dental Association*, v. 113, n. 4, p. 627–629, 1986. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002817786340169>>.
- GRICHNIK, James M. Kit and melanocyte migration. *Journal of Investigative Dermatology*, v. 126, n. 5, p. 945–947, 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/sj.jid.5700164>>.
- HODIS, Eran *et al.* NIH Public Access. v. 150, n. 2, p. 251–263, 2013.
- JACOBS, Joannes F M *et al.* Regulatory T cells in melanoma: The final hurdle towards effective immunotherapy? *The Lancet Oncology*, v. 13, n. 1, p. 32–42, 2012.
- JONES, Cameron L. R. *et al.* Detection of c-kit mutations in canine mast cell tumors using fluorescent polyacrylamide gel electrophoresis. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 16, n. 2, p. 95–100, 2004. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15053358>.
- KAI-YUAN HSIAO, Ken-Chung Chen and Tze-Ta Huang. Oral Mucosa Malignant Melanoma: Clinical Features, Diagnosis, Treatment, and a Case Report. *Journal of Dental Problems and Solutions*, v. 2, n. 2, p. 6, 2015. Disponível em: <<http://www.peertechz.com/Dental-Problems-Solutions/JDPS-2-111.php>>.
- KING, Roy. Lentiginous melanoma. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*, v. 135, n. 3, p. 337–341, 2011.

KIUPEL, M. *et al.* The Use of KIT and Tryptase Expression Patterns as Prognostic Tools for Canine Cutaneous Mast Cell Tumors. *Veterinary Pathology*, v. 41, n. 4, p. 371–377, 2004. Disponível em: <<http://journals.sagepub.com/doi/10.1354/vp.41-4-371>>.

KONG, Yan *et al.* Large-scale analysis of KIT aberrations in Chinese patients with melanoma. *Clinical Cancer Research*, v. 17, n. 7, p. 1684–1691, 2011.

LADÁNYI, Andrea *et al.* Density of DC-LAMP+ mature dendritic cells in combination with activated T lymphocytes infiltrating primary cutaneous melanoma is a strong independent prognostic factor. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, v. 56, n. 9, p. 1459–1469, 2007.

LENNARTSSON, J.; RONNSTRAND, L. Stem Cell Factor Receptor/c-Kit: From Basic Science to Clinical Implications. *Physiological Reviews*, v. 92, n. 4, p. 1619–1649, 2012. Disponível em: <<http://physrev.physiology.org/cgi/doi/10.1152/physrev.00046.2011>>.

LETARD, S. *et al.* Gain-of-Function Mutations in the Extracellular Domain of KIT Are Common in Canine Mast Cell Tumors. *Molecular Cancer Research*, v. 6, n. 7, p. 1137–1145, 2008. Disponível em: <<http://mcr.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/1541-7786.MCR-08-0067>>.

LIN, Shee-Chan *et al.* Clinical implications of C-kit gene mutation in patients with large gastrointestinal stromal tumors. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 2006.

LINDOR, Noralane M. *et al.* *Concise handbook of familial cancer susceptibility syndromes: Second edition*. [S.l: s.n.], 2008. v. 2008.

MARTÍ, R. M.; SOROLLA, A.; YERAMIAN, A. Nuevas dianas terapéuticas en el melanoma. *Actas Dermo-Sifiliográficas*, v. 103, n. 7, 2012.

MATTEI, M. G. MATTEI, M. G., et al., Assignment of the human C-KIT proto-oncogene to the q11-q12 region of chromosome 4, using in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet*, 1987.

MEDICINE, Veterinary. REVIEW ARTICLE A Comparative Review of Melanocytic Neoplasms. v. 678, n. 2002, p. 651–678, 2016.

MEHNERT, Janice M; KLUGER, Harriet M. HHS Public Access. v. 14, n. 5, p. 449–457, 2015.

MENDES, G L Q; KOIFMAN, S. Melanoma Cutâneo Invasivo: Mortalidade no Brasil e Sobrevida Hospitalar em Centro de Referência Oncológica no Rio de Janeiro. *Escola Nacional de Saúde Pública*, v. MSc, p. 78, 2010.

MILLER, Arlo J.; JR, Martin C. Mihm. Review article. *Quality*, v. 17, n. 2, p. 121–130, 2006.

MONTERO, Juan Carlos *et al.* Expression of c-Kit isoforms in multiple myeloma: Differences in signaling and drug sensitivity. *Haematologica*, v. 93, n. 6, p. 851–859, 2008.

MORT, R. L.; JACKSON, I. J.; PATTON, E. E. The melanocyte lineage in development and

disease. *Development*, v. 142, n. 7, p. 1387–1387, 2015. Disponível em: <<http://dev.biologists.org/cgi/doi/10.1242/dev.123729>>.

MURAKAMI, A. *et al.* Analysis of KIT expression and KIT exon 11 mutations in canine oral malignant melanomas. *Veterinary and Comparative Oncology*, v. 9, n. 3, p. 219–224, 2011.

NADER MARTA, Gustavo *et al.* Melanoma de mucosa oral. *Revista Brasileira de Cancerologia*, v. 53, n. 1, p. 35–39, 2007.

NEWMAN, Shelley J. *et al.* C-kit Expression in Canine Mucosal Melanomas. *Veterinary Pathology*, v. 49, n. 5, p. 760–765, 2012.

NISHIYA, Adriana *et al.* Comparative Aspects of Canine Melanoma. *Veterinary Sciences*, v. 3, n. 1, p. 7, 2016. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/2306-7381/3/1/7>>.

OZAKI, Toshinori; NAKAGAWARA, Akira. Role of p53 in cell death and human cancers. *Cancers*, v. 3, n. 1, p. 994–1013, 2011.

PADHYE, Ashvini; D'SOUZA, Jovita. Oral malignant melanoma: A silent killer? *Journal of Indian Society of Periodontology*, v. 15, n. 4, p. 425–8, 2011. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3283947&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

PASCHOAL, Franciso Macedo *et al.* Desmoplastic melanoma Melanoma desmoplástico. v. 4, n. February, p. 59–63, 2012.

PHUNG, Bengt; STEINGRÍMSSON, E; RÖNNSTRAND, L. C-Kit isoforms predict melanoma drug sensitivity. *Molecular and Cellular Biology*, v. 73, n. 8, 2013.

RAPIDIS, Alexander D. *et al.* Primary malignant melanoma of the oral mucosa. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, v. 61, n. 10, p. 1132–1139, 2003.

RASTRELLI, M *et al.* Melanoma: epidemiology, risk factors, pathogenesis, diagnosis and classification. *In Vivo*, v. 28, n. 6, p. 1005–1011, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25398793>>.

RIVERA, Rosario S. *et al.* C-kit protein expression correlated with activating mutations in KIT gene in oral mucosal melanoma. *Virchows Archiv*, v. 452, n. 1, p. 27–32, 2008.

RO, Y S *et al.* P53 Protein Expression in Benign and Malignant Skin Tumours. *The British journal of dermatology*, v. 128, n. 3, p. 237–241, 1993.

SAINI, Masum *et al.* Expression of proto-oncogene KIT is up-regulated in subset of human meningiomas. *BMC cancer*, v. 12, n. 1, p. 212, 2012. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3443037&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

SALEEM, Mohammad; BABAEI, Abbaspour; PRESS, Dove. Receptor tyrosine kinase (c-Kit) inhibitors : a potential therapeutic target in cancer cells. p. 2443–2459, 2016.

- SARI ASLANI, Fatemeh; GERAMIZADEH, Bitá; DEHGHANIAN, Amir Reza. Comparison of c-Kit expression between primary and metastatic melanoma of skin and mucosa. *Medical Journal of the Islamic Republic of Iran*, v. 29, 2015.
- SATYAMOORTHY, K.; HERLYN, M. Cellular and molecular biology of human melanoma. *Cancer Biology and Therapy*, v. 1, n. 1, p. 14–17, 2002.
- SATZGER, I. *et al.* Analysis of c-KIT expression and KIT gene mutation in human mucosal melanomas. *British Journal of Cancer*, v. 99, n. 12, p. 2065–2069, 2008.
- SEBOLT-LEOPOLD, Judith S.; ENGLISH, Jessie M. Mechanisms of drug inhibition of signalling molecules. *Nature*, v. 441, n. 7092, p. 457–462, 2006.
- SLOMINSKI, Radomir M.; ZMIJEWSKI, Michal A.; SLOMINSKI, Andrzej T. The role of melanin pigment in melanoma. *Experimental Dermatology*, v. 24, n. 4, p. 258–259, 2015.
- SMEDLEY, R. C. *et al.* Immunohistochemical Diagnosis of Canine Oral Amelanotic Melanocytic Neoplasms. *Veterinary Pathology*, v. 48, n. 1, p. 32–40, 2011. Disponível em: <<http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0300985810387447>>.
- TAKANOSU, M.; AMANO, S.; KAGAWA, Y. Analysis of c-KIT exon 11 mutations in canine gastrointestinal stromal tumours. *Veterinary Journal*, v. 207, p. 118–123, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2015.10.051>>.
- TEIXEIRA, Tarso Felipe *et al.* c-Kit immunoexpression patterns differ in melanotic and amelanotic canine oral melanomas. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v. 52, n. 4, p. 333, 2015. Disponível em: <<http://www.revistas.usp.br/bjvras/article/view/82788>>.
- TETSU, Osamu *et al.* Mutations in the c-Kit gene disrupt mitogen-activated protein kinase signaling during tumor development in adenoid cystic carcinoma of the salivary glands. *Neoplasia (New York, N.Y.)*, v. 12, n. 9, p. 708–17, 2010. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2933691&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.
- THÉOU, Nathalie *et al.* High expression of both mutant and wild-type alleles of c-kit in gastrointestinal stromal tumors. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, v. 1688, n. 3, p. 250–256, 2004.
- THOMPSON, J. J. *et al.* Receptor Tyrosine Kinase Expression Profiles in Canine Cutaneous and Subcutaneous Mast Cell Tumors. *Veterinary Pathology*, v. 53, n. 3, p. 545–558, 2016. Disponível em: <<http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0300985815610388>>.
- TÍMÁR, Jozsef. Cancer genomics: Molecular classification, prognosis and response prediction. *Cancer Genomics: Molecular Classification, Prognosis and Response Prediction*. [S.l.: s.n.], 2013. v. 9789400758. p. 1–588.
- TORRES-CABALA, Carlos A *et al.* NIH Public Access. v. 22, n. 85, p. 1446–1456, 2014.
- TSAO, Hensin *et al.* Melanoma: From mutations to medicine. *Genes and Development*, v. 26,

n. 11, p. 1131–1155, 2012.

URATANI, Aline Mie; VARGAS, Pablo Agustin; JORGE, Jacks. Oral melanoma : review of the literature. v. 3, n. 9, p. 428–432, 2004.

VAZQUEZ, Vinicius de Lima *et al.* Melanoma characteristics in Brazil: demographics, treatment, and survival analysis. *BMC research notes*, v. 8, p. 4, 2015.

WAINSTEIN, Alberto J. A.; BELFORT, Francisco A. Conduta para o melanoma cutâneo. *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões*, v. 31, n. 3, p. 204–214, 2004. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-69912004000300011&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>.

WEBSTER, Joshua D; KIUPEL, Matti; YUZBASIYAN-GURKAN, Vilma. Evaluation of the kinase domain of c-KIT in canine cutaneous mast cell tumors. *BMC cancer*, v. 6, n. Figure 1, p. 85, 2006.

WEINSTEIN, David *et al.* Diagnostic and prognostic biomarkers in melanoma. *The Journal of clinical and aesthetic dermatology*, v. 7, n. 6, p. 13–24, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25013535%5Cnhttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4086529>>.

WEISS, J *et al.* Expression of p53 protein in malignant melanoma: clinicopathological and prognostic implications. *The British journal of dermatology*, v. 133, n. 1, p. 23–31, 1995.

WEISSINGER, Stephanie E. *et al.* A diagnostic algorithm to distinguish desmoplastic from spindle cell melanoma. *Modern Pathology*, v. 27, n. 4, p. 524–534, 2014.

WENT, Philip Th *et al.* Prevalence of KIT expression in human tumors. *Journal of Clinical Oncology*, v. 22, n. 22, p. 4514–4522, 2004.


WILLMORE, Carlynn *et al.* Detection of c-kit – Activating Mutations in Gastrointestinal Stromal Tumors by High-Resolution Amplicon Melting Analysis. p. 206–216, 2004.

YASUDA, Akira *et al.* The stem cell factor/c-kit receptor pathway enhances proliferation and invasion of pancreatic cancer cells. *Molecular cancer*, v. 5, p. 46, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17044945>>.

ZHANG, Dandan *et al.* Frequent KIT Mutations in Human. p. 1–9, 2014.

ANEXOS

ANEXO A. Certificado do Comitê de Ética em Experimentação Animal – CETEA

 <p>UFMG</p>	<p>UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS</p> <p>CEUA</p> <p>COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS</p>
<p>CERTIFICADO Certificamos que o Protocolo nº. 8 / 2016, relativo ao projeto intitulado “EXPRESSAO GENICA E PROTEICA DE MARCADORES PROGNOSTICOS NOS MELANOMAS CANINOS CUTANEOS E ORAL”, que tem como responsável Enio Ferreira, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 22/03/2016. Este certificado expira-se em 22/03/2021.</p>	
<p>CERTIFICATE We hereby certify that the Protocol nº. 8 / 2016, related to the Project entitled “GENE AND PROTEIN EXPRESSION OF PROGNOSTIC MARKERS IN SKIN AND ORAL CANINE MELANOMAS”, under the supervision of Enio Ferreira, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 22/03/2016. This certificates expires in 22/03/2021.</p>	
<p>Cleuza Maria de Faria Rezende Coordenador (a) da CEUA/UFMG Belo Horizonte, 22/03/2016.</p>	
<p>Atenciosamente.</p>	
<p>Sistema CEUA-UFMG https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/</p>	<p>Universidade Federal de Minas Gerais Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005 31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592 www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br</p>