



UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

NEOPLASIAS DE ORIGEM MELANOCÍTICA DA ÚVEA DO CÃO E DO GATO:  
ESTUDO COMPARATIVO DAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E  
IMUNOHISTOQUÍMICAS POR IMUNOMARCAÇÃO PARA KI-67, MELAN-A E CD117

JOÃO FRANCISCO XAVIER DA SILVA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI:

Doutor Mário António Pereira da Silva  
Soares de Pinho

Doutor Jorge Manuel Jesus Correia

Doutora Esmeralda Sofia da Costa  
Delgado

ORIENTADORA:

Doutora Esmeralda Sofia da Costa Delgado

CO-ORIENTADOR:

Dr. Hugo Abel Sampaio Monteiro Martins  
Pissarra

2013

LISBOA



UNIVERSIDADE DE LISBOA  
Faculdade de Medicina Veterinária

NEOPLASIAS DE ORIGEM MELANOCÍTICA DA ÚVEA DO CÃO E DO GATO:  
ESTUDO COMPARATIVO DAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E  
IMUNOHISTOQUÍMICAS POR IMUNOMARCAÇÃO PARA KI-67, MELAN-A E CD117

JOÃO FRANCISCO XAVIER DA SILVA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI:

Doutor Mário António Pereira da Silva  
Soares de Pinho

Doutor Jorge Manuel Jesus Correia

Doutora Esmeralda Sofia da Costa  
Delgado

ORIENTADORA:

Doutora Esmeralda Sofia da Costa Delgado

CO-ORIENTADOR:

Dr. Hugo Abel Sampaio Monteiro Martins  
Pissarra

2013

LISBOA

*A Ti, Meu Deus, pelo dom da Vida, pela família, pelos amigos, pelo estudo e trabalho. Por tudo o que sou, te devo a Ti.*

*Ao meu pai, à minha mãe e ao meu irmão...por me ensinarem a amar a família e a ver nela o caminho da felicidade, da interajuda e o “trampolim” para todas as dificuldades.*

*À minha namorada Ana Maria, que está ao meu lado há 8 anos, sempre com um sorriso, paciência e muito amor.*

*A toda a minha família, em especial ao meu avô Zé, que já não estando presente entre nós, me deixou um verdadeiro exemplo de luta e espírito de sacrifício.*

*A todos os meus amigos e em especial a Chiara Lubich e à família da “Obra de Maria”, por serem para mim um verdadeiro testemunho de esperança.*

*A todos dedico este trabalho...*

## AGRADECIMENTOS

Hoje relembro os primeiros momentos em que sonhava ser veterinário. Era um miúdo com seis anos, mas já sabia o que queria fazer na vida. Mesmo se ainda não era conhecedor dos desafios que teria de ultrapassar como o liceu, os exames nacionais, a época de exames de faculdade, a realização de uma tese final de curso que nunca mais chegava e agora a tão temida crise, o desejo manteve-se até ao fim. E valeu a pena! Por isso, creio que é agora o momento adequado para agradecer a todos os que contribuíram para a realização deste sonho que agora começa.

Antes de mais queria agradecer ao meu pai José, à minha mãe Isabel e ao meu irmão Rodrigo por me terem dado uma família onde o amor, o respeito recíproco e a dignificação do trabalho são a premissa para a felicidade do ser humano.

À minha namorada, Ana Maria, que com muito carinho e paciência me acompanha há oito anos na realização dos meus projetos profissionais e pessoais que dão sentido à vida. Obrigado por estares sempre aqui! À sua extraordinária família, que é para mim uma segunda casa, uma segunda família. Obrigado Tia Tima, Tio António, Nuno, Tiago e Zé Maria, por me receberem sempre de braços abertos em Lisboa.

Gostaria de agradecer à minha orientadora, a Professora Doutora Esmeralda Delgado, pela sua amizade e profissionalismo, pela transmissão dos conhecimentos que me deu ao longo da minha formação e estágio na FMV, pela prontidão na ajuda na elaboração desta tese e pela competência e percurso académico em oftalmologia, pelo qual ganhei um grande interesse. Ter estagiado consigo foi, felizmente, não só uma excelente experiência que me formou na área da oftalmologia veterinária, como foi também complementada com uma vasta variedade de conhecimentos clínicos e cirúrgicos.

Ao meu coorientador, o Dr. Hugo Pissarra, que tanto se disponibilizou para me ajudar no percurso académico durante estes seis anos e na realização da presente monografia. Agradeço também a sua amizade e todos os momentos mais descontraídos ou difíceis, mas que fazem parte deste mistério que chamamos vida, e pela qual vale a pena apostar tudo e trabalhar bem.

Ao meu amigo Mário Matos, que com grande amizade e prontidão abriu as portas do seu local de trabalho, a Escola Superior de Tecnologias da Saúde do Instituto Politécnico de Lisboa, local onde leciona e que apesar de ser pai há pouco tempo e ter algumas noites mal dormidas, nunca disse que não a cada pedido que lhe fiz na ajuda na execução dos materiais e métodos do presente estudo.

Gostaria de agradecer à equipa do departamento de anatomia patológica da Escola Superior de Tecnologias da Saúde do Instituto Politécnico de Lisboa, pela disponibilização do tempo e meios para a execução de parte dos materiais e métodos do presente trabalho.

À técnica Sandra Carvalho, que com muita paciência se disponibilizou em ajudar-me na concretização dos materiais e métodos do presente estudo. Obrigado pela amizade, profissionalismo e por ter tido sempre um tempinho para me ajudar.

Obrigado também a toda a equipa do Laboratório de Anatomia Patológica da FMV, por me terem disponibilizado o tempo, os meios e o apoio para a realização deste trabalho.

Agradeço com muita amizade a toda a equipa de médicos, enfermeiros e auxiliares do Hospital Escolar da FMV, todo o excelente apoio, conhecimentos e simpatia prestados na área de clínica e cirurgia de pequenos animais. Obrigado por tornarem o hospital numa casa onde passamos 6 meses da nossa vida bem animados e inesquecíveis.

Agradeço a todos os meus professores e a todos os meus colegas de curso e de estágio, a amizade, as cerca de oito horas diárias e a partilha dos conhecimentos. No fundo, o saber crescer como pessoa e como profissional apesar das diferenças que nos caracterizam enquanto pessoas. A todos o meu obrigado.

À Dra. Daniela Calado, antes de mais agradeço a amizade de vários anos, o profissionalismo, a disponibilidade inesgotável e todas as oportunidades. Obrigado por me ajudar a fazer crescer, com a sua espontaneidade e dedicação à profissão, o gosto pela clínica em animais de companhia.

Aos meus primos Rosário, Pedro, Inês, Margarida, Tia Lurdes e Tio Zé Maria, agradeço o amor com que me receberam em Lisboa durante estes seis belos anos.

Por fim, mas não por último, agradeço a toda a minha restante família, em especial aos meus avós Maria, José, Teresa e António, aos meus amigos veterinários e não veterinários e à família da Obra de Maria, pessoas com as quais cresci, que me ensinam a valorizar todos os aspetos da minha vida e a ser melhor e maior.

## **Neoplasias de Origem Melanocítica da Úvea do Cão e do Gato: Estudo Comparativo das Características Clínicas e Imunohistoquímicas por Imunomarcação para Ki-67, Melan-A e CD117**

### **Resumo**

Apresenta-se um estudo sobre as características epidemiológicas, clínicas e imunohistoquímicas de neoplasias de origem melanocítica da úvea do cão e do gato.

Este estudo pretendeu contribuir para o conhecimento das características clínicas e imunohistoquímicas dos tumores em questão, auxiliando no seu diagnóstico e terapêutica.

Estudaram-se vinte casos de tumores melanocíticos oculares, dez provenientes de cães e dez de gatos, ocorridos no período compreendido entre 2001-2012. Realizaram-se estudos de imunohistoquímica recorrendo aos marcadores Ki-67, Melan-A e CD117. Foram analisados estatisticamente os parâmetros sexo, raça e idade dos animais, sinais clínicos, técnica cirúrgica, diagnóstico histológico e resultados imunohistoquímicos. O estudo estatístico foi efetuado com o programa *Excel 2007 (Microsoft Office®)*.

Nos gatos, 80% (n=8) da amostra era constituída por fêmeas e 20% por machos. O melanoma difuso da íris do gato foi o único tipo de tumor uveal diagnosticado histologicamente na totalidade da amostra de gatos (n=10). Sete dos dez melanomas difusos da íris do gato (70%) tiveram marcação imunohistoquímica positiva para o Melan-A. Apenas dois casos apresentaram um valor do índice de proliferação superior a 19,5, na marcação do Ki-67. Cinco dos dez casos de melanoma difuso da íris do gato (50%) tiveram marcação imunohistoquímica positiva para o CD117.

Nos cães, 60% (n=6) dos cães afetados eram fêmeas e 40% (n=4) eram machos. Verificou-se que 60% dos casos (n=6) apresentaram diagnóstico de melanoma da úvea, 10% (n=1) de melanocitoma da coróide, 10% (n=1) de melanoma do limbo esclero-corneano e 20% (n=2) de melanocitoma da úvea anterior. Dos dez casos de tumores melanocíticos caninos submetidos a imunomarcação, todos (100%) apresentaram marcação positiva para o Melan-A, Ki-67 e CD117.

Em conclusão, os resultados obtidos com a técnica de imunohistoquímica com marcação para o Melan-A, Ki-67 e CD117 foram diferentes nos dois grupos em estudo. O uso destas técnicas apresentou resultados promissores na confirmação do diagnóstico histopatológico e caracterização dos tumores uveais melanocíticos do cão e do gato.

**Palavras-chave:** neoplasias, imunohistoquímicas, cães, gatos, úvea.

## **Uveal Melanocytic Neoplasms of Dogs and Cats: A Comparative Study of Clinical and Immunohistochemical Features by Immunostaining for Ki-67, Melan-A and CD117**

### **Abstract**

The present dissertation is a study of the epidemiological, clinical and immunohistochemical features of uveal melanocytic tumors of the dog and cat. This study aims to contribute to the knowledge of clinical and immunohistochemical features of these tumors, in order to help establishing a diagnosis and therapy. Twenty clinical cases of ocular melanocytic tumors were studied (ten dogs and ten cats), which occurred between 2001 and 2012. Immunohistochemical studies were performed using the immunohistochemical markers Ki-67, Melan-A and CD117. Parameters like sex, age, breed, clinical signs, surgical techniques, histological diagnosis and immunohistochemical results were statistically analyzed. Statistical analysis was performed using *Excel 2007 (Microsoft® Office)*.

Regarding feline patients, 80 % (n=8) of the sample were females and 20% were males. Diffuse iris melanoma was the only type of tumor histologically diagnosed in the whole sample (n=10). Seven of the ten diffuse iris melanomas (70%) had positive immunohistochemical staining for Melan-A. Only two cases had a proliferation index greater than 19.5 when staining for Ki-67. Five of the ten cases of feline diffuse iris melanoma (50%) had positive immunohistochemical staining for CD117. On what concerns dogs, 60% (n=6) of the sample were females and 40% (n=4) were males. Uveal melanoma was diagnosed in 60% of the cases (n=6), 10% (n=1) of the cases were diagnosed as a melanocytoma of the choroid, 10% (n=1) as a corneal-scleral limbal melanoma and 20% (n =2) as anterior uvea melanocytoma. All the cases of canine melanocytic tumors submitted to immunostaining for Melan-A, Ki-67 and CD117 showed positive staining.

In conclusion, immunohistochemical labeling for Melan-A, Ki-67 and CD117 yielded different immunostaining results for the two groups. These results seem to be promising for the confirmation of the histopathologic diagnosis and further characterization of uveal melanocytic tumors in dogs and cats.

**Keywords:** tumors, immunohistochemical, dogs, cats, uvea

### **Comunicações científicas**

Os resultados parciais do presente estudo foram apresentados no Congresso da Sociedade Europeia de Oftalmologia Veterinária (ESVO), sob a forma de comunicação em painel, realizada em Bucareste, Roménia, entre os dias 17 a 20 de Outubro de 2013.

- Esmeralda Delgado, João X. Silva, Hugo Pissarra e Maria C. Peleteiro, «PROSTATIC METASTASIS OF A CANINE MALIGNANT UVEAL MELANOMA».

O correspondente resumo será publicado na versão on-line da revista internacional *Veterinary Ophthalmology*.

## Índice Geral

Índice de figuras .....	x
Índice de tabelas .....	xi
Índice de anexos .....	xii
Lista de Abreviaturas e Símbolos .....	xiii
Introdução.....	1
I - Atividades desenvolvidas durante o estágio .....	3
II - Neoplasias oculares em cães e gatos .....	6
1. Epidemiologia das neoplasias oculares em cães e gatos .....	7
2. Tumores oculares de origem melanocítica – enquadramento geral.....	11
3. Patogénese do melanoma.....	12
4. Sinais clínicos.....	13
5. Tumores oculares de origem melanocítica no cão.....	15
5.1. Melanocitoma da úvea anterior no cão .....	15
5.1.1. Comportamento clínico e localização.....	15
5.1.2. Características histopatológicas.....	16
5.2. Melanocitoma do limbo esclero-corneano.....	17
5.3. Melanocitoma da úvea posterior (coróide) do cão.....	18
5.4. Melanose difusa da úvea do cão .....	18
5.5. Melanoma da úvea no cão.....	19
5.5.1. Comportamento clínico e localização.....	19
5.5.2. Características histopatológicas.....	21
5.6. Tratamento do melanocitoma e do melanoma uveal canino.....	21
5.7. Prognóstico do melanocitoma e do melanoma uveal canino .....	22
5.8. Melanoma da úvea posterior (coróide) no cão.....	22
6. Tumores oculares de origem melanocítica no gato .....	23
6.1. Melanocitoma da úvea do gato .....	23
6.2. Melanoma difuso da úvea do gato .....	23
6.2.1. Comportamento clínico e localização.....	23
6.2.2. Etiologia.....	27
6.2.3. Características histopatológicas.....	28
6.2.4. Tratamento.....	28

6.3. Melanoma Atípico Felino (melanocitoma multifocal da úvea do gato) .....	29
6.4. Outras apresentações do melanoma da úvea felino .....	29
7. Marcadores de prognóstico.....	30
7.1. Metastização .....	30
7.2. Localização anatómica.....	30
8. Técnicas de diagnóstico.....	31
8.1. Exame oftálmico .....	31
8.1.1. Tonometria.....	31
8.1.2. Biomicroscopia .....	31
8.1.3. Gonioscopia .....	32
8.1.4. Ecografia ocular .....	32
8.1.5. Fotografia.....	33
8.1.6. PAAF Transvítrea .....	33
8.2. Histopatologia .....	34
8.2.1. Fixação de tecidos seleccionados – Olho.....	34
8.2.2. Histoquímica .....	34
8.3. Imunohistoquímica .....	35
8.3.1. Definição geral.....	35
8.3.2. Aplicações da imunohistoquímica .....	36
8.3.3. Pré-requisitos para a técnica de imunohistoquímica.....	37
9. Marcadores Imunohistoquímicos .....	37
9.1. Ki-67 .....	38
9.2. Melan-A .....	39
9.3. CD-117 (C-kit).....	40
10. Tratamento.....	41
10.1. Imunoterapia – Vacinação .....	41
10.2. Tratamento com AINEs .....	44
10.3. Carboplatina.....	45
10.4. Cisplatina + Piroxicam.....	46
10.5. Inibidores do recetor tirosina quinase - o exemplo do masitinib .....	46
10.6. Tratamentos cirúrgicos.....	48
10.7. Radioterapia .....	48
III - Neoplasias de origem melanocítica da úvea do cão e do gato: Estudo comparativo das características clínicas e imunohistoquímicas por imunomarcção para Ki-67, Melan-A e CD117 .....	49

1. Objetivos .....	49
2. Materiais e métodos .....	50
2.1. Amostra em estudo .....	50
2.1. Parâmetros em análise.....	50
2.2. Processamento das amostras para os estudos de imunohistoquímica .....	51
2.3. Técnica de imunohistoquímica .....	51
2.4. Anticorpos utilizados .....	52
2.5. Controlos positivo e negativo .....	53
2.6. Técnica de coloração imunohistoquímica.....	53
2.7. Avaliação da imunomarcação para Ki-67.....	55
2.8. Avaliação da imunomarcação para Melan-A.....	55
2.9. Avaliação da imunomarcação para CD117.....	55
2.10. Análise estatística.....	55
3. Resultados.....	56
3.1. Avaliação de dados clínicos e epidemiológicos em gatos .....	56
3.1.1. Idade .....	56
3.1.2. Sexo .....	56
3.1.3. Raça .....	56
3.2. Avaliação de dados clínicos e epidemiológicos em cães.....	57
3.2.1. Idade .....	57
3.2.2. Sexo .....	57
3.2.3. Raça .....	57
3.3. Sinais clínicos observados na amostra de gatos e cães .....	58
3.4. Tratamento .....	59
3.5. Diagnóstico histológico .....	59
3.5.1. Composição da amostra da espécie felina .....	59
3.5.2. Composição da amostra da espécie canina .....	60
3.6. Resultados da técnica de imunohistoquímica .....	61
3.6.1. Resultados da imunomarcação para Melan-A .....	61
3.6.2. Resultados da imunomarcação para Ki-67 .....	64
3.6.3. Resultados da imunomarcação para CD117 .....	66
4. Discussão.....	69
4.1. Discussão dos resultados clínicos .....	70

4.1.1. Discussão das características clínicas e epidemiológicas da amostra de gatos e cães.....	70
4.2. Discussão dos resultados da imunohistoquímica.....	72
4.2.1. Discussão dos resultados da imunomarcção para Melan-A.....	72
4.2.2. Discussão dos resultados da imunomarcção para Ki-67.....	73
4.2.3. Discussão dos resultados da imunomarcção para CD117.....	74
4.3. Discussão da terapêutica.....	75
4.4. Limitações do estudo.....	75
5. Conclusões e perspectivas futuras.....	76
IV - Bibliografia.....	78
V – Anexos.....	84

## Índice de figuras

<b>Figura 1</b> – Melanocitoma da úvea anterior no cão .....	16
<b>Figura 2</b> – Melanocitoma do limbo esclero-corneano em cão de raça Caniche .....	17
<b>Figura 3</b> – Melanocitoma do limbo esclero-corneano em cão de raça Rottweiler .....	18
<b>Figura 4</b> – Melanoma intraocular, muito provavelmente da úvea anterior, em cão de raça Schnauzer miniatura, macho, 9 anos de idade.....	20
<b>Figura 5</b> – Melanoma da úvea anterior, cadela de raça Labrador Retriever, 5 anos de idade....	20
<b>Figura 6</b> – Melanoma da úvea anterior em corte transversal do globo ocular, cadela de raça Labrador Retriever, 5 anos de idade.....	20
<b>Figura 7</b> – Melanoma difuso da úvea anterior do gato.....	25
<b>Figura 8</b> – Melanoma difuso da úvea anterior de gato, 7 anos, raça Europeu Comum.....	25
<b>Figura 9</b> – Melanoma difuso da úvea anterior de gato, 7 anos, raça Europeu Comum, estado mais avançado. ....	25
<b>Figura 10</b> – Melanoma difuso da íris em gato persa .....	26
<b>Figura 11</b> – Melanoma difuso da íris em gato persa. Olho esquerdo após enucleação.....	26
<b>Figura 12</b> – Gato persa após enucleação do olho esquerdo.....	26
<b>Figura 13</b> – A, B, C – Padrões de intensidade de marcação do Melan-A em melanomas difusos da íris do gato. ....	62
<b>Figura 14</b> – A, B, C – Padrões de intensidade de marcação do Melan-A em melanomas da úvea do cão.....	63
<b>Figura 15</b> – A: Marcação para o Melan-A de intensidade forte em melanoma da úvea anterior em cão de raça Schnauzer miniatura, 10 anos.....	63
<b>Figura 16</b> – (A, B) Índices de proliferação em imunomarcção para Ki-67 em melanomas difusos da íris de gato.....	64
<b>Figura 17</b> – (A, B) Índices de proliferação em imunomarcção para Ki-67 em melanomas da úvea de cão.....	65
<b>Figura 18</b> – (A, B) Padrões de intensidade de marcação do CD117 em melanomas da úvea do cão.....	68

## Índice de tabelas

Tabela 1 – Tumores primários do globo ocular .....	8
Tabela 2 – Tumores primários do globo ocular .....	9
Tabela 3 – Anticorpos primários utilizados para os quais foi obtida marcação positiva. ....	52
Tabela 4 – Protocolo utilizado para recuperação antigénica e diluição dos anticorpos. ....	52
Tabela 7 – Média de idades da amostra de gatos consoante o sexo .....	56
Tabela 8 – Sexo dos gatos utilizados em estudo .....	56
Tabela 9 – Raças dos gatos utilizados em estudo.....	57
Tabela 10 – Sexo dos cães utilizados em estudo.....	57
Tabela 11 – Raças dos cães incluídos em estudo .....	58
Tabela 12 – Sinais clínicos na amostra de gatos .....	58
Tabela 13 – Sinais clínicos na amostra de cães.....	59
Tabela 5 – Composição da amostra da espécie felina. ....	60
Tabela 6 – Composição da amostra da espécie canina.....	60
Tabela 14 – Resultados da imunomarcção das dez amostras de tumores melanocíticos felinos para o Melan-A* .....	61
Tabela 15 – Resultados da imunomarcção das dez amostras de tumores melanocíticos caninos para o Melan-A* .....	62
Tabela 16 – Resultados da imunomarcção das dez amostras de tumores melanocíticos felinos para o Ki-67 (índice de proliferação - IP) .....	64
<b>Tabela 17</b> – Resultados da imunomarcção das dez amostras de tumores melanocíticos caninos para o Ki-67 (índice de proliferação - IP) .....	65
Tabela 18 – Resultados da imunomarcção das dez amostras de tumores melanocíticos felinos para o CD117 (C-kit) .....	66
<b>Tabela 19</b> – Resultados da imunomarcção das dez amostras de tumores melanocíticos caninos para o CD117 (C-kit) .....	67

## Índice de anexos

<b>Anexo 1:</b> <i>Abstract</i> da comunicação a realizar no Congresso da Sociedade Europeia de Oftalmologia Veterinária (ESVO) em Bucareste, Roménia, nos dias 17 a 20 de Outubro de 2013. ....	83
<b>Anexo 2:</b> Paineis da comunicação a realizar no Congresso da Sociedade Europeia de Oftalmologia Veterinária (ESVO) em Bucareste, Roménia, nos dias 17 a 20 de Outubro de 2013. ....	84

## **Lista de Abreviaturas e Símbolos**

**Ac:** anticorpo

**AINEs:** anti-inflamatórios não esteróides

**CA:** California

**<sup>60</sup>Co:** cobalto-60

**COFLOW:** Ocular Pathology Laboratory of Wisconsin

**COX:** ciclooxigenase

**CTLA-4:** antigénio 4 associado ao linfócito T citotóxico

**DNA:** deoxyribonucleic acid

**EC:** europeu comum

**EMA:** European Medicines Agency

**EUA:** Estados Unidos da América

**F:** fêmea

**Fase S:** síntese

**Fase G0:** repouso

**Fase G1 e G2:** “Gap”

**FC:** fêmea castrada

**FDIM:** feline diffuse iris melanoma

**FeLV:** vírus da leucemia felina

**FeSV:** vírus do sarcoma felino

**FGFR3:** recetor do fator de crescimento dos fibroblastos

**FIV:** vírus da imunodeficiência felina

**FMV- UL:** Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa

**GM-CSF:** granulocyte macrophage colony-stimulating factor

**GO:** globo ocular

**HE:** hematoxilina eosina

**<sup>125</sup>I:** iodo-125

**IHQ:** Imunohistoquímica

**IL:** interleucina

**<sup>192</sup>Ir:** irídio-192

**JM:** justamembranar

**Kg:** quilograma

**LAP:** Laboratório de Anatomia Patológica

**M:** macho  
**MC:** macho castrado  
**mg:** miligrama  
**OD:** olho direito  
**OE:** olho esquerdo  
**PAAF:** punção aspirativa com agulha fina  
**PCR:** polymerase chain reaction  
**PD-1:** programmed cell death receptor-1  
**<sup>103</sup>Pd:** paládio-103  
**PDGF:** fator de crescimento derivado das plaquetas  
**PIO:** pressão intraocular  
**<sup>106</sup>Ru:** rutênio-106  
**SOPTF:** sarcoma ocular pós-traumático felino  
**Tc:** linfócitos T citotóxicos  
**UL:** Universidade de Lisboa  
**WHO:** World Health Organization  
**%:** percentagem

## **Introdução**

Hoje em dia, os nossos animais de companhia apresentam uma esperança média de vida muito superior ao que apresentavam nas últimas décadas, facto este que está associado ao aumento progressivo do conhecimento da comunidade médica e científica de referência, ao elevado número e qualidade dos meios complementares de diagnóstico e ao aumento da sensibilidade dos proprietários dos animais para a saúde animal e pública. A esse aumento da esperança média de vida nos nossos animais de companhia está também associado o aumento da prevalência de doenças degenerativas e neoplásicas entre outras, que o médico veterinário deverá saber diagnosticar, estabelecer um prognóstico e procurar a melhor terapêutica possível.

O desenvolvimento de neoplasias com sede intraocular não é exceção. Num vasto estudo de 2010 por Dubielzig, Ketring, McLellan & Albert (2010) concluiu-se que 39% das doenças oculares que afetavam os cães e gatos em estudo correspondiam a doenças neoplásicas. De entre as neoplasias intraoculares mais frequentes nas espécies canina e felina, destacam-se os tumores com origem nas células melanocíticas (Dubielzig, 2011). O conhecimento das características clínicas, epidemiológicas e anatomopatológicas são essenciais no desenvolvimento de um correto diagnóstico, prognóstico e manejo terapêutico.

A técnica de imunohistoquímica começa a ser um elo essencial no diagnóstico histopatológico de tumores. Todavia, ainda não estão descritas as características imunohistoquímicas dos tumores melanocíticos intraoculares no cão e no gato. Este facto contribuiu para a escolha do tema da presente dissertação de mestrado, associado ao grande interesse do aluno em oftalmologia e em anatomia patológica.

A presente monografia organiza-se da seguinte forma: o primeiro capítulo corresponde à descrição das atividades desenvolvidas nos estágios curricular e extracurricular; o segundo capítulo consiste na revisão bibliográfica acerca das neoplasias de origem melanocítica da úvea do cão e do gato, incluindo a epidemiologia, o comportamento clínico e localização das neoplasias, terapêutica e técnicas de diagnóstico clínico e anatomopatológico.

Finalmente, o terceiro capítulo desta dissertação constitui o estudo retrospectivo das características de vinte casos de tumores oculares de origem melanocítica, dezoito dos quais com base na coleção de tumores do Laboratório de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa (LAP-FMV-UL) e os restantes dois casos do Laboratório de Patologia Veterinária – VetPat, ocorridos no período compreendido entre 2001-2012, juntamente com as respetivas histórias clínicas. Assim, a presente monografia pretende estudar as diferenças clínicas e histopatológicas entre os diferentes tumores

intraoculares melanocíticos caninos e felinos e ao mesmo tempo tentar perceber se alguma das características imunohistoquímicas analisadas neste estudo pode ser usada como fator de prognóstico ou alvo terapêutico.

## **I - Atividades desenvolvidas durante o estágio**

O estágio curricular realizou-se na área da medicina interna e cirurgia de animais de companhia. As atividades do estágio decorreram no Hospital Escolar da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, nos períodos compreendidos entre 3 de Setembro de 2012 a 28 de Dezembro do mesmo ano e entre 4 de Fevereiro de 2013 a 28 de Março do presente ano, com um total de 1344 horas de trabalho. No período de tempo compreendido entre o dia 3 de Janeiro de 2013 e o dia 31 do mesmo mês, as atividades de estágio decorreram no Hospital Clínico Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Autónoma de Barcelona, no departamento de oftalmologia, com um total de 152 horas.

### **Atividades desenvolvidas no Hospital Clínico Veterinário da FMV-UAB**

De acordo com o Programa Internacional de Visitantes, o departamento de oftalmologia do Hospital Clínico Veterinário UAB (Teresa Peña e Marta Leiva), possibilita a realização de um estágio nos principais serviços do departamento (medicina, cirurgia, imagiologia, anatomia patológica). Os visitantes são convidados a participar em todas as atividades do serviço e de formação dos internos e residentes: revisão de pacientes, seminários de introdução semanais, consultas de oftalmologia (1<sup>as</sup> consultas e de reavaliação), discussão de casos clínicos, períodos de estudo, cirurgias, outros serviços de formação (exames, discussão de artigos, observação de lâminas no departamento de anatomia patológica). Eram funções do visitante: auxiliar os residentes, internos e alunos do 4º ano na realização das consultas e exames clínicos; discutir os casos clínicos com os outros estudantes, as diplomadas em oftalmologia, residentes e internos; acompanhar os animais hospitalizados e participar na revisão de pacientes.

Nas consultas de oftalmologia, o aluno acompanhou essencialmente primeiras consultas e de rotina, auxiliando na realização do exame oftalmológico sistemático e exames complementares de diagnóstico (gonioscopia, eletrorretinografia, imagem).

Nas cirurgias, realizadas todas as semanas às terças e quintas-feiras de manhã, o aluno teve contacto com a indução e monitorização anestésica dos animais, a assistência como observador das técnicas e materiais utilizadas em cirurgia ocular, ajudante ou circulante.

Na área da imagiologia, o aluno teve contacto como observador na realização de exames complementares de diagnóstico tais como: ecografia ocular e ressonância magnética.

Na área da anatomia patológica, o aluno teve contacto com a observação e discussão de lâminas.

### **Atividades desenvolvidas no Hospital Escolar da FMV-UL**

O hospital escolar da FMV-UL está subdividido em várias áreas: consultas externas (geral e de especialidade), cirurgia, imagiologia e internamento. As consultas externas realizam-se por ordem de chegada, marcações e por serviço de urgência. As consultas externas por ordem de chegada e marcação decorrem todos os dias, das 9 às 21h. As consultas de emergência decorrem 24h por dia, assim como o serviço de internamento. O serviço de cirurgia decorre, preferencialmente, durante o período da manhã dos dias úteis.

Tal como foi referido, o estágio no hospital escolar da FMV-UL decorreu num total de 1344 horas de trabalho e compreendeu a rotação pelos seguintes serviços: consulta externa (geral e da especialidade de oftalmologia), cirurgia, imagiologia e internamento. Todas as atividades desenvolvidas pelo aluno eram auxiliadas e supervisionadas pelos médicos veterinários dos respetivos serviços. Coube também ao aluno estagiário, colaborar e auxiliar os estudantes do 3º, 4º e 5º ano na prática das atividades hospitalares.

### **Consulta externa**

A presença do aluno no serviço de consulta externa realizou-se num total de 20 semanas. Aqui, o aluno teve como principal função a realização da anamnese e história pregressa, bem como a execução do exame clínico dos animais. De seguida o aluno auxiliava o médico assistente na reavaliação dos animais e na execução de eventuais exames complementares de diagnóstico. Juntamente com o médico assistente e com os colegas estudantes ou estagiários, o aluno participava na discussão dos diagnósticos diferenciais, planos terapêuticos e realização dos mesmos aquando do momento da consulta. A este nível destacam-se atividades realizadas pelo aluno, tais como: colheita de amostras biológicas (sangue, urina, fezes, PAAF para citologias, entre outras), auxílio na administração de fármacos, radiografia, ecografia, TAC, discussão e execução de planos de desparasitação e vacinação.

### **Internamento**

Durante as rotações de 24h no serviço de internamento, o aluno tinha como funções e responsabilidades: Administração de fármacos aos animais internados, execução de monitorizações periódicas que incluíam a realização de exames físicos e outros quando necessários, o cuidado com o bem-estar animal no que toca às necessidades de alimentação, higiene e passeios, e finalmente o apoio à prática das atividades hospitalares dos alunos do 3º, 4º e 5º ano.

## **Imagiologia**

Durante as duas semanas de rotação pelo serviço de imagiologia, o aluno auxiliou o médico veterinário de serviço na realização das películas radiográficas (posicionamento dos animais, revelação de películas radiográficas) que depois eram alvo de discussão. Para além da técnica radiográfica, o aluno teve contacto com outras técnicas de imagem, nomeadamente, mielografia, TAC e ecografia (abdominal e ecocardiografia). Nesses serviços também era da competência do aluno o auxílio no posicionamento correto dos animais, sedação, monitorização anestésica e discussão dos resultados de imagem obtidos em cada caso.

## **Cirurgia**

No serviço de cirurgia, o qual decorreu durante 5 semanas consecutivas, o aluno acompanhou todas as atividades decorridas no bloco de cirurgia tais como: indução e monitorização anestésica dos animais, ajudante de cirurgião, observador e circulante.

De entre o acompanhamento das cirurgias de ortopedia e tecidos moles, o aluno acompanhou também várias cirurgias da especialidade de oftalmologia. Foi também função do aluno o acompanhamento dos animais no pré e pós-cirúrgico (quer a nível de internamento, quer a nível de consulta).

## **II - Neoplasias oculares em cães e gatos**

A nível ocular, sempre que apareçam em consulta animais com massas ou hemorragias intraoculares, uveíte, glaucoma ou descolamento da retina, dever-se-á considerar sempre o diagnóstico diferencial de neoplasia intraocular. Podem ser primárias ou secundárias por invasão local ou metastização (Dubielzig et al., 2010).

De entre os tumores mais frequentes na espécie canina, que poderão ter sede intraocular, destacam-se por ordem decrescente de incidência: tumores com origem nas células melanocíticas (melanocitoma e melanoma), tumores do epitélio iridociliar (adenomas e adenocarcinomas), linfoma e neoplasias de células fusiformes da íris em cães de olhos azuis (Dubielzig, 2011).

Na espécie canina, aquando da suspeita da presença de uma ou várias massas a nível intraocular, deve ter-se sempre em consideração os seguintes diagnósticos diferenciais: quistos da íris, lesões granulomatosas, estafilomas da íris ou neoplasias, para podermos fazer um bom diagnóstico de tumor intraocular. Quer o prognóstico, quer o tipo de terapêutica a aplicar, vão depender do diagnóstico obtido (Dubielzig et al., 2010).

De entre os tumores mais frequentes na espécie felina, que poderão ter sede intraocular, destacam-se por ordem decrescente de incidência: tumores com origem nas células melanocíticas (melanocitoma e melanoma), linfoma, tumores do epitélio iridociliar (adenomas e adenocarcinomas), sarcoma ocular pós-traumático felino (SOPTF) e suas variantes (Dubielzig, 2010).

Entre todos estes tumores, o melanoma difuso da íris do gato é o mais prevalente nesta espécie (Planellas, Pastor, Peña & Leiva, 2010).

Os sinais clínicos associados à presença de neoplasia intraocular variam. Destacam-se a presença de massas intraoculares, hipotonia, hifema, glaucoma secundário, leucocoria, alterações da cor da íris e descolamento da retina (Grahn, Peiffer, Cullen & Haines, 2006).

Aquando a suspeita da presença de uma ou várias massas ao nível da úvea do gato e/ou alterações da cor da mesma, dever-se-ão realizar os seguintes diagnósticos diferenciais: pequenos sinais da íris (“*iridial freckles*”); nevus; quisto uveal e neoplasia (Grahn et al., 2006).

## **1. Epidemiologia das neoplasias oculares em cães e gatos**

Dubielzig et al. (2010) apresentaram um vasto estudo retrospectivo sobre doenças oculares com base na coleção de amostras do *Ocular Pathology Laboratory of Wisconsin (COPLOW)*, onde concluem que dos 20 219 cães e gatos com doenças oculares analisados, 39% apresentavam neoplasia ocular.

Um ano depois, Dubielzig (2011) apresenta os resultados de um estudo elaborado com base na casuística do mesmo arquivo, no qual revela que das neoplasias oculares do cão, 47% afetam o globo ocular, 25,3% têm sede na conjuntiva, 23,1% nas pálpebras e 4,6% correspondem a tumores da órbita. Do total de 47% de neoplasias do globo ocular, 64,6% correspondem a neoplasias melanocíticas e 29,3% a neoplasias do epitélio iridociliar. Na espécie canina, não se encontrou relação nenhuma entre o tipo de tumor e o sexo dos animais. A média das idades rondava os 9,2 anos e a mediana os 9,5 anos (Dubielzig, 2011).





No que se refere às neoplasias oculares na espécie felina, segundo o mesmo estudo de (Dubielzig, 2011), 81,7% dos tumores tinham origem no globo ocular, 12,2% a nível da conjuntiva, 4,2% nas pálpebras e 1,8% a nível da órbita. Dos 81,7% dos tumores com origem no globo ocular, 82,1% tinham origem nas células melanocíticas. A média e mediana da idade dos gatos afetados foram de 10,6 e 11 anos, respetivamente. Neste mesmo estudo verificou-se uma relação bastante acentuada entre a raça persa e a afeção por tumores oculares de origem melanocítica (Dubielzig, 2011).





Num estudo retrospectivo de Silva (2013) conclui-se que num período de 12 anos, a proporção de cães e gatos diagnosticados com neoplasia ocular na Faculdade de Medicina Veterinária (FMV) foi de 0,75% e 0,84%, respetivamente. Do total das neoplasias diagnosticadas quer no cão quer no gato, durante o mesmo período de tempo na mesma instituição, verificou-se que 1,8% e 1,9% respetivamente, corresponderam a neoplasia ocular (Silva, 2013). Os resultados de Silva (2013) demonstram também que o globo ocular está na lista das localizações mais comuns das neoplasias oculares. Neste, a túnica média (que compreende o corpo ciliar, íris e coroide) é a estrutura mais afetada, compreendendo 45,2% dos tumores do globo ocular do cão e 48,4% dos tumores do globo ocular do gato, sendo que nesta última espécie, a íris foi a estrutura da túnica média com a incidência maior de neoplasia (Silva, 2013).

**Tabela 1** – Tumores primários do globo ocular. Adaptado de “Dubielzig, R.R. Tumors of the eye – In *Tumors of the Domestic Animals*”

<b>Tipo de tumor</b>	<b>Célula de origem</b>	<b>Espécies</b>	<b>Prognóstico</b>
<b>Melanocitoma</b>	Melanócito	Canina e felina	Bom
<b>Melanoma maligno</b>	Melanócito	Canina	Possíveis metástases, raramente fatal
<b>Melanoma difuso da íris</b>	Melanócito	Felina	Reservado, com exceções se remoção cirúrgica precoce
<b>Tumor do epitélio iridociliar</b>	Células epiteliais pigmentadas ou não pigmentadas da íris ou corpo ciliar	Canina e felina	Bom
<b>Meduloepitelioma</b>	Células primitivas da neuroectoderme	Canina e equina (jovens)	Raras metástases
<b>Sarcoma pós traumático</b>	Lentes: células epiteliais, fibroblásticas e osteoblásticas, melanócitos, outras	Felina	Muito reservado

**Tabela 2** – Tumores primários do globo ocular. Adaptado de “Dubielzig, R.R. Tumors of the eye – In *Tumors of the Domestic Animals*”

Nome do tumor	Observações	Esquema
Melanocitoma Epibulbar	Benigno. Ocorre no cão ao nível do limbo esclero-corneano. Tumor de células fortemente pigmentadas e redondas. Presença de células fusiformes.	
Melanocitoma da úvea anterior	Benigno. Ocorre no cão e no gato ao nível da úvea anterior. Presença de células fortemente pigmentadas redondas e fusiformes. Pode haver invasão local, mas não há metastização.	
Melanocitoma da coróide	Benigno. Ocorre no cão ao nível da coróide. Presença de células fortemente pigmentadas redondas e fusiformes. Pode haver invasão local, mas não há metastização.	
Melanoma intraocular canino	Ocorre no cão. Características histológicas de malignidade. Taxa de metastização baixa. Pode ocorrer em qualquer sítio da úvea, apesar da úvea anterior ser o local de eleição. Muitas vezes de caracter difuso.	

<p>Melanoma difuso da íris do gato</p>	<p>Ocorre no gato. Maligno. Tem início na superfície anterior da íris, preenchendo-a totalmente e ao corpo ciliar. Presença de células redondas, fusiformes e de tipo “balloon”.</p>	
<p>Tumor do epitélio iridociliar</p>	<p>Ocorre no cão, raramente no gato. Pode ser invasivo localmente, embora não metastize. Células poderão ser pigmentadas ou não.</p>	
<p>Meduloepitelioma</p>	<p>Ocorre em cães e em equinos (mais em jovens) normalmente na úvea anterior. Raramente maligno. Origem nas células primitivas da neuroectoderme, podendo originar rosetas e tubos radiados para o interior do globo ocular.</p>	
<p>Sarcoma pós traumático felino</p>	<p>Maligno. Ocorre em gatos após traumatismo com rutura das lentes, invadindo rapidamente o globo ocular.</p>	

## **2. Tumores oculares de origem melanocítica – enquadramento geral**

Um grande estudo de neoplasias melanocíticas intraoculares primárias demonstrou que 79% das lesões benignas tinham sede na úvea anterior em relação ao limbo e ou à coróide. Das lesões malignas, 95% tinham origem na úvea anterior (Collins & Moore, 1999).

Apesar de serem raros os processos tumorais a nível ocular no cão e no gato, os tumores melanocíticos são os tumores primários intraoculares mais comuns quer numa quer noutra espécie (World Health Organization [WHO], 2002), e as estruturas onde estes tumores têm origem mais frequentemente são a íris e o corpo ciliar, ou seja, ao nível da úvea anterior, apesar de já terem sido referidas situações de melanoma primário da coróide, mas em número muito reduzido (Collins & Moore, 1999). Além disso, os melanomas primários da úvea anterior podem invadir a coróide posteriormente. Contudo, a apresentação clínica e o comportamento biológico do tumor diferem entre a espécie canina e felina (Finn, Krohne & Stiles, 2008).

Apesar da ocorrência de tumores de origem melanocítica nas espécies domésticas ser relativamente rara, estes ocorrem com maior prevalência na espécie canina em comparação com outras espécies, entre as quais a espécie felina (Collins & Moore, 1999).

As neoplasias oculares com origem nos melanócitos, quer em cães, quer em gatos, podem resultar em processos de dor, perda da função visual e mais gravemente metastização, com risco de morte para o animal (Finn et al., 2008).

Os tumores melanocíticos são divididos em duas entidades clínicas diferentes pela WHO (2002), com base na terminologia utilizada para a classificação dos tumores melanocíticos da pele. Essa classificação baseia-se em características tais como o comportamento clínico e localização do tumor, índice de proliferação, pleomorfismo nuclear, rácio núcleo-citoplasma e índice mitótico (Collins & Moore, 1999). Assim, esses tumores são classificados como melanocitomas para descrever as lesões benignas e melanomas para descrever as lesões malignas (WHO, 2002). O primeiro termo é utilizado para designar melanomas benignos da úvea anterior, do limbo e da coróide. O segundo é designado como maligno se a sua morfologia celular apresentar nucléolos proeminentes, um rácio núcleo-citoplasma superior a um, e mais de duas figuras mitóticas por dez campos em ampliação de 400x (Collins & Moore, 1999). Todavia, a distinção entre os dois nem sempre é clara (WHO, 2002).

A presente monografia pretende estudar as diferenças clínicas e histopatológicas através da técnica da imunohistoquímica, entre os diferentes tumores melânicos da úvea do cão e do gato diagnosticados no LAP FMV-UL e LAP VetPat, entre 2001 e 2012.

### 3. Patogénese do melanoma

O melanócito é uma célula dendrítica responsável pela síntese de melanina com origem nos melanoblastos neuroectodérmicos da crista neural, que em certa altura do desenvolvimento embrionário migraram para outras estruturas tais como a epiderme, derme, membranas mucosas, íris e coróide (Smith, Goldschmidt & McManus, 2002).

A melanina é um pigmento granular endógeno cujas funções são a proteção contra a radiação solar e a atribuição de cor à pele, mucosas, íris, coróide e pêlos.

No cão, os tumores com origem nos melanócitos correspondem a cerca de 5 a 7% da totalidade dos tumores. Nesta mesma espécie, os locais mais frequentes para a ocorrência do melanoma são a cavidade oral, os lábios, a pele e os dígitos. Apenas cerca de 2% da totalidade dos melanomas tem origem ocular (Grilo, Timóteo, Santos & Abrantes, 2010).

No gato, ao contrário do cão, o melanoma tem sede mais frequentemente a nível ocular, seguindo-se, por ordem decrescente, a pele e a cavidade oral (Planellas et al., 2010).

As causas que estão no início de um processo tumoral deste tipo de células ainda não são conhecidas em cerca de 35% dos melanomas cutâneos e da totalidade dos melanomas de outras localizações.

Com a exceção dos cavalos cinzentos, a transformação de lesões benignas em malignas nas espécies domésticas é muito pouco comum. Assim, pensa-se que entidades clínicas como os melanomas são lesões que tem origem *de novo* a partir dos melanócitos da epiderme, derme, epitélio ocular e oral (Smith et al., 2002).

Para que se possa desenvolver o processo de carcinogénese, são necessários fatores de promoção, tais como: trauma crónico, exposição a agentes químicos, queimaduras, hormonas, infeções, drogas, entre outros. A instabilidade no DNA do hospedeiro levada a cabo por fatores genéticos e/ou ambientais facilita a transformação neoplásica subsequente. As atividades dos supressores normais da proliferação celular tais como a *pRb* (*Retinoblastoma Protein*) e a proteína *p53* são afetadas, na maioria dos casos de melanoma, por mutações nos genes codificadores de proteínas intrínsecas a estes processos de regulação do crescimento celular (Smith et al., 2002). Concomitantemente, também já foi observado, num estudo de melanomas uveais humanos, a sobreexpressão do gene *blc-2* (supressor da apoptose). A mutação dos proto-oncogenes em oncogenes também favorece a proliferação celular e consequentemente o crescimento do tumor. Em vários estudos *in vivo* e *in vitro* de melanomas, foram identificados os seguintes oncogenes: *c-myc*, *c-erb-B-2*, *c-yes*, *c-kit*, e *ras*. Da mesma forma, não se pode deixar de referir a importância do crescimento autónomo do tumor, que no caso do melanoma é regulado pelos fatores de crescimento autócrino tais como:

fator de crescimento dos fibroblastos, proteínas de regulação de crescimento, interleucina (IL)-8, IL-10, IL-18, fator de crescimento A derivado das plaquetas e hormona estimuladora dos melanócitos.

O processo de angiogénese é fundamental para que um tumor, independentemente da sua derivação, subsista e se desenvolva. Num estudo sobre melanomas humanos de 2001 foram estudadas as concentrações séricas de quatro fatores angiogénicos – angiogenina, fator de crescimento endotelial vascular, fator de crescimento de fibroblastos e IL-8, tendo-se verificado que todos estes fatores estavam significativamente aumentados nos pacientes doentes em relação aos controlos saudáveis (Smith et al., 2002).

Finalmente, durante todo o processo tumoral, as células tumorais não devem ser detetadas pelo sistema imunitário do indivíduo, devem ser fisicamente capazes de sobreviver e circular pelo sistema linfático e sanguíneo, e serem capazes de proliferar dentro de um ambiente diferente da sua origem. Assim, refere-se que a IL-10 produzida pelo tumor apresenta um papel de bloqueio da resposta imune do hospedeiro em relação à presença do tumor (Smith et al., 2002).

#### **4. Sinais clínicos**

Muitas vezes, se não a maioria, são os proprietários dos animais os primeiros a detetar alterações, tais como mudanças de cor e/ou presença de massas a nível intraocular. Pelo contrário, outras vezes as lesões podem passar despercebidas aos donos ou clínicos, e só quando se está perante uma situação de uveíte ou glaucoma secundário é que se detetam as restantes alterações a nível ocular.

A apresentação clínica deste tipo de tumores pode variar. Por vezes, pode-se observar uma massa focal e confinada à íris; outras vezes, os tecidos anómalos podem ser extensos e envolver outras estruturas intra ou extraoculares. As massas de maior tamanho podem fazer protuberância através da pupila, causar deslocamento anterior da íris e/ou discoria. De entre os sinais clínicos mais comuns, destacam-se: espessamento da íris, pupila irregular, cegueira, desconforto e dor ocular. Nem todos estes tipos de tumores apresentam o mesmo grau de pigmentação, podendo mesmo variar de caso para caso e inclusivamente podem existir melanomas amelanóticos, o que é raro. Adicionalmente, podem observar-se outros sinais clínicos, tais como queratite, uveíte anterior, hifema, glaucoma secundário, buftalmia e descolamento de retina.

Tal como foi referido, os melanomas da úvea anterior são bastante invasivos localmente, podendo envolver outros tecidos circundantes intra e/ou extraoculares tais como a coróide,

esclera, ângulo iridocorneal, córnea e órbita. A massa tumoral poderá, em certos casos, provocar subluxação do cristalino. A nível da câmara anterior, há tendência para haver flutuação de melanócitos e melanófagos. A obstrução do ângulo de filtração do humor aquoso provocado por este fenómeno pode levar a glaucoma secundário, o que é bastante comum na evolução clínica destes processos.

Em relação à diferença na apresentação clínica deste tipo de tumores, refere-se que na espécie canina os melanomas tendem a apresentar-se como massas de crescimento nodular, enquanto que nos gatos e humanos essa apresentação tende a ser um infiltrado difuso.

Dada a variedade dos sinais clínicos descritos, na investigação clínica de um possível tumor de origem melanocítica deve-se fazer um exame físico e oftalmológico completos (Collins & Moore, 1999).

## **5. Tumores oculares de origem melanocítica no cão**

### **5.1. Melanocitoma da úvea anterior no cão**

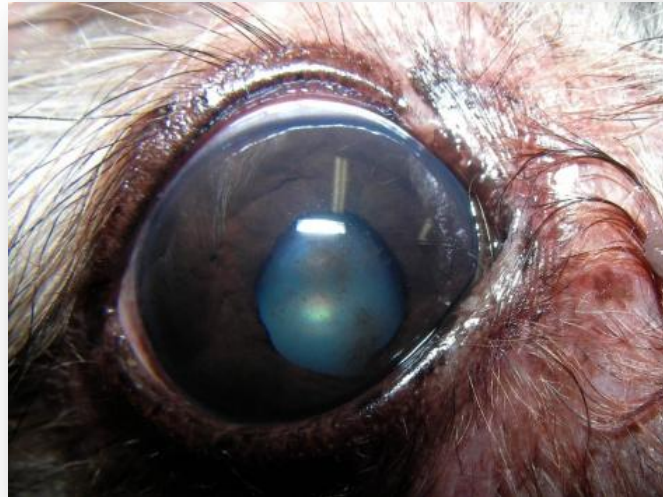
#### **5.1.1. Comportamento clínico e localização**

O melanocitoma é uma neoplasia benigna de origem melanocítica bastante comum no cão, sendo o tumor primário intraocular mais comum nesta espécie (WHO, 2002). A idade média do seu aparecimento na espécie canina são 9,7 anos, ocorrendo na maior parte dos casos (94%) na úvea anterior. Apenas cerca de 6% ocorrem ao nível da úvea posterior, ou seja, na coróide. De referir que existem casos de melanocitomas uveais caninos descritos em animais com menos de dois anos de idade (Dubielzig et al., 2010). O melanocitoma constitui cerca de 79,2% das neoplasias intraoculares com origem nos melanócitos na espécie canina (Dubielzig, 2011).

Segundo um recente estudo numa população canina, levado a cabo por Dubielzig et al. (2010), verificou-se que as fêmeas esterilizadas foram a porção da população de cães mais afetada, seguindo-se os machos castrados, os machos não castrados e as fêmeas inteiras. Das raças de cães mais afetadas por este tipo de tumor benigno, destacaram-se neste estudo o Retriever do Labrador, o Golden Retriever, o Schnauzer e o Cocker Spaniel.

Este tipo de tumor apresenta-se normalmente como uma única massa pigmentada profunda com tendência para a protrusão para a câmara anterior ou posterior. O crescimento do tumor tende a ter um perfil mais expansivo do que invasivo, não sendo preditivo de metastização, apesar de a extensão escleral poder resultar numa implantação do tumor ao nível da órbita. Todavia, nalguns casos, o tumor permanece confinado apenas à úvea anterior, crescendo de forma circunferencial até ocupar virtualmente a totalidade da mesma (WHO, 2002).

Apesar do melanocitoma não apresentar potencial de metastização, este pode ser agressivo localmente, podendo destruir o globo ocular. Assim, secundariamente a um melanocitoma, poder-se-á originar um processo de glaucoma, descolamento da retina, hemorragia intraocular e dor ocular, pondo em causa a capacidade visual do animal e podendo nalguns casos “mascarar” a entidade tumoral (Dubielzig, 2002).



**Figura 1** – Melanocitoma da úvea anterior no cão. Fonte: Prof. Dra. Esmeralda Delgado

### **5.1.2. Características histopatológicas**

Existem também variações histopatológicas dos tumores melanocíticos que permitem distinguir as lesões benignas das malignas, ou seja, que permitem a distinção dos melanocitomas dos melanomas através da análise histopatológica. Alguns autores usam a quantificação de determinados tipos de células (ex: células fusiformes, ovóides, epitelióides) para classificar as lesões com qualidades de benignidade ou malignidade. Contudo, o critério de classificação das células varia frequentemente de autor para autor (Collins & Moore, 1999).

O melanocitoma é bastante uniforme em termos celulares e tem origem nos melanócitos do estroma da íris ou do corpo ciliar. É constituído, primariamente, por grandes células redondas a poligonais fortemente pigmentadas, frequentemente presentes nas margens do tumor, e por um número pouco expressivo de células germinativas de perfil fusiforme com pouco pigmento, de núcleo oval e central. A variação do tamanho e coloração dos núcleos é mínima e o número de figuras mitóticas é muito baixo. A proporção de células germinativas representa menos de 5% do total da população celular do tumor (WHO, 2002). A maioria das células são hiperaturas amitóticas, predispostas para lise e não para a constante divisão (Dubielzig et al., 2010).

Existem situações em que os tumores são pouco pigmentados e as células são pouco diferenciadas. Estas situações dificultam a realização de um diagnóstico histopatológico, daí que tenham sido desenvolvidas outras técnicas de coloração, tais como a imunohistoquímica,

que auxiliam o exame histopatológico neste e noutra tipo de situações. A técnica e a aplicabilidade da imunohistoquímica irão ser abordadas mais à frente na presente monografia. Outras características histológicas que permitem diferenciar os processos benignos dos malignos são: índice mitótico, pleomorfismo nuclear e rácio núcleo-citoplasma. O índice mitótico típico dos melanocitomas é baixo: menos de duas figuras mitóticas por dez campos de alta ampliação.

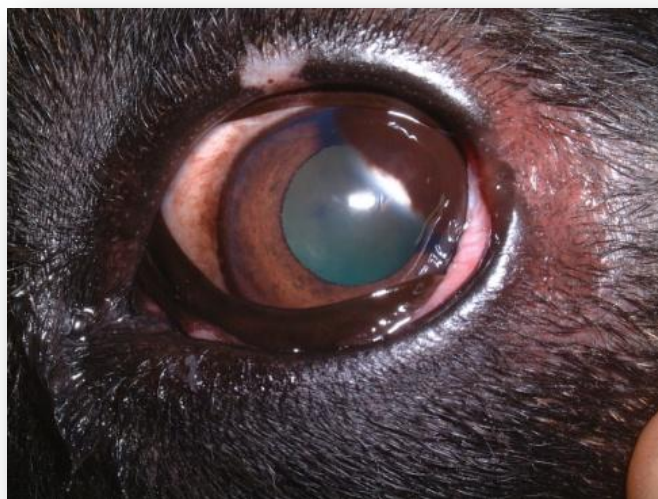
Todavia, este tipo de tumor pode evoluir para a malignidade. Nesta situação, as células que o constituem tornam-se na sua maioria de perfil fusiforme (e não tanto de perfil arredondado) e são menos pigmentadas (Dubielzig et al., 2010).

## **5.2. Melanocitoma do limbo esclero-corneano**

Este tumor é benigno mas indistinguível em termos histológicos do melanoma da úvea anterior do cão. Tem origem na linha de melanócitos presentes ao nível da junção da esclera com a córnea, e apresenta-se normalmente como um nódulo preto destacado na zona onde tem origem. Como apresenta um crescimento periférico padrão, este tipo de tumor poderá ser sujeito apenas a um tipo de técnica cirúrgica menos invasiva, como a exérese do nódulo, permitindo dessa forma manter o globo ocular do animal funcional (WHO, 2002).



**Figura 2** – Melanocitoma do limbo esclero-corneano em cão de raça Caniche. Fonte: Prof. Dra. Esmeralda Delgado



**Figura 3** – Melanocitoma do limbo esclero-corneano em cão de raça Rottweiler.  
Fonte: Prof. Dra. Esmeralda Delgado

### **5.3. Melanocitoma da úvea posterior (coróide) do cão**

Do total dos melanocitomas que afetam a úvea do cão, cerca de 6% afetam a coróide (Dubielzig et al., 2010). Este tipo de tumores caracteriza-se por massas com origem nos melanócitos da coróide que apresentam crescimento expansivo extremamente lento. Eventualmente, nalguns casos, poderá haver alguma protuberância para o vítreo. Estes tumores apresentam características clínicas e histológicas de benignidade, sendo a metastização extremamente rara. Contudo, se os tumores alcançarem tamanhos consideráveis, poderão dar origem a outros problemas, tais como o descolamento da retina e/ou a compressão do nervo ótico (WHO, 2002).

### **5.4. Melanose difusa da úvea do cão**

Esta entidade clínica caracteriza-se pela proliferação difusa de melanócitos ao nível da úvea anterior. Histologicamente, estes melanócitos são indistinguíveis dos que dão origem ao típico melanocitoma da úvea anterior do cão (WHO, 2002). Inclusivamente, há vários patologistas que distinguem o conceito de melanose de melanocitoma, considerando a melanose ocular como sendo uma variação difusa do segundo (Dubielzig et al., 2010). Esta entidade clínica pode envolver a coróide e ter sede em ambos os olhos (WHO, 2002).

Segundo a WHO (2002), esta doença de carácter proliferativo apresenta todas as características de uma neoplasia, tais como a proliferação descontrolada de células típicas e atípicas. Contudo, devido à sua diferente apresentação clínica não lhe é atribuído a designação de tumor. Está descrita na raça Cairn Terrier, estando referida frequentemente como causa de

glaucoma nesta raça. Há registos de ocorrência desta doença noutras raças, contudo com proliferação tipicamente unilateral (WHO, 2002).

Como já foi referido, em termos histológicos, os melanócitos que causam este tipo de alteração são difíceis de distinguir dos melanócitos responsáveis por outras entidades clínicas, como seja o caso da melanocitose da úvea. Assim, por vezes, o diagnóstico definitivo de uma alteração clínica de origem melanocítica torna-se mais complicado, principalmente em raças fortemente pigmentadas tais como o Retriever do Labrador preto e o Kerry Blue Terrier (WHO, 2002). Contudo, quer os melanocitomas, quer os melanomas uveais podem ocorrer nos cães da raça Cairn Terrier que sofrem de melanose ocular (Dubielzig et al., 2010).

O tratamento preconizado no caso de melanose ocular é a enucleação, pois na maior parte dos casos é difícil a distinção macroscópica de melanose versus melanoma. A enucleação ou a evisceração com colocação de prótese intraocular serão também os tratamentos aconselhados no manejo de um glaucoma não controlado medicamente, originado secundariamente a um processo de melanose ocular (Dubielzig et al., 2010).

## **5.5. Melanoma da úvea no cão**

### **5.5.1. Comportamento clínico e localização**

O melanoma é o segundo tipo de tumor com origem nos melanócitos que afeta a úvea do cão. A nível intraocular, a grande maioria dos melanomas ocorre ao nível da úvea anterior. De acordo com os resultados analisados a partir da *COPLOW Collection*, a média de idade de ocorrência corresponde a 10,3 anos, sem que haja incidência em indivíduos com menos de dois anos, como já foi descrito no caso dos melanocitomas. As raças de cães mais afetadas por este tipo de neoplasia são o Retriever do Labrador e o Golden Retriever, estando igualmente referida a elevada incidência deste tipo de neoplasia na raça Boxer (Ketring, 2003).

A apresentação clínica do melanoma da úvea canino é frequentemente descrita como uma massa única ou múltipla de crescimento nodular a nível da úvea anterior (Collins & Moore, 1999), apesar de, ocasionalmente, o mesmo tipo de tumor poder aparecer na úvea anterior de forma difusa. Todavia, raramente aparece a nível da coróide (Dubielzig, 2002).

Histologicamente, como se poderá ler mais à frente, este tipo de tumor no cão é classificado como maligno e apesar de ser frequentemente invasivo localmente, não corresponde ao sentido último de malignidade, pois a metastização, podendo ocorrer, é baixa e raramente fatal. Este facto contrasta fortemente com o potencial de metastização dos melanomas da cavidade oral (Dubielzig, 2002).

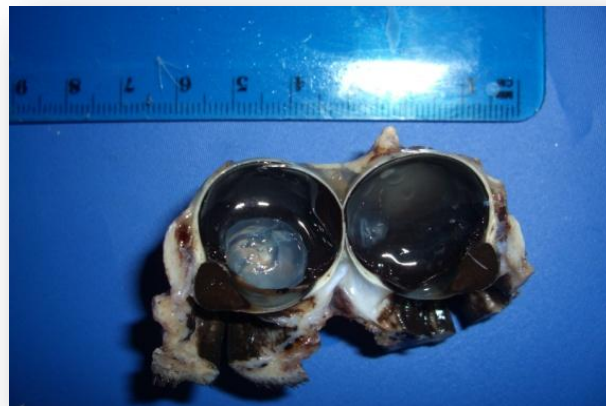
A metastização dá-se pela via sanguínea e poderá ocorrer com maior probabilidade quando o tumor apresenta extensão extraocular. No entanto, o olho poderá ser um órgão alvo de metastização, principalmente de melanomas primários da pele ou da cavidade oral, que são mais comuns na espécie canina (Collins & Moore, 1999).



**Figura 4** – Melanoma intraocular, muito provavelmente da úvea anterior, em cão de raça Schnauzer miniatura, macho, 9 anos de idade. Fonte: Prof. Dra. Esmeralda Delgado



**Figura 5** – Melanoma da úvea anterior, cadela de raça Labrador Retriever, 5 anos de idade. Fonte: Prof. Dra. Esmeralda Delgado



**Figura 6** – Melanoma da úvea anterior em corte transversal do globo ocular, cadela de raça Labrador Retriever, 5 anos de idade. Fonte: autor (LAP FMV-UL)

### **5.5.2. Características histopatológicas**

Os melanomas apresentam características histopatológicas tais como: anaplasia em relação à maturação de células fusiformes; aumento do perfil fusiforme das células que constituem o tumor e diminuição da pigmentação celular (muitos tumores são mesmo amelanóticos), embora possam ser encontradas células redondas pigmentadas. As células tumorais apresentam muitas vezes características de anisocitose, anisocariose, cariomegália, bilobação nuclear e presença de nucléolos grandes (Dubielzig et al., 2010). Nos melanomas, o índice mitótico é maior (> 4 figuras mitóticas por dez campos de alta ampliação), sendo na maioria dos casos a característica que melhor diferencia um processo benigno dum maligno. Mais de uma a duas figuras mitóticas por cada campo de grande ampliação (400x) corresponde a característica de malignidade (Dubielzig, 2002).

A nível dos melanomas cutâneos e orais, alguns autores consideram que a presença ou ausência de melanina neste tipo de tumores é irrelevante em termos de prognóstico (Smith et al., 2002). Contudo, foi verificado em estudos recentes que os cães que apresentavam melanomas com um maior grau de pigmentação, apresentavam taxas de sobrevivência superiores aos cães com melanomas menos pigmentados ou amelanóticos (Berghin, Smedley, Esplin, Spangler & Kiupel, 2011).

### **5.6. Tratamento do melanocitoma e do melanoma uveal canino**

Em relação ao tipo de tratamento preconizado para o melanoma uveal canino, estão descritas as técnicas cirúrgicas de enucleação, evisceração com implante de prótese intraescleral e excisão local (Dubielzig et al., 2010).

Como a diferenciação e o diagnóstico clínico entre melanoma e melanocitoma são, na maioria das vezes, difíceis de fazer, a técnica da enucleação acaba por ser o tratamento cirúrgico mais recomendando por prevenção, pois apesar de ser um procedimento mais invasivo, possibilita a extirpação de uma maior margem adjacente à área tumoral.

Existem outros tipos de técnicas cirúrgicas menos invasivas descritas para a resolução de algumas destas entidades clínicas, tais como a fotocoagulação com Laser de Diodo. Esta técnica poderá ser uma alternativa na resolução do melanocitoma, dada a sua natureza benigna. Por um lado é uma técnica menos invasiva, por outro lado, por não remover uma margem maior adjacente ao tumor como a técnica da enucleação, a recorrência do tumor poderá ocorrer mais facilmente, sendo necessário um acompanhamento mais frequente do animal no período pós-cirúrgico. É importante referir que um melanocitoma pode recorrer e evoluir para melanoma (Dubielzig et al., 2010).

### **5.7. Prognóstico do melanocitoma e do melanoma uveal canino**

Após a remoção do melanocitoma, quer pela técnica de enucleação, de evisceração ou através da excisão local, o prognóstico é favorável, sendo rara a recorrência e/ou a metastização deste tipo de tumores (Dubielzig et al., 2010).

Em termos de tempos de sobrevivência após enucleação, no estudo de Giuliano, Chappell, Fischer & Dubielzig, (1999) verificou-se que os cães que sofriam de melanoma apresentaram um tempo de sobrevivência significativamente mais curto em relação ao grupo de cães que sofriam de melanocitoma e em relação ao grupo controlo - cães que sofreram enucleação por outros motivos.

### **5.8. Melanoma da úvea posterior (coróide) no cão**

O melanoma que tem origem na coróide do cão é raro (Dubielzig, 2002). Normalmente, o envolvimento do tecido coróideu num processo de melanoma da úvea em cães corresponde a uma extensão do processo tumoral que tem origem na úvea anterior. Esta entidade clínica apresenta-se geralmente como uma massa fortemente pigmentada com origem na coróide subjacente ao *tapetum lucidum* e perto do disco ótico.

As células do *tapetum lucidum* podem estar mesmo ausentes na região de desenvolvimento do tumor. Estes tumores são massas que se apresentam demarcadas e ligeiramente elevadas em relação às restantes estruturas. Aparecem sob as células retinianas com aspeto semelhante a um nevus uveal humano.

Em termos histopatológicos, as células grandes e redondas predominam, apesar de também se poderem encontrar, em menor quantidade, células do tipo epitelióide e fusiforme.

Normalmente, este tipo de tumores é considerado benigno, devido ao facto de haver fraca anaplasia celular e invasão vascular e poucas figuras mitóticas. Contudo, já foram descritas situações de extensão do tumor a nível do nervo ótico e tecidos retrobulbares.

Devido ao facto de esta entidade clínica ser rara nos cães, os sinais clínicos que lhe estão associados também o são, apesar de não poderem ser ignorados. De entre os sinais clínicos que estão associados a este tipo de tumor destacam-se o descolamento da retina, a hemorragia intraocular e o glaucoma (Collins & Moore, 1999).

## **6. Tumores oculares de origem melanocítica no gato**

No estudo retrospectivo de Silva (2013), a autora refere que uma das estruturas mais afetadas por neoplasias, na espécie felina, foi o globo ocular (21,5%), sendo que o melanoma difuso ou não difuso foram as neoplasias mais encontradas ao nível da íris.

### **6.1. Melanocitoma da úvea do gato**

Nos gatos, esta neoplasia também é relativamente comum, correspondendo a cerca de 82,1% das neoplasias melanocíticas uveais felinas (Dubielzig, 2011). Como tratamento deste tipo de lesões estão preconizados a remoção cirúrgica por remoção da massa, a evisceração ou a enucleação. A fotocoagulação por laser de diodo é também uma possibilidade (Dubielzig et al., 2010).

### **6.2. Melanoma difuso da úvea do gato**

#### **6.2.1. Comportamento clínico e localização**

O melanoma é o segundo tumor intraocular com origem nas células melanocíticas mais frequente na espécie felina (Dubielzig, 2011) e, tal como nos cães, tem origem maioritariamente na úvea anterior, podendo afetar a coróide (Dubielzig et al., 2010).

O melanoma difuso da íris do gato é uma apresentação frequente na prática clínica. Segundo o estudo de Dubielzig et al. (2010), estes animais têm em média 9,4 anos de idade e o grupo dos gatos mais afetados é o grupo dos machos castrados, seguindo-se o grupo das fêmeas esterilizadas, fêmeas inteiras e machos inteiros. No estudo retrospectivo de Silva (2013), a autora refere que nos persas, o melanoma maligno foi o mais prevalente. Este tipo de tumor tem origem na camada de melanócitos que formam o bordo anterior da íris (WHO, 2002). Num estadio inicial, na sua maioria, estes gatos aparecem à consulta com áreas multifocais de pigmentação da íris, que vão tendo tendência para crescer progressivamente. Inicialmente as lesões observadas são classificadas como melanose da íris, caracterizando-se por pigmentação confinada à superfície anterior da mesma (Dubielzig et al., 2010).

Para que se possa fazer um diagnóstico clínico de melanoma da íris, tem que haver uma demonstração da progressão dos nevos irídicos para uma situação de alteração da arquitetura original da íris com espessamento e irregularidade da superfície da mesma ou da pupila. Nessa progressão, podem observar-se duas situações: o alargamento dos focos pigmentados iniciais e/ou o aumento do número dos focos de pigmentação (Planellas et al., 2010). Assim, as lesões passam a ser classificadas como melanoma difuso da íris do gato a partir do

momento em que os melanócitos invadem o estroma irídico, apesar de as lesões ainda estarem confinadas à íris (Dubielzig et al., 2010), raramente afetando a coróide (Planellas et al., 2010). A progressão da doença pode dar-se quer num espaço de tempo longo (superior a dez anos), quer num curto espaço de tempo. Na maioria das vezes, esta difusão de melanócitos afeta o corpo ciliar e a coróide e dá origem a sinais de glaucoma secundário associado à infiltração do ângulo iridocorneal pelas células neoplásicas e/ou juntamente com metastização (Dubielzig et al., 2010).

Dada a variabilidade da evolução da doença, é de referir que atualmente não há maneira de prever o prognóstico da mesma, e que este é pouco referido na bibliografia (Dubielzig et al., 2010). Contudo, sabe-se que num estágio mais avançado há maior probabilidade de ocorrerem metástases à distância (Dubielzig, 2011), sendo então preferível a enucleação num estadio precoce da doença.

Das diferenças clínicas com a espécie canina, destaca-se a apresentação morfológica do tumor, que no caso do gato é do tipo difuso e não nodular como na espécie canina. Destaca-se ainda a taxa de metastização porque, ao contrário do que se passa na espécie canina, no gato esse fenómeno é frequente, havendo referências na literatura a taxas de metastização que vão desde os 50% aos 65% (Morgan, 2008), apesar do seu desenvolvimento ser lento, ou seja, a probabilidade de um gato com este tipo de melanoma morrer da doença é inferior a 20% (WHO, 2002).

A metastização típica dos melanomas uveais ocorre nos pulmões, nos linfonodos submandibulares e no fígado. Já foi descrito um caso de metastização de melanoma difuso da íris do gato numa localização pouco comum (cabeça do rádio e diáfise proximal) (Planellas et al., 2010).

Foram estudadas várias características macro e microscópicas que estão relacionadas com o aumento da probabilidade de metastização. Entre elas, destacam-se a invasão da esclera e/ou do epitélio posterior da íris e o grande tamanho que o tumor pode atingir. (WHO, 2002).

O tempo entre o diagnóstico e a ocorrência de metastização pode variar entre os seis e os catorze meses, com uma média de 155 dias (Morgan, 2008).



**Figura 7** – Melanoma difuso da úvea anterior do gato. Fonte: Prof. Dra. Esmeralda Delgado



**Figura 8** – Melanoma difuso da úvea anterior de gato, 7 anos, raça Europeu Comum. Fonte: Prof. Dra. Esmeralda Delgado



**Figura 9** – Melanoma difuso da úvea anterior de gato, 7 anos, raça Europeu Comum, estado mais avançado. Fonte: Prof. Dra. Esmeralda Delgado



**Figura 10** – Melanoma difuso da íris em gato persa. Fonte: Prof. Dra. Esmeralda Delgado



**Figura 11** – Melanoma difuso da íris em gato persa. Olho esquerdo após enucleação. Fonte: Prof. Dra. Esmeralda Delgado



**Figura 12** – Gato persa após enucleação do olho esquerdo. Fonte: Prof. Dra. Esmeralda Delgado

Segundo a WHO (2002), a recomendação principal que se deve fazer aos clínicos é o acompanhamento frequente da evolução das lesões, no que respeita à observação de mudanças no crescimento do tumor e às alterações que poderão ocorrer na arquitetura original da íris. Se, numa primeira abordagem, o paciente sofrer de um processo de glaucoma secundário, o clínico deverá proceder de imediato à enucleação do globo ocular afetado.

### **6.2.2. Etiologia**

Segundo Cullen, Haines, Jackson & Grahn (2002), até agora, a maioria dos estudos envolvendo melanomas difusos da íris do gato não têm conseguido demonstrar a presença de DNA do FeLV ou antígeno deste nas células tumorais. Assim, tem-se sugerido a ausência do envolvimento deste vírus na patogênese da maioria destas afeções tumorais. Todavia, outros autores apresentam a possibilidade dos resultados de pesquisa serem negativos devido à degradação do DNA viral e da diminuição da antigenicidade tecidual pela fixação em formol tamponado a 10% (Cullen et al., 2002). Outros autores sugerem ainda que os vírus FeLV/FeSV podem iniciar o processo tumoral, mas que a partir de determinados estádios mais avançados do desenvolvimento tumoral, deixam de se conseguir detetar. Ao mesmo tempo Cullen et al. (2002) sugerem a possibilidade de vírus como o FeLV não estarem diretamente envolvidos na origem do tumor, mas que este possa ser uma consequência de um estado imunodeprimido do gato causado por este e outros vírus, tais como o FIV.

Apesar da origem de muitos dos melanomas oculares em gatos ser desconhecida, nalguns estudos verificou-se ser possível a indução experimental deste tipo de tumores no gato pelo vírus da Leucemia felina (FeLV) e pelo vírus do sarcoma felino (FeSV). Já foram também identificados retrovírus em gatos com melanoma da úvea (Morgan, 2008).

Contudo, no estudo de Cullen et al. (2002), não se conseguiu detetar os vírus da leucemia e do sarcoma felino em nenhuma amostra, quer pela marcação imunohistoquímica, quer pela técnica de PCR.

### **6.2.3. Características histopatológicas**

Este tipo de tumor no gato apresenta um conjunto extremamente variado de características histopatológicas tais como: abundância de células redondas a poligonais (que ocorre na maioria dos casos); células fusiformes; “balloon cells” (melanócitos grandes com grande citoplasma vacuolizado com núcleos grandes e redondos centrais e hipercromasia); anaplasia; células gigantes; variantes extremamente pigmentados a variantes amelanóticos que frequentemente podem ser confundidos com processos inflamatórios. Todavia, não existe nenhuma associação entre qualquer uma destas características citológicas e um fator de prognóstico (Dubielzig et al., 2010). Estudos anteriores tentaram estudar a possibilidade de existirem características histológicas do tumor capazes de funcionar como previsores de prognóstico, sem haver sucesso nas conclusões, pois foi difícil fazer o *follow up* da maioria dos animais e as necrópsias efetuadas eram escassas (WHO, 2002).

Se o índice mitótico for superior a quatro figuras mitóticas por dez campos de grande ampliação, dar-nos-á a indicação de que o tumor em curso apresenta um comportamento maligno (Planellas et al., 2010).

### **6.2.4. Tratamento**

Alguns autores sugerem que se deve proceder à enucleação a partir do momento em que se nota o crescimento progressivo das lesões pigmentares. Outros sugerem a enucleação aquando do aparecimento de glaucoma secundário (Dubielzig et al., 2010).

Apesar de alguns autores defenderem a enucleação em estádios iniciais da doença, justificando o aumento do tempo de sobrevivência, associado a uma menor metastização, outros autores referem que a metastização já existe na altura em que é feito o diagnóstico da doença. Assim não há ainda informação clara sobre as vantagens e as desvantagens da enucleação em estádios mais avançados da doença (Planellas et al., 2010).

Estudos em humanos que sofriam de melanoma maligno demonstraram que a disseminação de células neoplásicas na altura da enucleação poderia ser um fator de risco de metastização (Collins & Moore, 1999).

Apesar de tudo, verifica-se que na maioria dos estudos efetuados, os tempos de sobrevivência dos gatos cuja enucleação foi realizada em estadios muito iniciais da doença, foram semelhantes aos tempos de sobrevivência de gatos sem a doença. De referir também que a maioria dos gatos nos quais ocorreu metastização eram indivíduos com doença avançada. (Ex: extensão do melanoma para além da íris e/ou a presença de células tumorais ao nível do plexo venoso da esclera no momento da enucleação) (Collins & Moore, 1999).

Assim, conclui-se que a enucleação é o tratamento de primeira linha neste tipo de situações. Conclui-se também que a enucleação deverá ser executada em estádios iniciais da doença de forma a diminuir a probabilidade de metastização (Morgan, 2008).

### **6.3. Melanoma Atípico Felino (melanocitoma multifocal da úvea do gato)**

Este tipo de tumor corresponde a uma variante pouco comum do melanoma da úvea em felinos. Corresponde à presença de massas multifocais cuja constituição celular é apenas representada por células redondas altamente pigmentadas, com núcleos redondos pequenos, apenas visíveis em preparações que sofreram branqueamento (Dubielzig et al., 2010). Histologicamente, é idêntico ao melanocitoma da úvea anterior do cão (WHO, 2002).

Este tipo de tumor ocorre ao nível da úvea, podendo envolver a íris, apesar de em comparação com o FDIM (*feline diffuse iris melanoma*), a centralidade do tumor não ser ao nível da íris, mas sim ao nível do epitélio pigmentado da retina, preenchendo o espaço sub-retiniano e estendendo-se até à retina (Dubielzig et al., 2010). Este tumor pode expandir-se para as cavidades do olho e invadir a esclera (WHO, 2002). A metastização neste tipo de melanomas é frequente, apesar de em termos histopatológicos as características serem benignas (Dubielzig et al., 2010).

### **6.4. Outras apresentações do melanoma da úvea felino**

Outra apresentação, também menos comum, do melanoma da úvea do gato é a sua apresentação como uma única massa, que pode atingir dimensões consideráveis e estender-se para a câmara anterior e provocar discoria. Este tipo de tumor nodular normalmente tem carácter benigno e apresenta desenvolvimento lento, ocorre com maior frequência em gatos geriátricos e normalmente não é sujeito a tratamento cirúrgico se o seu desenvolvimento for lento e não der origem a uveíte significativa. Se o desenvolvimento for substancial, o tumor deve ser removido. Das técnicas utilizadas, e por ser um tumor menos invasivo e focal, destacam-se a fotocoagulação transcorneal com laser de Diodo ou a remoção cirúrgica através de iridectomia regional. Em termos de prognóstico, se o tumor for benigno, este será favorável (Grahm et al., 2006).

## **7. Marcadores de prognóstico**

Até ao presente não existe uma técnica única de diagnóstico capaz de fazer a diferenciação entre um tumor de origem melanocítica maligno e benigno e que possa prever um tempo de sobrevivência (Smith et al., 2002). Ao mesmo tempo, não existe um consenso universal sobre os critérios de elaboração de um prognóstico deste tipo de neoplasias, pelo que, sem um correto prognóstico, é difícil fazer uma boa abordagem terapêutica para cada caso.

Um estudo de 2011, em tumores melânicos caninos (pele, dígito, lábio e cavidade oral) levado a cabo por Smedley et al. (2011), determinou parâmetros de prognóstico para este tipo de tumores cuja significância estatística tem vindo a ser demonstrada. Os tumores melânicos intraoculares não foram considerados devido à falta de casuística.

### **7.1. Metastização**

A evidência de metastização visceral está associada a um mau prognóstico de tumores melânicos em qualquer parte do corpo do animal (Smith et al., 2002).

### **7.2. Localização anatómica**

Em termos gerais, a localização anatómica é um parâmetro de prognóstico importante nos tumores melanocíticos caninos. Estes, quando presentes na cavidade oral apresentam geralmente pior prognóstico em relação aos mesmos quando presentes nos dígitos ou na pele noutras partes do corpo do animal (Smith et al., 2002).

## **8. Técnicas de diagnóstico**

### **8.1. Exame oftálmico**

Para a observação e diagnóstico de qualquer entidade clínica com sede ocular, tumoral ou não, é necessária a realização de um exame oftálmico completo, de modo a que se possa retirar o máximo de informação possível antes da realização de qualquer exame complementar.

Assim, este exame deverá compreender em primeiro lugar a história oftálmica e seguidamente o exame oftalmológico propriamente dito, onde se inclui a avaliação da visão e o exame ocular à distância e sistemático. O exame ocular sistemático deverá compreender a avaliação dos reflexos oculares, o teste de Schirmer, a colheita de amostras bacterianas, víricas, fúngicas e citológicas se necessário, a tonometria, a biomicroscopia, a oftalmoscopia direta e/ou a oftalmoscopia indireta e outros exames complementares se necessários tais como o teste de fluoresceína, o estudo da permeabilidade lacrimal, a gonioscopia, a ecografia ocular, a eletrorretinografia, a paracentese da câmara anterior/vítrea, a angiografia fluorescente da retina, a fotografia, a radiografia, a tomografia axial computadorizada, a ressonância magnética, etc.

Na exploração de eventuais processos tumorais intraoculares, incluindo os de origem melânica, deve-se dar especial atenção à realização da tonometria, biomicroscopia, gonioscopia, ecografia ocular e fotografia (Delgado, 2010).

#### **8.1.1. Tonometria**

Esta técnica permite a avaliação da pressão intraocular (PIO). Existem três tipos de tonometria: a digital, a de indentação (tonómetro de Schiotz) e a de aplanamento (TONOPEN) (Delgado, 2010). A maioria dos casos de melanoma uveal apresenta aumento da pressão intraocular, devido essencialmente a processos secundários de glaucoma (Morgan, 2008).

#### **8.1.2. Biomicroscopia**

A biomicroscopia permite a avaliação de várias estruturas oculares, destacando-se as várias camadas da córnea, da câmara anterior e do cristalino e a localização de lesões (ex: alterações da cor, forma, presença de massas, etc.) a esses níveis (Delgado, 2010).

### **8.1.3. Gonioscopia**

A gonioscopia permite a visualização do ângulo iridocorneal, através de uma lente de Barkan ou goniolente (Delgado, 2010). Esta técnica é importante na diferenciação de melanomas da úvea e limbo. Os primeiros podem ter extensão extraocular e invadem o ângulo de filtração frequentemente. Os melanomas do limbo apresentam uma grande extensão para o tecido escleral, podem comprimir o ângulo de filtração, mas raramente o obstruem (Collins & Moore, 1999).

### **8.1.4. Ecografia ocular**

Em muitos centros de referência, a ecografia ocular tornou-se uma parte importante do exame oftálmico. Apesar das neoplasias com origem no globo ocular dos animais de companhia serem raras, existem sinais clínicos que lhes estão associadas como inflamação, hifema, glaucoma, entre outros, e que o clínico deverá saber identificar, assim como a sua origem. A este nível, a ecografia ocular, apresenta-se como um dos elos indispensáveis para um bom diagnóstico de eventual doença neoplásica ocular (Baptista, Villagrasa & Marinho, 2004). A nível ocular, esta técnica de imagem é utilizada para diagnóstico de massas volumosas, diferenciação entre tumores e quistos da úvea e determinação da extensão de tumores (Collins & Moore, 1999).

O modo de duas dimensões, designado por modo B, permite ao clínico fazer um exame topográfico do olho, assim como a sua avaliação no que toca à localização, tamanho, forma e atenuação dos ultrassons. Relativamente ao diagnóstico de neoplasias oculares, este modo, possibilita avaliar a extensão e consistência das massas tumorais, assim como a sua mobilidade e vascularização (Baptista et al., 2004).

Foram descritas características ecográficas em modo B do melanoma da úvea anterior do cão como: hiperecogenicidade do tumor; luxação da lente e extensão da neoplasia para o corpo vítreo sem sombra acústica. O modo B não pode determinar a histologia das massas que identifica, logo não pode diferenciar os melanomas doutro tipo de tumores. Todo o conhecimento sobre as características dos tumores por parte do clínico assim como a presença ou não de inflamação ajudará a fazer um correto diagnóstico ecográfico com este método (Mattoon & Nyland, 2002). Num estudo ecográfico de melanomas da úvea anterior do cão, levado a cabo por Baptista et al. (2004), obtiveram-se os seguintes resultados em modo B: 62,5% dos melanomas eram hiperecogénicos e 37,5% eram isoecogénicos. 100% dos tumores apresentaram forma irregular e inexistência de sombra acústica. O tamanho médio dos melanomas foi de 9,875 mm (4-25 mm) de diâmetro. O tumor maior apresentava um tamanho

de 25 mm de diâmetro, deslocando a lente caudalmente e invadindo ambas as câmaras anterior e posterior, o vítreo e a órbita. O melanoma mais pequeno media cerca de 4 mm de diâmetro e apenas apresentava protrusão a nível da câmara anterior.

O modo de amplitude (modo A) utiliza pequenos feixes de ultrassons que produzem picos com tamanho proporcional à força de retorno do ultrassom na interface das estruturas intraoculares e retrobulbares (Mattoon & Nyland, 2002). Ao contrário do modo B, o modo A pode ajudar a diferenciar os melanomas doutros tipos de tumor, apesar de as características ecográficas em modo A dos melanomas ainda não ter sido totalmente definida em medicina veterinária, tal como está já definida em medicina humana (Mattoon & Nyland, 2002). Todavia, Gibson, Roberts, Severin, Steyn & Wrigley (1998), demonstraram em alguns estudos características ecográficas dos melanomas em modo A tais como refletividade média a baixa com fraca atenuação ultrassonográfica. No estudo levado a cabo por Baptista et al. (2004), obtiveram-se os seguintes resultados em modo A: todos os melanomas corresponderam a massas sólidas, imóveis e homogéneas apresentando picos 100% regulares. 100% dos tumores demonstraram vascularização interna. 62,5% dos melanomas demonstraram refletividade interna média, 25% demonstraram refletividade interna baixa e 12,5% demonstraram refletividade interna alta. A atenuação dos ultrassons foi baixa e média em 56,25% e 43,75% dos casos, respetivamente.

Apesar dos resultados obtidos neste estudo e das semelhanças com os critérios estabelecidos em modo A para este tipo de tumores em medicina humana, é necessária mais investigação nesta área de modo a se poder utilizar esta ferramenta na avaliação e diagnóstico de tumores intraoculares nos nossos animais de companhia.

#### **8.1.5. Fotografia**

A fotografia, apesar de ser muitas vezes ignorada pelo clínico durante as consultas, torna-se valiosa porque permite avaliar a evolução das lesões nas consultas de acompanhamento. Assim, torna-se indispensável na avaliação da evolução clínica de um processo tumoral.

#### **8.1.6. PAAF Transvítrea**

Esta técnica de diagnóstico é executada sob visualização oftalmoscópica direta (Eagle, 2012). Contudo, esta técnica de diagnóstico não está isenta de possíveis complicações, podendo ser o diagnóstico final difícil de executar.

## **8.2. Histopatologia**

### **8.2.1. Fixação de tecidos seleccionados – Olho**

O globo ocular deverá ser bem fixado logo após a remoção cirúrgica. Este pode ser fixado em formol tamponado, por um período de tempo de 48 horas. Para que se possam obter boas secções de corte do globo ocular, a injeção intravítrea de formol é recomendada logo após a enucleação (H. Pissarra, comunicação pessoal, Dez 4, 2012).

### **8.2.2. Histoquímica**

Entre todos os corantes utilizados em histoquímica, a combinação de hematoxilina e eosina (HE) é a técnica de coloração mais frequentemente utilizada (Junqueira & Carneiro, 2004). Por ser uma técnica simples e rápida de utilizar e ter uma capacidade de demonstração de uma grande variedade de estruturas tecidulares que permite uma visualização geral da arquitetura do tecido ou da lesão, é a coloração de rotina dos laboratórios de anatomia patológica (Junqueira & Carneiro, 2004).

Quando se utiliza esta coloração é possível visualizar a presença de melanina em alguns tumores com origem nas células melanocíticas. A melanina apresenta-se nestes casos como um pigmento castanho a preto. Contudo, nalgumas situações, este tipo de coloração não é suficiente para a elaboração de um diagnóstico assertivo. Assim, são necessárias outras técnicas de coloração histoquímica de carácter específico para auxiliar a observação microscópica, e auxiliar na elaboração de um diagnóstico definitivo. Os métodos de branqueamento da melanina e os métodos argentafins correspondem a técnicas histoquímicas utilizadas na demonstração da melanina (Bancroft & Stevens, 1996).

#### **8.2.2.1. Método de branqueamento da melanina**

Neste método, recorre-se a oxidantes fortes, dos quais são exemplo o permanganato de potássio e o ácido oxálico, para fazer o branqueamento da melanina. Com o branqueamento confirma-se que o pigmento visualizado era melanina e além disso possibilita a visualização dos pormenores dos núcleos, que de outra forma eram “mascarados” pela presença do pigmento (Bancroft & Stevens, 1996).

#### **8.2.2.2. Métodos argentafins (Fontana-Masson)**

A melanina tem a capacidade de fazer a redução da prata a prata metálica, sem necessitar de um agente redutor externo. A esta capacidade chama-se argentafinidade. A prata metálica apresenta cor negra e, consoante o corante que é utilizado no contraste, os núcleos e o citoplasma variam de cor (Bancroft & Stevens, 1996).

### **8.3. Imunohistoquímica**

#### **8.3.1. Definição geral**

A técnica designada por imunohistoquímica refere-se a um conjunto de procedimentos com o objetivo de identificar estruturas tecidulares que funcionam como antigénios, através da utilização de anticorpos específicos que as marcam, *in situ*, sob uma reação antigénio-anticorpo. Posteriormente a esta reação específica, a ligação antigénio-anticorpo pode ser marcada por outro marcador tal como outra proteína (ex. enzimas) ou outro composto (ex. compostos fluorescentes; compostos radioativos; metais pesados). Assim, no final, poder-se-á observar microscopicamente as estruturas celulares onde se encontram o anticorpo e consequentemente o antigénio através de uma alteração de cor ou eletrodensidade das mesmas. Essas estruturas celulares a identificar podem ser normais ou anormais (tumoriais ou não), bem como a sua própria funcionalidade e morfologia poderá estar ou não alterada (Borges, 2010).

As neoplasias intraoculares que apresentam pouca diferenciação podem ser grandes desafios em termos de diagnóstico para os patologistas. Muitas vezes, a observação das características morfológicas dos tumores e das características histoquímicas através da microscopia convencional, onde se utilizam técnicas de marcação histoquímica de rotina como a hematoxilina-eosina, não são suficientes para se obter um diagnóstico correto (Grahm et al., 2006). Assim, desenvolveram-se outras técnicas mais específicas como a Imunohistoquímica (IHQ) que permitem auxiliar o patologista na execução do diagnóstico histopatológico e na investigação da origem e diferenciação de neoplasias, entre as quais as neoplasias oculares (Grahm et al., 2006).

Muitas vezes, o diagnóstico de melanoma pode ser difícil, mesmo para patologistas experientes, particularmente em tumores melanocíticos com pouca quantidade de melanina. Para além disso, é de referir que os tumores melanocíticos caninos e felinos apresentam uma variedade muito grande em termos de características histopatológicas, tornando-os difíceis de

distinguir doutros processos tumorais tais como tumores da linha hematopoiética, sarcomas e carcinomas (Smith et al., 2002).

No estudo sobre classificação morfológica, histoquímica e imunohistoquímica de tumores intraoculares felinos levado a cabo por Grahn et al. (2006), verificou-se que três dos casos em que se diagnosticou linfossarcoma intraocular através da observação morfológica dos tumores, posteriormente, com a técnica de IHQ, esses mesmos tumores expressaram diferenciação antigénica compatível com melanoma. No mesmo estudo, dois tumores diagnosticados morfológicamente como sarcomas intraoculares e dois tumores como indiferenciados, expressaram posteriormente diferenciação antigénica compatível também com melanoma. Desta forma, pode concluir-se que a utilização da IHQ pode ser uma ferramenta importante para o patologista para o diagnóstico assertivo destas lesões. Para isso, a utilização de algoritmos de classificação IHQ de cada tipo de tumor devem ser utilizados para a determinação de marcadores celulares e, dessa forma auxiliar o diagnóstico destes tumores, principalmente daqueles que apresentam pouca diferenciação (Grahn et al., 2006).

Um exemplo da utilização da IHQ no estudo da origem das neoplasias oculares é, por exemplo, a investigação da presença de antigénios virais em neoplasias oculares de gatos, tais como o sarcoma intraocular e o melanoma difuso da íris (Grahn et al., 2006).

Existem vários marcadores com sensibilidade e especificidade variada. Na marcação dos tumores melanocíticos são frequentemente utilizados os marcadores Melan-A, S-100, entre outros (Smedley et al., 2011).

### **8.3.2. Aplicações da imunohistoquímica**

A nível das ciências biológicas, destacam-se como áreas de aplicação desta técnica o estudo de processos neoplásicos (diagnóstico, indicação terapêutica e prognóstico); o estudo de doenças infecciosas e outras doenças (Borges, 2010).

Relativamente ao diagnóstico de processos neoplásicos, esta técnica é uma mais-valia no diagnóstico de tumores cuja diferenciação morfológica é fraca. Para além disso, poderá nalguns casos ser uma ferramenta importante na distinção do carácter maligno ou benigno de determinadas afeções tumorais, e na caracterização da origem de metástases (Borges, 2010).

### **8.3.3. Pré-requisitos para a técnica de imunohistoquímica**

Para que se possa garantir que qualquer técnica de diagnóstico utilizada possa traduzir resultados corretos, dever-se-á assegurar determinados requisitos.

Em relação à técnica imunohistoquímica, deve garantir-se que o antígeno a detetar permanece disponível ao longo do procedimento da técnica e que essa disponibilidade se dá no local de origem do mesmo. Dever-se-á também garantir as características originais do antígeno, que vão ser reconhecidas, em todo o período de elaboração da técnica.

Outra condição refere-se às características do anticorpo (Ac) primário. Este deve ligar-se apenas ao antígeno que se pretende marcar (marcação específica) e não a outros elementos ao mesmo tempo (marcação inespecífica). Para se evitar esta situação dever-se-á cumprir um terceiro pré-requisito que é o conhecimento das características do soro a aplicar tais como: clonalidade, especificidade, reatividade, classe e subclasse do Ac e condições de manuseamento.

O último requisito que se deve ter em conta é a utilização de uma marcação estável e com intensidade suficiente. Desta forma, pretende-se assegurar que não existem dúvidas quer à existência ou não do antígeno no tecido (Borges, 2010).

Ao longo do tempo foram-se desenvolvendo anticorpos monoclonais específicos para detetar determinados antígenos associados aos melanomas humanos. Os mesmos foram utilizados no diagnóstico do melanoma canino. Têm vindo a ser feitos estudos de forma a concluir-se quais os melhores anticorpos a serem utilizados no diagnóstico deste tipo de tumores (Grilo et al., 2010).

## **9. Marcadores Imunohistoquímicos**

A prática correta do diagnóstico imunohistoquímico poderá envolver a utilização de uma bateria de anticorpos direcionados contra um determinado número de marcadores teciduais e não apenas de uma ou duas marcações. Assim, o diagnóstico imunohistoquímico basear-se-á no algoritmo final de marcações positivas e negativas de uma determinada bateria de anticorpos contra um tecido específico. Por exemplo, quer o melanoma quer o schwannoma apresentam marcação positiva para a proteína S-100. Contudo, apenas o melanoma deve apresentar marcação positiva para marcadores mais específicos para este, tais como o HMB-45, Melan-A ou o MITF e, apresentar marcação negativa para os marcadores neurais, proteínas neurofilamentosas ou CD57. Por seu lado, o schwannoma deverá ser positivo para marcadores neurais e negativo para marcadores melanocíticos.

Por forma a facilitar o diagnóstico e dar indicações sobre o prognóstico e terapêutica, a técnica IHQ tem sido cada vez mais utilizada, sobretudo em medicina humana (Eagle, 2012).

Um considerável número de anticorpos está disponível no mercado para a marcação IHQ de tumores melanocíticos humanos (Chu & Weiss, 2009). A maioria dos melanomas é marcada pelos anticorpos anti-proteína S-100 e anti-vimentina, Ki-67 e CD117. Para além destes marcadores, existem outros marcadores que são frequentemente utilizados, tais como o HMB-45, o Melan-A e o MITF (Eagle, 2012).

Na presente monografia, iremos recair no estudo da marcação imunohistoquímica do Ki67, CD117 e Melan-A, assim como nas suas implicações no diagnóstico, prognóstico e estratégias terapêuticas para este tipo de tumores.

### **9.1. Ki-67**

Este antigénio corresponde a uma proteína nuclear, que é expressada em todas as etapas ativas do ciclo celular, ou seja, nas fases G1, S, G2 e durante a mitose. Durante a fase G0 do ciclo celular, esta proteína não é expressada. Ao contrário de muitas outras proteínas associadas ao ciclo celular, esta está ausente nas células quiescentes e não é passível de ser detetada durante os processos de reparação do DNA. Assim, verifica-se que a presença da proteína Ki-67 está estritamente associada ao ciclo celular e confinada ao núcleo da célula, desempenhando um papel importante na manutenção e/ou regulação do ciclo da divisão celular (Leica Biosystems, 2013).

A fração de crescimento acedida pela marcação imunohistoquímica pelo Ki67 é avaliada como um fator de prognóstico em numerosos estudos, incluindo no estudo dos melanomas caninos (Smendley et al., 2011).

Cada estudo utiliza métodos diferentes de medição do índice de marcação pelo Ki67. Todavia, todos os estudos evidenciam diferenças entre os tumores benignos e malignos de origem melanocítica. Fazendo a correlação entre o índice de marcação, o tempo médio de sobrevivência e o número de figuras mitóticas, o Ki67 parece ser um importante marcador de prognóstico no estudo do comportamento dos tumores melanocíticos (Bergin et al., 2011).

O recurso à marcação imunohistoquímica da proteína Ki-67 está recomendado no diagnóstico de todas as neoplasias melanocíticas, especialmente nos casos mais dúbios em que o diagnóstico com a HE é pouco conclusivo. Segundo as fontes bibliográficas sobre neoplasias melânicas caninas, a marcação pelo Ki-67 apresenta significância estatística em termos de prognóstico das lesões melanocíticas da cavidade oral, lábio, pele e dígito. Para as neoplasias

melanocíticas do lábio e cavidade oral, o índice de marcação deverá corresponder ao número médio de núcleos marcados positivamente por cinco grelhas de 1mm<sup>2</sup> com ampliação de 400x. Se este índice for superior ou igual a 19.5, o prognóstico é reservado. Se o mesmo for inferior a 19.5, é esperado um prognóstico favorável (Smedley et al., 2011). Para as neoplasias melanocíticas cutâneas e dos dígitos, o índice de marcação do Ki-67 deverá corresponder à percentagem de núcleos positivamente marcados numa contagem de 500 células. As neoplasias com um índice superior ou igual a 15% apresentam prognóstico reservado. Se o índice for inferior a 15%, o prognóstico é favorável. Em ambos os métodos de cálculo do índice de marcação do Ki-67, a contagem deverá ser feita nas áreas de maior marcação. O uso de grelhas de contagem é cada vez mais utilizado em patologia, pois permite fazer uma standardização da área dos campos de contagem entre diferentes microscópios. Assim, segundo o mesmo estudo, para além da avaliação das características clínicas e histológicas tais como a atipia celular, a atipia nuclear, e o cálculo do índice mitótico, o cálculo do índice de marcação do Ki-67 constitui uma ferramenta importante de apoio na classificação benigna ou maligna das neoplasias melanocíticas (Smedley et al., 2011).

## **9.2. Melan-A**

O Melan-A (*melanocyte antigen*), corresponde a uma proteína citoplasmática conhecida por MART-1 (*Melanoma Antigen Recognized by T cells*). A função desta proteína ainda não é totalmente conhecida mas sabe-se que o Melan-A está envolvido no reconhecimento do tumor por parte dos linfócitos Tc. É uma proteína altamente específica, contudo a sua sensibilidade é menor que outros marcadores (92 a 57,66%) (Sevastre, 2012).

Num estudo em melanomas cutâneos e orais de cão de Sevastre (2012), verificou-se que o marcador Melan-A deve ser utilizado no diagnóstico imunohistoquímico de melanoma devido à sua grande especificidade, pois ao contrário de outros marcadores como a Vimentina e S-100, não marcou nenhum dos controlos negativos utilizados (tumores de origem não melanocítica).

No mesmo estudo, verificou-se, à semelhança de estudos anteriores, que a imunorreatividade do Melan-A apresentava diferenças consoante o tipo de células constituintes do melanoma em questão. Essa imunoreatividade era maior em melanomas constituídos por células fusiformes ou mistas, do que por células de tipo epitelióide. A mesma reatividade deste marcador era maior em melanomas melanóticos (83%) do que em melanomas amelanóticos (60%), à semelhança de resultados apresentados noutros estudos (Sevastre, 2012). Assim, os mesmos

autores consideram que o Melan-A é um marcador ideal para o diagnóstico de melanoma, mas não é um marcador perfeito, devido à sua relativa baixa sensibilidade.

De acordo com o estudo de melanomas orais e cutâneos do cão de Koenig, Wojcieszyn, Weeks & Modiano (2001), os locais de maior marcação do Melan-A corresponderam às zonas de maior pigmentação celular dos melanomas.

Num estudo envolvendo 48 melanomas felinos (42 cutâneos, 3 orais, 1 labial, 2 metastáticos), verificou-se que 67% dos tumores marcaram positivamente para o Melan-A e 87,5% marcaram positivamente para o S-100. Neste mesmo estudo, os autores chegaram à conclusão que o marcador Melan-A não é tão sensível como o marcador S-100, mas é mais específico que este. A marcação com o Melan-A apresentou-se sempre com um padrão difuso ao nível do citoplasma e nunca ao nível do núcleo.

Finalmente, os autores deste estudo aconselham o recurso ao Melan-A e ao S-100 no diagnóstico de melanomas na espécie felina (Ramos-Vara, Miller, Johnson, Turnquist, Kreeger & Watson, 2002).

### **9.3. CD-117 (C-kit)**

C-kit é uma proteína transmembranária que atua como recetor tirosina cinase, apresentando um papel essencial na homeostasia dos melanócitos. Esta proteína, quando sujeita a mutação, está associada ao desenvolvimento tumoral destas células. Para além dos melanócitos, a proteína c-kit está presente nas células-mãe hematopoiéticas, mastócitos, células de Cajal, células germinativas, células basais da pele e do epitélio dos ductos mamários (Dako, 2002). Estudos em tumores melanocíticos humanos revelam que a expressão desta proteína se dá geralmente em melanocitomas e em melanomas malignos primários, perdendo expressão com o desenvolvimento do tumor e nos tumores secundários. Num estudo de Gomes, Queiroga, Prada & Pires (2012), sobre a expressão da proteína c-kit em tumores melanocíticos cutâneos do cão, verificaram-se os seguintes resultados: a marcação da proteína deu-se sobretudo a nível citoplasmático e a extensão e intensidade de marcação foram geralmente maiores nos melanocitomas (83,3%) em relação aos melanomas malignos (22,2%). Estes resultados concordam com alguns estudos semelhantes realizados em humanos, tornando o cão um possível modelo para a investigação deste tipo de tumores. Este mesmo estudo sugere que a perda de marcação de c-kit nos melanomas malignos poderá ser um indicador de malignidade/agressividade do tumor, indicando a possível utilidade deste marcador no diagnóstico deste tipo de tumores.

## 10. Tratamento

### 10.1. Imunoterapia – Vacinação

O tratamento adjuvante com imunomoduladores, tais como vacinas e citocinas, pode aumentar o tempo médio de sobrevivência dos pacientes após ressecção cirúrgica total do tumor (Spitler, Grossbard, Ernstoff, Silver, Jacobs, Hayes & Soong, 2000).

A primeira vacina a ser aprovada para o tratamento complementar de neoplasias em animais foi a vacina Oncept<sup>®</sup> (Merial<sup>®</sup>, Lyon, França). Este fármaco foi aprovado como uma vacina terapêutica para o tratamento de melanomas em cães (estadio II e III e para os quais o controle local da doença foi alcançado – linfonodos negativos ou linfonodos positivos que foram removidos cirurgicamente ou sujeitos a radioterapia), ou seja, na prevenção da disseminação tumoral. Foi desenvolvida pela empresa Merial<sup>®</sup> (Lyon, França) e licenciada pela empresa Vical<sup>®</sup> (San Diego CA, EUA), e foi concebida com o objetivo de aumentar o tempo de sobrevivência de cães com melanoma da cavidade oral.

O mecanismo de ação desta vacina é diferente do mecanismo de ação das vacinas convencionais utilizadas com muita frequência na prevenção de doenças infecciosas que estimulam o sistema imunitário a desenvolver uma resposta defensiva *à posteriori* contra proteínas estranhas ao organismo.

Em contrapartida, a vacina utilizada para tratamento do melanoma foi concebida para reconhecer uma proteína expressa pelas células melanocíticas - a tirosinase - que não é normalmente identificada pelo sistema imunitário do animal, porque também está presente em células normais do cão. A tirosinase é uma glicoproteína melanosomal, com um papel essencial na síntese da melanina.

Esta vacina contém um gene codificador da proteína tirosinase de origem humana, que se vai inserir no DNA do animal ao nível das células musculares. A tirosinase humana presente no corpo do animal é suficiente para despoletar uma reação do sistema imunitário do animal contra estas proteínas através da produção de anticorpos e linfócitos Tc. Como a tirosinase canina é muito semelhante à humana, deixa de haver tolerância às proteínas *self* e assim, a resposta imunitária é eficaz contra as células tumorais melanocíticas que expressam a tirosinase.

Esta vacina destina-se a ser utilizada como vacina terapêutica (imunoterapia) e não como prevenção do tumor. Assim, a sua utilização complementa a remoção cirúrgica do tumor ou outros tratamentos (ex. radioterapia).

O tratamento inicial requer a administração de quatro doses com duas semanas de intervalo, seguindo-se a revacinação a cada seis meses.

Num estudo levado a cabo por Liao, Gregor, Wolchok, Orlandi, Craft, Leung, Houghton & Bergman (2007), três dos nove cães com melanoma oral (estádios II a IV pela WHO) que foram submetidos à administração desta vacina apresentaram controlo do tumor a longo-prazo com um tempo de sobrevivência médio de 389 dias (superior aos um a cinco meses de sobrevivência dos animais tratados com quimioterapia convencional), sendo que um dos cães apresentou um tempo de sobrevivência de quatro anos após o início da terapêutica. Estão também descritos, casos de aumento do tempo de sobrevivência em cães com melanoma dos dígitos, submetidos a terapêutica com a vacina Oncept<sup>®</sup>.

A sua utilização tem vindo a ser aplicada também no tratamento de outros tipos de melanomas, entre os quais os melanomas intraoculares. Apesar de não existirem estudos sobre a aplicabilidade e sucesso desta terapêutica neste tipo de tumores melanocíticos quer em cão, quer em gato, existem casos de sucesso com remissão tumoral praticamente conseguida (J. Henriques, comunicação pessoal, Julho 12, 2013).

Atualmente, a vacinação com Oncept<sup>®</sup> é já considerada o tratamento complementar de eleição no tratamento deste tipo de tumores, incluindo os melanomas intraoculares de cão e de gato, mesmo antes da utilização da terapêutica quimioterápica (Bergman, 2012).

Em medicina humana, a imunoterapia é já uma realidade bem implementada no tratamento dos tumores melanocíticos. Destacam-se vários agentes utilizados, tais como: Ipilimumab, GM-CSF (*granulocyte macrophage colony-stimulating factor*), Nivolumab, Lambrolizumab, MPDL3280A e os vírus oncolíticos (Kirkwood & Sosman, 2013).

O Ipilimumab (YERVOY<sup>®</sup> 5mg/ml concentrado para solução para perfusão) é um medicamento concebido para ajudar o sistema imunitário a combater tumores através do aumento da atividade das células T. É um anticorpo monoclonal IgG1 totalmente de origem humana, recombinante, que atua bloqueando o CTLA-4 (antígeno 4 associado ao linfócito T citotóxico), uma molécula presente nas células T que atua como travão natural da resposta imunitária. Este princípio ativo é indicado para o tratamento do melanoma avançado que não pode ser removido cirurgicamente e/ou para o melanoma metastático (Yervoy, 2011).

O GM-CSF é uma molécula multifuncional com funções importantes no desempenho do sistema imunitário. Uma das funções mais importantes desta molécula em termos de terapêutica de tumores, é a sua capacidade de ativar macrófagos. *In vitro*, este fator estimula os monócitos periféricos sanguíneos a tornarem-se citotóxicos para as células do melanoma humano. A administração *in vivo* de GM-CSF aumenta a capacidade citotóxica dos

monócitos. Ao mesmo tempo, este fator apresenta-se como o principal mediador de proliferação, maturação e migração das células dendríticas – importantes células apresentadoras de antígenos, desempenhando um papel fundamental na indução da resposta imune primária e secundária levada a cabo pelas células T citotóxicas. Finalmente, o GM-CSF promove o aumento da produção da metaloelastase pelos macrófagos infiltrados no tumor, resultando na produção de angiostatina pelos mesmos. A angiostatina inibe a angiogênese e causa supressão do crescimento de metástases pulmonares (Spitler et al., 2000).

Num estudo apresentado no presente ano pela *American Society of Clinical Oncology*, verifica-se que a associação Ipilimumab + GM-CSF apresenta resultados superiores em termos de taxa de resposta global ao tratamento, estabilização da doença e tempo de sobrevivência global em comparação com a administração única do Ipilimumab (Kirkwood & Sosman, 2013).

O Nivolumab corresponde a um anticorpo que atua como imunomodulador bloqueando o recetor PD-1 (*programmed cell death receptor-1*). Quando o ligando do recetor PD-1, expressado por uma grande variedade de tumores incluindo 40% dos melanomas metastáticos, se liga ao recetor PD-1 dá origem à diminuição da atividade das células T e da resposta imune. Assim, o mecanismo de ação do Nivolumab é ligar-se ao recetor PD-1, evitando a ligação deste ao seu ligando natural e, dessa forma, evitando a inibição da atividade das células T e da resposta imune, essenciais no controlo de qualquer tipo de entidade tumoral (Kirkwood & Sosman, 2013).

O Lambrolizumab (MK-3475) corresponde também a um anticorpo utilizado em medicina humana no tratamento do melanoma em estadió avançado e/ou metastático., sendo também um anticorpo que funciona como imunomodulador bloqueando o recetor PD-1 (Kirkwood & Sosman, 2013).

O MPDL3280A corresponde a um anticorpo que se liga ao ligando natural do recetor PD-1, também utilizado na terapêutica do melanoma humano em estadió avançado e/ou metastático (Kirkwood & Sosman, 2013).

Em relação à imunoterapia com recurso aos vírus oncolíticos, destaca-se a imunoterapia Talimogene “Iaherparepvec” que compreende a administração de um vírus HSV1 contendo o gene codificador do GM-CSF (potente imunoestimulador).

## **10.2. Tratamento com AINEs**

Em medicina humana, os AINEs apresentam importância na prevenção e tratamento de alguns tumores tais como o carcinoma do cólon, o cancro da mama e o melanoma maligno (Pires, Garcia, Prada & Queiroga, 2010), sendo as ciclooxigenases 1 e 2 os alvos deste tipo de fármacos.

Em 2003, Mohammed, Craig, Mutsaers, Glickman & Snyder (2003) descreveram a expressão das COX-1 e COX-2 em melanomas malignos da cavidade oral do cão e em 2010, Pires et al. (2010), conseguem demonstrar pela primeira vez a expressão destas ciclooxigenases em melanomas cutâneos e oculares do cão, para além da cavidade oral. Nesse mesmo estudo a expressão da COX-1 não apresentou diferenças significativas em termos de expressão nos tumores malignos e benignos, sendo expressada pelos dois tipos de tumores. Pelo contrário, apenas se observou a expressão da COX-2 nos tumores malignos. Esta diferença entre os tumores benignos e malignos é semelhante à que existe nas lesões melanocíticas de origem humana, sugerindo que a COX-2 poderá estar envolvida na transformação neoplásica dos melanócitos caninos, tal como acontece no Homem (Pires et al., 2010). Este estudo sugere que os AINEs, nomeadamente os inibidores da COX-2, poderão ser um elo importante no tratamento dos tumores melanocíticos, nomeadamente os de carácter maligno.

### **10.3. Carboplatina**

A carboplatina é um composto platinado de segunda geração, análogo da cisplatina, sendo um quimioterápico muito utilizado no tratamento de numerosos tumores em humanos e apresentando taxas de resposta à terapêutica de 11 a 19% em ensaios clínicos em doentes com melanoma em estadio II (Rassnick, Ruslander, Cotter, Al-Sarraf, Bruyette, Gamblin, Meleo & Moore, 2001).

No estudo de Rassnick et al. (2001), o tratamento de melanomas caninos em estadio avançado com carboplatina deu origem aos seguintes resultados: resposta global ao tratamento em 28% dos casos; remissão total do tumor num dos casos; resposta parcial ao tratamento em 24% dos casos (>50% redução do tamanho do tumor); 36% dos cães apresentaram doença estável e outros 36% apresentaram doença progressiva. A resposta ao tratamento esteve associada a uma administração de carboplatina na dose de 15,1mg/kg.

O mesmo estudo demonstrou efeitos secundários à terapêutica com carboplatina na totalidade dos animais. Os efeitos descritos foram: diarreia, vômito e anorexia mais ou menos exacerbados consoante os animais. Aquando o tratamento, deve fazer-se proteção de estômago e limitar-se a dose nos animais com insuficiência renal, dado o fármaco ser excretado pelos rins.

Como conclusão, os autores do estudo sugerem a carboplatina com uma opção terapêutica a considerar em cães com melanomas macroscópicos e em melanomas microscópicos locais e sistémicos.

Segundo o estudo de Brockley, Cooper & Bennett (2012), no geral, a associação da quimioterapia com carboplatina no tratamento local do melanoma canino oral, cutâneo e digital não leva a melhorias no tempo de sobrevivência dos pacientes. No mesmo estudo, nalguns cães com melanoma oral grave, verificou-se um aumento substancial no tempo de sobrevivência em relação aos pacientes não responsivos à carboplatina.

A associação carboplatina com piroxicam pode ser considerada no tratamento destas situações em que não se consegue aceder a cirurgia ou radioterapia (Brockley et al., 2012).

#### **10.4. Cisplatina + Piroxicam**

A cisplatina é um fármaco quimioterápico de largo espectro, que apresenta atividade no tratamento do melanoma oral canino (Boria, Murry, Bennett, Glickman, Snyder, Merkel, Schlittler, Mutsaers, Thomas & Knapp, 2004).

O piroxicam é um AINE com atividade no tratamento de vários tipos de tumores da espécie humana e canina, estando descrita a remissão tumoral de melanomas orais em cães (Boria et al., 2004).

No estudo de Boria et al. (2004), dos onze cães com melanoma oral tratados com a combinação cisplatina + piroxicam, apenas dois obtiveram remissão total do tumor. Tal facto confirma a fraca taxa de resposta dos cães com melanoma ao tratamento quimioterápico, com aumentos do tempo de sobrevivência pouco evidentes, devido essencialmente à existência de metástases subsequentes e à resistência das células tumorais residuais.

#### **10.5. Inibidores do recetor tirosina quinase - o exemplo do masitinib**

O recetor transmembranário C-kit tornou-se um alvo molecular a ser considerado no tratamento de vários tipos de tumor tais como os mastocitomas, tumores do estroma gastrointestinal e melanomas, dada a sua sobre expressão e/ou ativação nestes (AB SCIENCE USA, 2011).

O masitinib foi o primeiro fármaco contra o cancro aprovado para uso veterinário, recebendo aprovação pela *European Medicines Agency (EMA)* em 2008 com o nome de Masivet<sup>®</sup>. Esta molécula apresenta seletividade para algumas moléculas tirosina quinase implicadas em vários processos tumorais tais como KIT, PDGFR e Lyn, não inibindo outras moléculas tirosina quinase implicadas em processos de toxicidade. Este grau de especificidade do masitinib contrasta com os inibidores da tirosina quinase imatinib e toceranib, os quais inibem um grande número de quinases. Se por um lado, o grande potencial terapêutico destes últimos dois princípios ativos aumenta o potencial anti-tumoral dos mesmos, por outro lado, parecem apresentar mais efeitos secundários em termos de toxicidade.

Pelo contrário, a grande seletividade do masitinib possibilita a sua administração em altas doses por forma a obter-se um efeito terapêutico mais potente, mantendo-se um nível aceitável de tolerabilidade (AB SCIENCE USA, 2011).

Assim, o Masitinib apresenta-se como um inibidor da proteína tirosina-quinase que, *in vitro*, inibe de modo potente e seletivo a forma mutada do recetor c-kit, na região justamembranar (JM). Inibe igualmente o recetor do fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF) e o recetor do fator de crescimento dos fibroblastos (FGFR3).

A sua utilização está indicada no tratamento de mastocitomas caninos não extirpáveis (grau II ou III) com mutação confirmada do recetor tirosina quinase - C-kit. Atualmente, a sua utilização *off-label* revelou a existência de casos clínicos interessantes que são alvo de estudo. Estes casos incluem a utilização do masitinib na manutenção da quimioterapia em cães com linfoma multicêntrico das células T e no tratamento de um caso de neurofibrossarcoma em cão (AB SCIENCE USA, 2011).

No que toca à sua utilização no tratamento dos melanomas, têm sido referidos vários casos de sucesso, nomeadamente no aumento do tempo de sobrevivência em cães com melanoma metastático, quando submetidos ao masitinib em relação à remoção cirúrgica dos tumores. Num caso, o cão apresentava um diagnóstico histológico de melanoma metastático não responsivo à quimioterapia. Após a introdução do masitinib, o cão começou a responder à terapêutica, alcançando uma resposta ao tratamento total ao fim de dois meses de tratamento. O paciente esteve vivo pelo menos quatro meses após início da recessão tumoral, até se perder no *follow up* (AB SCIENCE USA, 2011). Estes resultados demonstram que o masitinib pode representar uma opção terapêutica para cães com melanoma.

Em gatos, foi descrito um caso de metastização de um melanoma cutâneo. O tumor primário foi removido cirurgicamente e o gato foi submetido à terapêutica com masitinib diariamente, verificando-se uma resposta completa depois de seis meses de tratamento, sem apresentar sinais de recidiva catorze meses após início do tratamento (AB SCIENCE USA, 2011).

Num caso dum melanoma metastático de cão não responsivo à quimioterapia, a junção do masitinib à terapêutica médica deu origem à remissão total do tumor. A experimentação *in vitro* tem demonstrado também, o efeito do masitinib no aumento da sensibilidade do melanoma a determinados quimioterápicos como a doxorubicina (Ogilvie & Ahn, 2010).

### **10.6.Tratamentos cirúrgicos**

Estão descritos vários tratamentos cirúrgicos no controlo deste tipo de neoplasias. Entre eles destacam-se a iridectomia parcial, a ablação tumoral a laser, a evisceração com colocação de prótese intraescleral e a enucleação. Como já foi referido, muitas vezes, é difícil fazer a distinção do tipo e gravidade do tumor em questão durante o ato da consulta. Assim, a prática clínica dos oftalmologistas diz-nos que a maioria dos animais é aconselhada a realizar imediatamente cirurgia, sendo a técnica da enucleação o tratamento cirúrgico mais recomendando por prevenção, pois apesar de ser um procedimento mais invasivo, possibilita a extirpação de uma maior margem adjacente à área tumoral (Collins & Moore, 1999).

### **10.7.Radioterapia**

Em medicina humana, no que se refere aos tratamentos dos melanomas intraoculares primários, as técnicas mais invasivas como a enucleação têm vindo a ser substituídas por outras mais conservativas como a radioterapia. A braquiterapia episcleral é a terapêutica de radiação mais utilizada no tratamento do melanoma intraocular humano. Esta técnica é caracterizada pela utilização de pequenas placas contendo pequenos focos de isótopos radioativos tais como: iodo-125 ( $^{125}\text{I}$ ), cobalto-60 ( $^{60}\text{Co}$ ), paládio-103 ( $^{103}\text{Pd}$ ), irídio-192 ( $^{192}\text{Ir}$ ) e rutênio-106 ( $^{106}\text{Ru}$ ). Esta técnica, apesar de preservar o globo ocular, não está isenta de efeitos secundários, sendo que é frequente ocorrer diminuição da acuidade visual com o passar do tempo.

Estudos em medicina humana demonstram que após resseção completa dos melanomas metastáticos, a aplicação da radioterapia diminui em cerca de 48% dos casos a primeira recidiva do tumor a nível ganglionar, em comparação com a observação apenas da evolução clínica do doente. Contudo, não se observam diferenças significativas entre a sobrevida global do doente e a sobrevida sem recidivas do mesmo (Kirkwood & Sosman, 2013).

### **III - Neoplasias de origem melanocítica da úvea do cão e do gato: Estudo comparativo das características clínicas e imunohistoquímicas por imunomarcção para Ki-67, Melan-A e CD117**

#### **1. Objetivos**

O presente trabalho pretende estudar a diferente apresentação clínica e histopatológica dos tumores de origem melanocítica da úvea no cão e no gato, mais especificamente o melanoma de uma e de outra espécie, dado serem entre os tumores intraoculares de origem melanocítica, os que apresentam pior prognóstico.

Para a análise histopatológica dos tumores melanocíticos oculares de cão e de gato, pretende-se realizar estudos com recurso à técnica imunohistoquímica por imunomarcção para os marcadores Ki67, Melan-A e CD117.

Após a realização da técnica imunohistoquímica tentar-se-á descrever as características imunohistoquímicas dos tumores intraoculares melanocíticos considerados no estudo e concluir se a imunomarcção das neoplasias de origem melanocítica da úvea do cão e do gato apresentam resultados diferentes.

Finalmente, estudaremos as informações que a imunomarcção destes tumores nos pode dar em termos de comportamento, prognóstico e orientação terapêutica dos mesmos.

## **2. Materiais e métodos**

### **2.1. Amostra em estudo**

No presente estudo foram incluídos vinte casos de tumores oculares melanocíticos, dezoito dos quais com base na coleção de tumores do Laboratório de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa (LAP-FMV-UL) e os restantes dois casos do Laboratório de Patologia Veterinária – VetPat, ocorridos no período compreendido entre 2001-2012, juntamente com as respetivas histórias clínicas.

Destes vinte casos, dez correspondiam a tumores oculares melanocíticos de cão e dez correspondiam a tumores oculares melanocíticos de gato.

Todos estes casos foram recebidos de clínicas e hospitais veterinários da Região de Lisboa e Vale do Tejo, incluindo-se o Hospital Escolar da FMV-UL com dez dos casos enviados. A técnica de imunohistoquímica foi realizada na sua totalidade no LAP-FMV.

### **2.1. Parâmetros em análise**

Foram recolhidos e registados os dados referentes a: identificação dos animais, raça, sexo, idade, sinais clínicos, diagnóstico histológico, técnica cirúrgica efetuada e resultados das técnicas de imunohistoquímica. Foram considerados vinte globos oculares (proveniente de vinte animais), a partir dos quais se realizaram os estudos de imunohistoquímica recorrendo aos marcadores Ki-67, Melan-A e CD117. Os dados obtidos com a imunomarcção de cada caso foram registados e analisados.

## **2.2. Processamento das amostras para os estudos de imunohistoquímica**

Em todos os casos, o material enviado para o laboratório correspondeu ao globo ocular afetado que foi sujeito a enucleação, sendo imediatamente fixado em formol tamponado a 10%. Após o período de fixação, que teve um tempo mínimo de 24h, o processamento e inclusão dos tecidos em parafina foi efetuado de forma automática, em processador de tecidos LEICA TP 1020<sup>®</sup> (Leica Microsystems, Nussloch, Alemanha), de acordo com o seguinte protocolo:

A – Álcool etílico 70°, durante 1 hora.

B – Álcool etílico 95°, durante 1 hora e 30 minutos.

C – Álcool etílico 95°, durante 1 hora e 30 minutos.

D – Álcool etílico absoluto, durante 1 hora.

E – Álcool etílico absoluto, durante 1 hora e 30 minutos.

F – Álcool etílico absoluto, durante 1 hora e 30 minutos.

G – Xilol, durante 1 hora.

H – Xilol, durante 1 hora.

I – Xilol, durante 1 hora.

J – Inclusão em Histosec Merck<sup>®</sup> a 65 °C, durante 2 horas.

L – Inclusão em Histosec Merck<sup>®</sup> a 65 °C, durante 2 horas.

O corte dos blocos de parafina foi realizado em micrótomo rotativo LEICA RM 2135<sup>®</sup>, tendo-se efetuado cortes com cerca de três µm de espessura para imunohistoquímica. Os cortes foram colocados em lâminas adesivadas Superfrost Plus<sup>®</sup> da Thermo Scientific.

## **2.3. Técnica de imunohistoquímica**

Todos os vinte casos foram selecionados para a realização da técnica de imunohistoquímica. As imunomarcações foram realizadas em cortes histológicos com três µm de espessura colocados em lâminas adesivadas Superfrost Plus<sup>®</sup> (Thermo Scientific, Braunschweig, Alemanha).

Os anticorpos disponíveis no mercado são, normalmente, os utilizados nos exames de rotina da espécie humana, podendo apresentar reatividade cruzada com as espécies canina e felina. Para a imunohistoquímica foram testados três anticorpos primários (Tabela 3), para os quais foi conseguida marcação positiva.

## 2.4. Anticorpos utilizados

A Tabela 3 resume as características dos anticorpos utilizados no estudo.

**Tabela 3** – Anticorpos primários utilizados para os quais foi obtida marcação positiva.

<b>Especificidade Ac. Primário</b>	<b>Origem</b>	<b>Clone</b>	<b>Referência</b>	<b>Isotipo</b>	<b>Esp. Produtoras</b>
Ki67	Novocastra <sup>TM</sup>	MM1	NCL-L-Ki67-MM1	IgG1	Rato (anti-hum.)
Melan-A	Dako	A103	M 7196	IgG1	Rato (anti-hum.)
CD117, c-kit	Dako	Policlonal	A 4502	IgG1	Rato (anti-hum.)

**Tabela 4** – Protocolo utilizado para recuperação antigénica e diluição dos anticorpos.

<b>Especificidade do Anticorpo Primário</b>	<b>Técnica de Recuperação Antigénica/Meio e Tempo</b>	<b>Meio e Tempo da Recuperação Antigénica</b>	<b>Diluição dos Anticorpos Primários</b>
Ki67	Panela de pressão	Tampão Citrado de Sódio a pH=6,0 2 minutos	1:1000
Melan-A	Microondas	Tampão EDTA a pH=9,0 5 min. 900w 15 min. 600w	1:100
CD117, c-kit	Microondas	Tampão EDTA a pH=9,0 5 min. 900w 15 min. 600w	1:400

## 2.5. Controlos positivo e negativo

Como controlo positivo interno para a marcação do Ki-67 recorreu-se a um linfonodo de cão e um linfonodo de gato.

Como controlo positivo interno para a marcação do Melan-A, foram usados um melanoma de pele de cão e um melanoma de pele de gato. Finalmente, para a marcação do CD117, como controlo positivo interno, foram utilizados um intestino de cão e um intestino de gato.

Os controlos negativos foram todos efetuados por omissão do anticorpo primário.

A determinação da diluição ótima de trabalho para cada anticorpo primário fez-se mediante ensaio inicial da técnica, testando várias diluições, seguindo-se a avaliação dos resultados e a seleção da diluição ideal, habitualmente utilizada pelo LAP-FMV.

## 2.6. Técnica de coloração imunohistoquímica

A – Executaram-se cortes de 3 µm de espessura que foram colhidos em lâminas adesivadas Superfrost Plus®.

B – Os cortes foram desparafinados em xilol durante 10 minutos.

C – Rehidratação: álcool etílico absoluto (duas vezes, durante 5 minutos).

    Álcool etílico 95° (durante 5 minutos).

    Álcool etílico 70° (durante 5 minutos).

    Água destilada (durante 15 minutos)

D – Recuperação antigénica. Procedeu-se de acordo com o descrito na Tabela 4.

E – Lavagem em PBS (por duas vezes durante 5 minutos).

F – Bloqueio de proteínas recorrendo à solução *Protein Block* do kit *Novocastra™ RE 7158* (durante 5 minutos).

G - Lavagem em PBS (por duas vezes durante 5 minutos).

H – Incubação com os anticorpos primários, em concentrações variáveis (de acordo com as especificações constantes na Tabela 4). A incubação foi feita à temperatura ambiente.

I - Lavagem em PBS (por duas vezes durante 5 minutos).

J – Realizou-se a inibição da peroxidase endógena através de incubação com a solução de bloqueio *Peroxidase Block* do kit *Novocastra™ RE 7157* (durante 5 minutos).

K - Lavagem em PBS (por duas vezes durante 5 minutos).

L – Realizou-se a incubação com a solução de bloqueio pós-primário *Post Primary Block* do kit *Novocastra™ RE 7159* (durante 30 minutos).

M - Lavagem em PBS (por duas vezes durante 5 minutos).

N – Incubação com o polímero *Novolink Polymer* do kit *Novocastra™ RE 7161* (durante 30 minutos).

O - Lavagem em PBS (por duas vezes durante 5 minutos).

P – Revelação com diaminobenzidina (DAB), durante 5 minutos, recorrendo ao kit *Novocastra™ RE 7162, RE 714*.

Q – Lavagem em água corrente durante 2 minutos.

R – Branqueamento da melanina numa solução com 0,6g de albumina bovina a 2%, 0,3g de hidrogenofosfato disódico e 0,9 ml de peróxido de hidrogénio a 3% por cada 15 ml de água, durante 48 horas.\*

S – Coloração de fundo pela Hematoxilina de Mayer do kit *Novocastra™ RE 7107*, durante 30 segundos.

T – Lavagem em água corrente durante 2 minutos (azular).

U – Desidratação dos cortes por passagens em álcool etílico com graduação crescente (inversa do ponto C).

V – Passagem por Xilol.

W – Montagem em resina sintética (Entellan®).

\*A técnica de branqueamento da melanina foi realizada apenas nas lâminas cujos cortes apresentavam muito pigmento melânico, segundo o protocolo estudado por Timóteo, Santos, Abrantes & Carvalho (2011), constante da revista *Micron* nº15 – Ano 14 – Maio de 2011.

### **2.7. Avaliação da imunomarcção do Ki-67**

Cada corte histológico foi observado primeiro com baixa ampliação, para deteção das áreas de maior marcação. Nas áreas de maior marcação foram selecionados cinco campos com ampliação de 400x. A contagem diferencial de células marcadas e não marcadas foi efetuada a partir das fotografias digitais obtidas de cada campo selecionado e recorrendo ao programa informático *Image J – Image Processing and Analysis in Java*<sup>®</sup>. Após registo em folha de cálculo do programa *Excel 2007 da Microsoft Office*<sup>®</sup> obteve-se o índice de marcação do Ki-67, que correspondeu à razão entre o número de células marcadas e não marcadas nos 5 campos selecionados.

### **2.8. Avaliação da imunomarcção do Melan-A**

Cada corte histológico foi observado inicialmente com baixa ampliação, para deteção das áreas de maior marcação, procedendo-se posteriormente à classificação dos cortes em intensidades de marcação forte, moderada, fraca e ausente.

### **2.9. Avaliação da imunomarcção do CD117**

Cada corte histológico foi observado primeiramente em baixa ampliação, para deteção das áreas de maior marcação, procedendo-se posteriormente à classificação dos cortes em intensidades de marcação forte, moderada, fraca e ausente.

### **2.10. Análise estatística**

Para o estudo da distribuição das diferentes variáveis (dados clínicos, epidemiológicos, histopatológicos e histoquímicos) utilizaram-se métodos de estatística descritiva. A reduzida dimensão da amostra não possibilitou a utilização de testes de associação entre variáveis, pelo que o estudo da relação entre algumas destas foi feito com base em métodos descritivos. O processamento dos dados foi realizado com o programa *Microsoft Office Excel. 2007*<sup>®</sup>.

### 3. Resultados

#### 3.1. Avaliação de dados clínicos e epidemiológicos em gatos

##### 3.1.1. Idade

A idade dos gatos afetados, na altura do diagnóstico, variou entre os 3 e os 14 anos, com média de 10,2 anos e mediana de 11 anos.

Não se observou uma diferença significativa de idades entre as amostras de fêmeas e machos, sendo que cada um dos grupos apresentava uma média de idades de 10,1 e 10,5 anos, respetivamente (Tabela 7).

**Tabela 5** – Média de idades da amostra de gatos consoante o sexo

<b>Sexo</b>	<b>Média</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>
Fêmea	10,1	3	14
Macho	10,5	10	11

##### 3.1.2. Sexo

Dos gatos incluídos para estudo (n=10), oito eram fêmeas (80%) e dois eram machos (20%) (Tabela 8).

**Tabela 6** – Sexo dos gatos utilizados em estudo

<b>Caso Clínico</b>	<b>Sexo</b>
G1	FC
G2	F
G3	FC
G4	FC
G5	M
G6	F
G7	F
G8	F
G9	MC
G10	F

G = gato

##### 3.1.3. Raça

Dos gatos incluídos para estudo (n=10), a raça mais representativa foi o Europeu Comum (60%), seguindo-se dois casos de raça persa (20%), um caso de cruzamento com a raça persa (10%) e um caso de cruzamento com a raça siamesa (10%) (Tabela 9).

**Tabela 7 – Raças dos gatos utilizados em estudo**

<b>Caso Clínico</b>	<b>Raça</b>
G1	EC
G2	EC
G3	X Persa
G4	Persa
G5	EC
G6	EC
G7	EC
G8	X Siamês
G9	Persa
G10	EC

G = gato

### **3.2. Avaliação de dados clínicos e epidemiológicos em cães**

#### **3.2.1. Idade**

A idade dos cães afetados, na altura do diagnóstico, variou entre os 3 e os 12 anos, com média de 8,9 anos e mediana de 10,5 anos.

#### **3.2.2. Sexo**

Dos cães incluídos para o estudo (n=10), seis eram fêmeas (60%) e quatro eram machos (40%) (Tabela 6)

**Tabela 8 – Sexo dos cães utilizados em estudo**

<b>Caso Clínico</b>	<b>Sexo</b>
C1	F
C2	F
C3	M
C4	F
C5	M
C6	M
C7	M
C8	F
C9	F
C10	FC

C = cão

#### **3.2.3. Raça**

Dos cães incluídos para estudo (n=10), a raça mais representativa foi o Retriever do Labrador (30%), seguindo-se dois casos da raça Cocker Spaniel (20%), um caso da raça Pastor Belga (10%), um caso da raça Yorkshire Terrier (10%), um caso da raça Caniche (10%) um caso da raça Schnauzer miniatura (10%) (Tabela 7).

**Tabela 9** – Raças dos cães incluídos em estudo

<b>Nome</b>	<b>Raça</b>
C1	Labrador
C2	Cocker Spaniel
C3	Labrador
C4	Pastor Belga
C5	Yorkshire Terrier
C6	Caniche
C7	Schnauzer Miniatura
C8	Pitt Bull
C9	Labrador
C10	Cocker Spaniel

C = cão

**3.3. Sinais clínicos observados na amostra de gatos e cães**

Os sinais e restante informação clínica foram obtidos durante a consulta externa do Hospital Escolar da FMV, no caso dos animais observados na faculdade ou através do resumo clínico que acompanhava as amostras enviadas para o laboratório de Anatomia Patológica, no caso dos animais observados noutras clínicas. Contudo, não foi possível obter o resumo clínico da totalidade dos casos clínicos.

**Tabela 10** – Sinais clínicos na amostra de gatos

<b>Nome</b>	<b>Sinais clínicos</b>
G1	Massa rosa de superfície lisa com neovasos no canto lateral na câmara anterior
G2	---
G3	---
G4	---
G5	Glaucoma; dor ocular; espessamento e hiperpigmentação da íris; queratite
G6	Hiperpigmentação difusa da íris
G7	OE buftálmico, ulcerado, aspeto tumoral
G8	OD com nódulos na câmara anterior ao nível da íris; uveíte; glaucoma
G9	Hiperpigmentação difusa da íris, espessamento difuso da íris com formação de nódulos, olho buftálmico com luxação posterior do cristalino.
G10	Uveíte que progrediu para glaucoma

G = gato

**Tabela 11** – Sinais clínicos na amostra de cães

Nome	Sinais clínicos
C1	---
C2	---
C3	Uveíte com glaucoma secundário; suspeita de endoftalmite
C4	Massa intraocular
C5	OE cego; Ectasia da esclera; íris <i>bombé</i> ; massa intraocular de cor preta atingindo o exterior do GO.
C6	OD com massa pigmentada de 12x6 mm aproximadamente aderente ao limbo esclero corneano externamente, às 11h
C7	Massa intraocular
C8	Massa pigmentada da íris ocupando metade da câmara anterior; glaucoma; dor ocular
C9	Massa pigmentada alterando o formato do GO esquerdo das 10h-14h; distorção da esclera
C10	Massa intraocular no OD; apenas visível o canto medial da íris; glaucoma;

C = cão

### 3.4. Tratamento

O tratamento efetuado em todos os animais presentes neste estudo foi a enucleação do globo ocular afetado, enviado posteriormente para análise histopatológica.

### 3.5. Diagnóstico histológico

#### 3.5.1. Composição da amostra da espécie felina

##### 3.5.1.1. Melanoma difuso da íris

Dentro desta classificação, foram identificados dez casos recebidos de origem felina, sendo a única forma de doença na amostra estudada, perfazendo 100% dos casos (Tabela 5).

**Tabela 12** – Composição da amostra da espécie felina.

<b>Tipo</b>	<b>Nº de casos</b>	<b>%</b>
Melanoma difuso da íris	10	100
<b>Total</b>	<b>10</b>	<b>100</b>

### 3.5.2. Composição da amostra da espécie canina

Do número de casos da amostra da espécie canina, foram identificados dois casos (20%) de melanocitoma da úvea anterior, um caso (10%) de melanocitoma da coróide, seis casos (60%) de melanoma da úvea e um caso (10%) de melanoma do limbo esclero-corneano.

**Tabela 13** – Composição da amostra da espécie canina.

<b>Tipo</b>	<b>Nº de casos</b>	<b>%</b>
Melanocitoma da úvea anterior	2	20
Melanocitoma da coróide	1	10
Melanoma da úvea	6	60
Melanoma do limbo esclero-corneano	1	10
<b>Total</b>	<b>10</b>	<b>100</b>

### 3.6. Resultados da técnica de imunohistoquímica

#### 3.6.1. Resultados da imunomarcção para o Melan-A

Sete dos dez melanomas difusos da íris do gato (70%) tiveram marcação imunohistoquímica positiva para o Melan-A (Tabela 13). Seis casos (60%) apresentaram marcação positiva forte, um caso (10%) apresentou marcação positiva moderada e três casos (30%) apresentaram ausência de marcação.

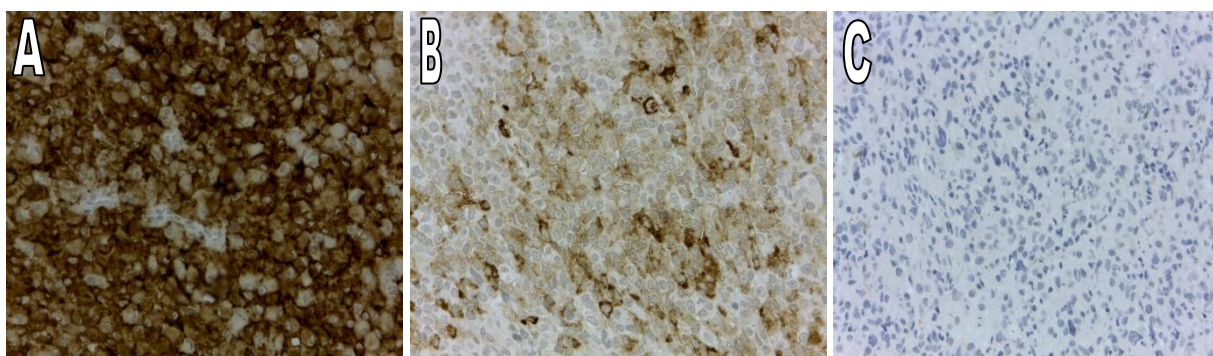
Dos dez casos de tumores melanocíticos caninos submetidos a imunomarcção para o Melan-A, todos (100%) apresentaram marcação positiva (Tabela 14). Dos dois casos de melanocitoma da úvea, um apresentou marcação positiva forte e um apresentou marcação positiva moderada. Dos seis casos de melanoma da úvea, três apresentaram marcação positiva forte e três apresentaram marcação positiva moderada. O caso do melanoma do limbo esclero-corneano apresentou marcação positiva moderada e o caso do melanocitoma da coróide apresentou marcação positiva fraca.

**Tabela 5** – Resultados da imunomarcção das dez amostras de tumores melanocíticos felinos para o Melan-A\*

C Clín.	Ano	Raça	Sexo	Idade	Diagnóstico	Origem	Melan-A
G1	2001	EC	FC	11	M. Íris	Primário	-
G2	2002	EC	F	12	M. Íris	Primário	+++
G3	2004	XPersa	FC	14	M. Íris	Primário	++
G4	2006	EC	F	12	M. Íris	Primário	-
G5	2009	Persa	FC	5	M. Íris	Primário	+++
G6	2010	EC	M	10	M. Íris	Primário	+++
G7	2010	EC	F	3	M. Íris	Primário	-
G8	2010	EC	F	13	M. Íris	Primário	+++
G9	2011	XSiamês	F	11	M. Íris	Primário	+++
G10	2011	Persa	MC	11	M. Íris	Primário	+++

G = gato

\*Intensidade de marcação: +++ = marcação forte; ++ = marcação moderada; + = marcação fraca; - = ausência de marcação

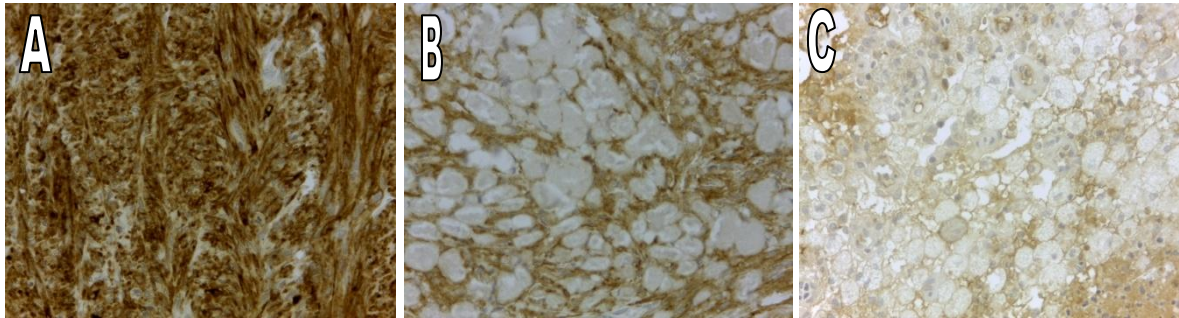


**Figura 13** – A, B, C – Padrões de intensidade de marcação do Melan-A em melanomas difusos da íris do gato. A – Intensidade de marcação forte. Ampliação de 400x; B – Intensidade de marcação moderada. Ampliação de 400x; C – Ausência de marcação. Ampliação de 100x.

**Tabela 6** – Resultados da imunomarcação das dez amostras de tumores melanocíticos caninos para o Melan-A\*

C Clín.	Ano	Raça	Sexo	Idade	Diagnóstico	Origem	Melan-A
C1	2004	Labrador	F	3	Melanocitoma da úvea	Primário	+++
C2	2004	Cocker Spaniel	F	12	Melanoma da úvea	Primário	++
C3	2005	Labrador	M	9	Melanocitoma da coróide	Primário	+
C4	2006	Pastor Belga	F	12	Melanoma da úvea	Primário	++
C5	2006	Yorkshire terrier	M	11	Melanoma da úvea	Primário	+++
C6	2007	Caniche	M	5	Melanoma do limbo EC.	Primário	++
C7	2008	Schnauzer miniatura	M	10	Melanoma da úvea	Primário	+++
C8	2012	Pitt Bull	F	11	Melanoma da úvea	Primário	+++
C9	2012	Labrador	F	5	Melanoma da úvea	Primário	++
C10	2012	Cocker Spaniel	FC	11	Melanocitoma da úvea	Primário	++

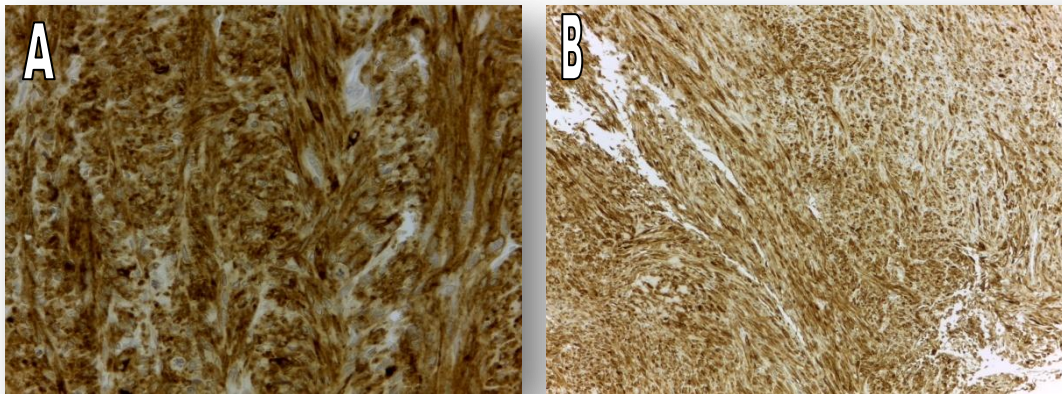
C = cão



**Figura 14** – A, B, C – Padrões de intensidade de marcação do Melan-A em melanomas da úvea do cão. A – Intensidade de marcação forte; B – Intensidade de marcação moderada; C – Intensidade de marcação fraca. Ampliação de 400x.

O caso clínico 495/2008, correspondente a um cão de raça Schnauzer miniatura apresentou metastização a nível da próstata, três anos após diagnóstico de melanoma uveal anterior. O diagnóstico de metastização foi confirmado pela observação histopatológica recorrendo à coloração pela HE e à imunomarcação para Melan-A no decorrer do presente estudo.

Quer o melanoma uveal anterior, quer o melanoma metastático obtiveram marcação positiva para o Melan-A de intensidade forte.



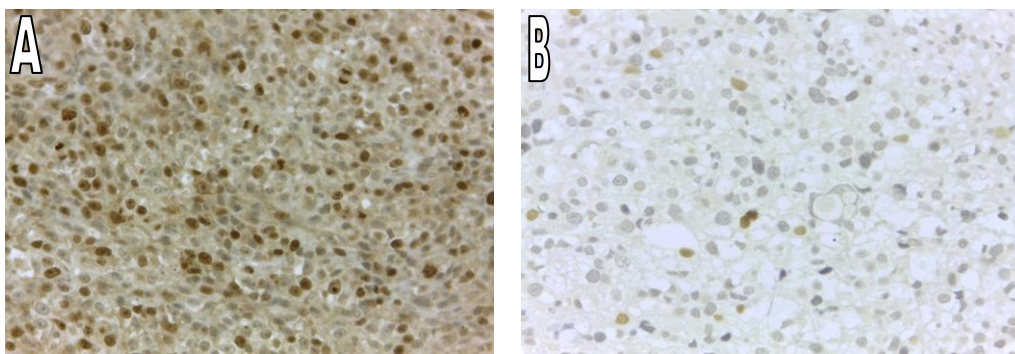
**Figura 15** – A: Marcação para o Melan-A de intensidade forte em melanoma da úvea anterior em cão de raça Schnauzer miniatura, 10 anos. Ampliação de 400x. B: Marcação para o Melan-A de intensidade forte em melanoma metastático (próstata) em cão de raça Schnauzer miniatura, 12 anos. Ampliação de 100x.

### 3.6.2. Resultados da imunomarcção para o Ki-67

**Tabela 7** – Resultados da imunomarcção das dez amostras de tumores melanocíticos felinos para o Ki-67 (índice de proliferação - IP)

C Clín.	Ano	Raça	Sexo	Idade	Diagnóstico	Origem	Ki-67 IP
G1	2001	EC	FC	11	M. Íris	Primário	9,2
G2	2002	EC	F	12	M. Íris	Primário	-
G3	2004	XPersa	FC	14	M. Íris	Primário	39,8
G4	2006	EC	F	12	M. Íris	Primário	28,4
G5	2009	Persa	FC	5	M. Íris	Primário	10,8
G6	2010	EC	M	10	M. Íris	Primário	6
G7	2010	EC	F	3	M. Íris	Primário	0,9
G8	2010	EC	F	13	M. Íris	Primário	17,3
G9	2011	XSiamês	F	11	M. Íris	Primário	7,5
G10	2011	Persa	MC	11	M. Íris	Primário	9,8

G = gato

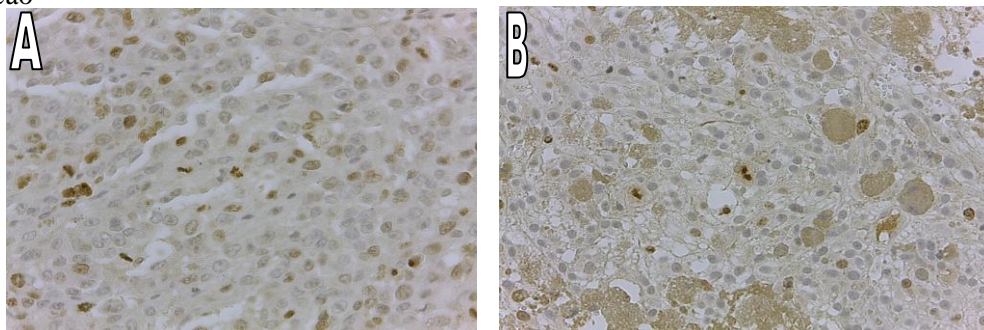


**Figura 16** – (A, B) Índices de proliferação em imunomarcção para Ki-67 em melanomas difusos da íris de gato. A: melanoma difuso da íris em gata de raça xPersa, 14 anos, IP pelo Ki-67 (39,8). B: melanoma difuso da íris de gato de raça EC, 10 anos, IP pelo Ki-67 (6).

**Tabela 8** – Resultados da imunomarcção das dez amostras de tumores melanocíticos caninos para o Ki-67 (índice de proliferação - IP)

C Clín.	Ano	Raça	Sexo	Idade	Diagnóstico	Origem	Ki-67 IP
C1	2004	Labrador	F	3	Melanocitoma da úvea	Primário	27,9
C2	2004	Cocker Spaniel	F	12	Melanoma da úvea	Primário	26,4
C3	2005	Labrador	M	9	Melanocitoma da coróide	Primário	24,6
C4	2006	Pastor Belga	F	12	Melanoma da úvea	Primário	7,1
C5	2006	Yorkshire terrier	M	11	Melanoma da úvea	Primário	24,3
C6	2007	Caniche	M	5	Melanoma do limbo EC.	Primário	3,5
C7	2008	Schnauzer miniatura	M	10	Melanoma da úvea	Primário	18,9
C8	2012	Pitt Bull	F	11	Melanoma da úvea	Primário	8,3
C9	2012	Labrador	F	5	Melanoma da úvea	Primário	16
C10	2012	Cocker Spaniel	FC	11	Melanocitoma da úvea	Primário	9,6

C = cão



**Figura 17** – (A, B) Índices de proliferação em imunomarcção para Ki-67 em melanomas da úvea de cão. A: melanoma da úvea em cadela de raça Cocker Spaniel, 12 anos, IP pelo Ki-67 (26,4). B: melanoma da úvea em cadela de raça Pastor Belga, 12 anos, IP pelo Ki-67 (7,1).

### 3.6.3. Resultados da imunomarcção para o CD117

Apenas cinco dos dez casos de melanoma difuso da íris do gato (50%) tiveram marcação imunohistoquímica positiva para o CD117 (Tabela 18). Três casos apresentaram marcação positiva de intensidade moderada e 2 casos apresentaram marcação positiva de intensidade fraca.

**Tabela 9** – Resultados da imunomarcção das dez amostras de tumores melanocíticos felinos para o CD117 (C-kit)

C Clín.	Ano	Raça	Sexo	Idade	Diagnóstico	Origem	CD117
G1	2001	EC	FC	11	M. Íris	Primário	-
G2	2002	EC	F	12	M. Íris	Primário	-
G3	2004	XPersa	FC	14	M. Íris	Primário	-
G4	2006	EC	F	12	M. Íris	Primário	-
G5	2009	Persa	FC	5	M. Íris	Primário	-
G6	2010	EC	M	10	M. Íris	Primário	++
G7	2010	EC	F	3	M. Íris	Primário	+
G8	2010	EC	F	13	M. Íris	Primário	++
G9	2011	XSiamês	F	11	M. Íris	Primário	++
G10	2011	Persa	MC	11	M. Íris	Primário	+

G = gato

\*Intensidade de marcação: +++ = marcação forte; ++ = marcação moderada; + = marcação fraca; - = ausência de marcação

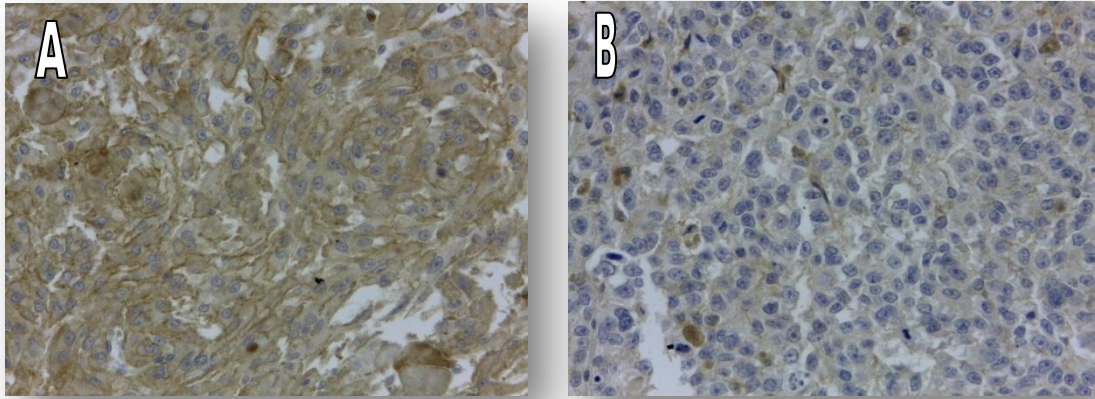
Dos dez casos de tumores melanocíticos caninos submetidos a imunomarcagem para o CD117, todos (100%) apresentaram marcação positiva (Tabela 19). Quatro dos casos (três melanomas e um melanocitoma da úvea) apresentaram marcação positiva de fraca intensidade. Cinco dos casos (dois melanomas da úvea, um melanocitoma da úvea, um melanoma do limbo esclerocorneano e um melanocitoma da coróide) apresentaram marcação positiva de intensidade moderada. Finalmente, apenas um caso, correspondendo a um melanoma da úvea, apresentou marcação positiva de intensidade forte.

**Tabela 10** – Resultados da imunomarcagem das dez amostras de tumores melanocíticos caninos para o CD117 (C-kit)

C Clín.	Ano	Raça	Sexo	Idade	Diagnóstico	Origem	CD117
C1	2004	Labrador	F	3	Melanocitoma da úvea	Primário	++
C2	2004	Cocker Spaniel	F	12	Melanoma da úvea	Primário	+
C3	2005	Labrador	M	9	Melanocitoma da coróide	Primário	++
C4	2006	Pastor Belga	F	12	Melanoma da úvea	Primário	++
C5	2006	Yorkshire terrier	M	11	Melanoma da úvea	Primário	+++
C6	2007	Caniche	M	5	Melanoma do limbo EC.	Primário	++
C7	2008	Schnauzer miniatura	M	10	Melanoma da úvea	Primário	+
C8	2012	Pitt Bull	F	11	Melanoma da úvea	Primário	+
C9	2012	Labrador	F	5	Melanoma da úvea	Primário	++
C10	2012	Cocker Spaniel	FC	11	Melanocitoma da úvea	Primário	+

C = cão

\*Intensidade de marcação: +++ = marcação forte; ++ = marcação moderada; + = marcação fraca; - = ausência de marcação



**Figura 18** – (A, B) Padrões de intensidade de marcação do CD117 em melanomas da úvea do cão. A – Intensidade de marcação moderada; B – Intensidade de marcação fraca. Ampliação de 400x.

#### **4. Discussão**

Até ao presente não existe uma técnica única de diagnóstico capaz de fazer a diferenciação entre um tumor de origem melanocítica maligno e benigno e que possa prever um tempo de sobrevivência. Ao mesmo tempo, não existe um consenso universal sobre os critérios de elaboração de um prognóstico deste tipo de neoplasias, pelo que, sem um correto prognóstico, é difícil fazer uma boa abordagem terapêutica para cada caso (Smith et al., 2002).

Um estudo de 2011 em tumores melânicos caninos (pele, dígito, lábio e cavidade oral) levado a cabo por R.C. Smedley et al. (2011) determinou parâmetros de prognóstico para este tipo de tumores cuja significância estatística tem vindo a ser demonstrada. Os tumores melânicos intraoculares não foram considerados devido à falta de casuística. A pouca bibliografia existente sobre este tipo de tumores no cão e no gato é acompanhada por uma falta de conhecimento sobre as características imunohistoquímicas dos mesmos.

Os tumores melânicos da úvea, apesar de ocorrerem com pouca frequência na prática clínica nos nossos animais de companhia, correspondem ao principal tipo de tumores com sede intraocular (Dubielzig, 2011). Assim, merecem a maior atenção por parte dos donos e dos médicos veterinários assistentes dado o seu caráter potencialmente agressivo e de prognóstico reservado.

Sabe-se que a apresentação clínica deste tipo de tumores pode variar e que as técnicas de rotina de histopatologia nem sempre nos dão um diagnóstico 100% assertivo no que toca à sua origem, características e comportamento. Nem sempre é fácil prever a velocidade de progressão do tumor e a que estratégias terapêuticas recorrer.

Assim, com a presente monografia, esperamos dar um pequeno passo no conhecimento das características clínicas e imunohistoquímicas dos tumores melanocíticos da úvea do cão e do gato. Ao mesmo tempo, tentar-se-á perceber se algum dos imunomarcadores utilizados neste estudo pode ser usado como fator de prognóstico e alvo terapêutico.

## **4.1. Discussão dos resultados clínicos**

### **4.1.1. Discussão das características clínicas e epidemiológicas da amostra de gatos e cães**

Até ao momento, não existe uma técnica única de diagnóstico capaz de fazer a diferenciação entre um tumor de origem melanocítica maligno e benigno e que possa prever um tempo de sobrevivência. Ao mesmo tempo, não existe um consenso universal sobre os critérios de elaboração de um prognóstico deste tipo de neoplasias. Sem um prognóstico correto, é difícil fazer uma boa abordagem terapêutica destes casos (Smith et al., 2002).

Os melanomas intraoculares têm sido classificados de acordo com as suas características histopatológicas.

Os tumores melânicos da úvea, apesar de ocorrerem com pouca frequência na prática clínica nos nossos animais de companhia, correspondem ao principal tipo de tumores com sede intraocular (Dubielzig, 2011). Assim, merecem a maior atenção por parte dos donos e dos médicos veterinários assistentes dado o seu caráter potencialmente agressivo e de prognóstico reservado. Ao mesmo tempo é necessário reconhecer as diferenças das características epidemiológicas, clínicas e laboratoriais deste tipo de tumores quer no cão quer no gato, dado a apresentação clínica, comportamento e prognóstico serem diferentes (Finn, Krohne & Stiles, 2008). Como foi referido na presente monografia, a taxa de metastização do melanoma uveal felino é superior ao canino e a apresentação do mesmo corresponde a uma hiperpigmentação difusa do estroma irídico ao contrário do que acontece na maioria dos casos no cão, cujos melanomas uveais apresentam-se normalmente como massas singulares pigmentadas ocupando grande parte da câmara anterior.

No presente trabalho, relativamente aos casos de melanoma intraocular na espécie felina, verificou-se que a totalidade da amostra (n=10) apresentou um diagnóstico de melanoma difuso da íris, o que está de acordo com Dubielzig et al. (2010), que refere que é uma das apresentações mais frequentes deste tipo de tumores na espécie felina. A média de idades dos gatos da amostra foi de 10,2 anos, o que coincide com o descrito na bibliografia (Dubielzig et al, 2011).

Ao nível da predisposição sexual, 80% da amostra foi constituída por fêmeas e 20% por machos, contrastando com os dados de Dubielzig et al. (2010), que refere que o grupo dos machos castrados, seguindo-se do grupo das fêmeas esterilizadas são os mais afetados.

Este facto contrastante pode justificar-se pela pequena amostra de casos em estudo.

A raça Europeu Comum foi a mais registada, seguida da raça Persa, o que provavelmente se deve, à sua representação na região de Lisboa e Vale do Tejo. A raça Persa é predisposta para as neoplasias melanocíticas oculares (Dubielzig, 2011).

Relativamente aos casos de tumores melanocíticos da espécie canina do presente estudo, verificou-se que 60% (n=6) apresentaram diagnóstico de melanoma da úvea, 10% (n=1) de melanocitoma da coróide, 10% (n=1) de melanoma do limbo esclero-corneano e 20% (n=2) de melanocitoma da úvea, apesar deste último ser o tumor primário intraocular mais comum nesta espécie (WHO, 2002). O facto de não ter sido a neoplasia mais frequente na amostra, pode dever-se ao limitado número de casos da amostra de cães em estudo. Ao mesmo tempo deve referir-se que de acordo com a bibliografia (WHO, 2002), o melanocitoma do limbo esclero-corneano é um tumor benigno mas, curiosamente, indistinguível em termos histológicos do melanoma da úvea anterior do cão. Assim, pode ser provável que o melanoma do limbo esclero-corneano da amostra do presente estudo, não seja de facto um melanoma, mas sim um melanocitoma. Dois dos três casos de melanocitoma da úvea tiveram origem na úvea anterior, estando este dado de acordo com a bibliografia (Dubielzig et al., 2010), em que se refere que 94% dos casos de melanocitoma uveal canino ocorrem ao nível da úvea anterior. As raças afetadas no presente estudo por esta doença benigna (um caso em Labrador Retriever e um caso em Cocker Spaniel) também confirmam a predisposição destas raças para estes processos tumorais (Giuliano et al., 1999). Dos seis casos de melanoma da úvea na amostra canina, apenas se conseguiu garantir histologicamente a origem do processo ao nível da úvea anterior em dois dos casos. Nos outros quatro melanomas, devido à grande extensão das lesões, não se conseguiu garantir com exatidão a origem dos mesmos, embora a íris seja a hipótese mais provável, dado que, segundo Dubielzig (2002), a grande maioria dos melanomas ocorre ao nível da úvea anterior. De entre os cães em estudo afetados por esta doença, destaca-se um caso em Retriever do Labrador (n=1) como uma raça já identificada na bibliografia predisposta para este tipo de lesões tumorais. Para além do Retriever do Labrador, foram identificadas outras raças no presente estudo, sem qualquer referência anterior na bibliografia, como: Cocker Spaniel, Pastor Belga, Yorkshire Terrier, Schnauzer miniatura e Pitt Bull. A média das idades dos cães em estudo foi de 8,9 anos, estando em consonância com a média de idade de 9,2 anos indicada por Dubielzig (2011).

Ao nível da predisposição sexual, 60% (n=6) dos cães afetados eram fêmeas e 40% (n=4) eram machos, corroborando a inexistência de uma relação entre o tipo de tumor ocular e o sexo do animal, na espécie canina.

Os sinais clínicos mais comumente observados em consulta nos casos da amostra de felinos foram: espessamento e hiperpigmentação difusa da íris, uveíte e glaucoma. Os dois últimos sinais clínicos foram comuns na amostra dos cães, contudo, a apresentação morfológica do tumor nesta espécie foi, na maior parte dos casos, a de uma massa singular pigmentada ocupando grande parte da câmara anterior e não a de uma hiperpigmentação difusa. Estes sinais clínicos coincidem com os descritos na bibliografia (Collins & Moore, 1999) (Dubielzig et al., 2010).

## **4.2. Discussão dos resultados da imunohistoquímica**

### **4.2.1. Discussão dos resultados da imunomarcação para o Melan-A**

Sete dos dez melanomas difusos da íris do gato (70%) tiveram marcação imunohistoquímica positiva para o Melan-A. Os outros três casos não apresentaram marcação. Este facto pode ser justificado por algum erro de processamento das amostras, nomeadamente uma sobrefixação, aumentando o número de reações cruzadas (inespecíficas). Este fenómeno provoca uma alteração profunda na conformação das macromoléculas dificultando ou até mesmo impedindo o reconhecimento de determinados antigénios pelos seus anticorpos específicos (Ramos-Vara, 2005).

Dos sete casos de felinos que marcaram positivamente o Melan-A, seis apresentaram marcação de intensidade forte. Este facto indica que a marcação do Melan-A é uma ferramenta importante no diagnóstico deste tipo de neoplasias no gato, assim como já o é considerado no diagnóstico de neoplasias de origem melanocítica noutras localizações anatómicas nesta mesma espécie (Ramos-Vara et al., 2002).

Dos seis casos de melanoma da úvea na espécie canina, três apresentaram marcação de intensidade forte e três de intensidade moderada. Desta forma, a marcação imunohistoquímica do Melan-A também se apresenta como uma ferramenta importante na confirmação do diagnóstico deste tipo de neoplasias a nível intraocular no cão, assim como já o é noutras localizações anatómicas (Sevastre et al., 2012).

O caso clínico 495/2008, correspondente a um cão de raça Schnauzer miniatura apresentou metastização a nível da próstata, três anos após diagnóstico de melanoma uveal anterior. O diagnóstico de metastização foi confirmado pela observação histopatológica recorrendo a HE e pela imunomarcação pelo Melan-A no decorrer do presente estudo.

A marcação do melanoma metastático pelo Melan-A apresentou intensidade forte, o que o torna o imunomarcador de eleição para a confirmação de melanomas metastáticos. Apesar de

não ter tido acesso ao *follow up* da maioria dos restantes casos e dessa forma não poder executar um prognóstico com base nos resultados de imunohistoquímica, os resultados obtidos neste caso clínico poderiam sugerir que uma marcação de intensidade forte para o Melan-A, pudesse corresponder a um prognóstico reservado. Contudo, nalguns estudos, como por exemplo o de Koenig et al. (2001), a marcação de alguns melanomas pelo Melan-A apresentou-se fraca a moderada, o mesmo não acontecendo com os de origem benigna, os melanocitomas, onde essa marcação foi mais forte.

No presente estudo, dos dois melanocitomas da úvea da amostra de cães, um apresentou marcação moderada e outro, marcação forte, apresentando semelhanças nas conclusões de Koenig et al. (2001), sobre a confirmação da marcação moderada a forte em melanocitomas doutras regiões anatómicas do cão, como a pele e a cavidade oral.

#### **4.2.2. Discussão dos resultados da imunomarcação para o Ki-67**

Em relação aos resultados obtidos por imunomarcação para o Ki-67, fizemos a relação dos valores do índice de marcação obtidos de cada grupo das duas espécies animais com o valor estimado por Bergin et al. (2011), que num estudo em melanomas orais de cão, conseguiu prever um valor limiar do índice de proliferação por imunomarcação para Ki-67 de 19,5, valor a partir do qual conseguiu prever a morte ou eutanásia do animal após um ano do diagnóstico de melanoma.

Na amostra da espécie canina, quatro dos dez casos apresentaram valores de índice de proliferação superiores a 19,5. Entre estes, estão dois casos de melanoma da úvea, um melanocitoma da úvea e um melanocitoma da coróide. Apesar de à partida podermos prever, com base nestes índices de proliferação, um prognóstico mais desfavorável para os casos com índice de proliferação superior, deve sempre considerar-se outros parâmetros para a elaboração de um prognóstico o mais correto possível. Entre esses parâmetros estão a taxa de atipia nuclear, o índice mitótico e a quantificação da pigmentação das células (Bergin et al., 2011). De facto, a maioria dos casos do presente estudo em que o índice de proliferação foi superior a 19,5 apresentaram características histopatológicas de anisocitose e anisocariose acentuadas com índices mitóticos elevados (até quatro por campo em alta ampliação) e grandes quantidades de pigmento melânico.

Apesar de não haver referências bibliográficas relativas ao índice de proliferação para Ki-67, na amostra da espécie felina apenas dois casos apresentaram um valor do índice de proliferação superior a 19,5. Todos os outros casos apresentaram valores abaixo desse limiar.

Num caso não se obteve marcação. Tal como já foi referido, este facto pode ser justificado por algum erro de processamento das amostras nomeadamente uma sobrefixação. Esta situação é mais provável ocorrer nas amostras em que não se segue um protocolo standard de tempos e meios de fixação.

Desta forma, para além de ser uma ferramenta importante no diagnóstico de melanoma, a marcação para o Ki-67 constitui um método de eleição na avaliação do índice de proliferação, contrariamente à coloração pela HE, que apenas permite avaliar o índice mitótico.

#### **4.2.3. Discussão dos resultados da imunomarcação para o CD117**

Em relação à imunomarcação das amostras para o CD117 temos a considerar o seguinte: nas amostras de melanomas difusos da íris de gato, apenas cinco casos apresentaram marcação, sendo esta de intensidade moderada em três dos casos e de fraca intensidade em dois dos casos. Apesar de não haver referências bibliográficas sobre a marcação da proteína C-kit em melanomas da úvea do gato, existem estudos sobre a marcação desta proteína em melanomas humanos e caninos noutros órgãos, como a pele (Gomes et al., 2012). Segundo a maioria dessas fontes bibliográficas a marcação da expressão da proteína C-kit é de maior intensidade nos tumores melanocíticos de comportamento benigno, tais como os melanocitomas (Gomes et al., 2012), perdendo expressão com o desenvolvimento dos tumores malignos primários. Ao mesmo tempo, o mesmo estudo de Gomes et al. (2012) sugere que a perda de marcação de c-kit nos melanomas malignos poderá ser um indicador de malignidade/agressividade do tumor. Assim, dado o carácter potencialmente maligno dos melanomas difusos da íris do gato, será então de esperar uma marcação pouco expressiva a ausente da proteína CD117, tal como aconteceu no presente estudo.

Na amostra da espécie canina, todos os casos apresentaram marcação positiva para a proteína C-kit. Os três melanocitomas obtiveram marcação positiva de intensidade moderada em dois dos casos e marcação positiva de intensidade fraca num dos casos. Dos cinco melanomas da úvea, três apresentaram marcação positiva de intensidade fraca, e dois apresentaram marcação positiva de intensidade moderada. O melanoma do limbo esclero-corneano apresentou marcação positiva de intensidade moderada. Segundo o mesmo estudo de Gomes et al. (2012), seria de esperar uma intensidade maior de marcação dos tumores benignos em relação aos malignos, o que não se verificou. No nosso caso houve uma marcação tendencialmente uniforme nos tumores melanocíticos uveais do cão, independentemente do grau de malignidade. Contudo, como a amostra em estudo de melanocitomas e melanomas canina é

pequena e relativamente heterogénea, sugere-se a realização de investigações futuras por forma a aferir-se uma correta caracterização imunohistoquímica da marcação de CD117 deste tipo de neoplasias no cão. Quer na espécie felina, quer na canina, o padrão de marcação do Melan-A, CD117 e do Ki-67 foi tendencialmente idêntico. A marcação do Melan-A e CD117 apresentou um padrão essencialmente citoplasmático e o padrão da marcação do Ki-67, um padrão exclusivamente nuclear.

#### **4.3. Discussão da terapêutica**

Em relação à terapêutica de controlo tumoral, procedeu-se à enucleação em todos os casos. Tal como já foi referido, em medicina veterinária, ao contrário da medicina humana por questões estéticas, a enucleação acaba por ser o método de tratamento de eleição. Este facto pode justificar-se por inúmeras razões, algumas delas já discutidas ao longo da presente monografia: é uma técnica cirúrgica mais invasiva, acabando por se remover uma maior área adjacente ao tumor; nem sempre é fácil fazer um diagnóstico com base na observação macroscópica do tumor no ato de consulta e a realização de PAAF acarreta riscos associados como a disseminação de células neoplásicas, traumatismos e hifema; fácil acompanhamento pós-operatório por parte dos donos, apenas com a realização de consultas regulares; entre outras.

Alguma terapêutica médica adjuvante, como a vacinação com Oncept<sup>®</sup> (Merial<sup>®</sup>, Lyon, França), é já realizada com bons resultados (Liao et al, 2007), como já foi apresentado, apesar de serem necessários mais estudos sobre a sua realização em tumores melanocíticos intraoculares. A introdução de outras opções médicas adjuvantes, como os inibidores dos recetores tirosina quinase (AB SCIENCE USA, 2011), a associação cisplatina com piroxicam (Boria et al., 2004), a carboplatina (Rassnick et al., 2001), e os AINEs (Pires et al., 2010), também necessita de mais estudos no maneo terapêutico deste tipo de tumores em cão e gato.

#### **4.4. Limitações do estudo**

O reduzido tamanho da amostra impediu que se retirassem conclusões estatisticamente significativas.

Este estudo, por ser retrospectivo, apresentou ausência do *follow-up* da maioria dos casos.

A falta de seguimento clínico da maioria dos casos impediu que se fizesse um estudo mais completo do tempo de sobrevivência dos animais afetados e risco de metastização.

## 5. Conclusões e perspectivas futuras

O estudo efetuado a um grupo de vinte casos de tumores uveais melanocíticos de cão e de gato, permitiu extrair alguns dados para o auxílio no diagnóstico clínico e laboratorial e na avaliação do prognóstico, tal como indicado nos objetivos.

Foi possível concluir o seguinte:

- a) Os resultados obtidos sugerem que não existe uma predisposição das espécies felina e canina para o aparecimento de neoplasias uveais com origem nos melanócitos.
- b) Segundo a média das idades dos animais afetados, em ambas as espécies, os animais idosos parecem ser os mais predispostos ao aparecimento de neoplasias intraoculares melanocíticas.
- c) Os resultados relativos às raças caninas e felinas mais afetadas, não nos permitem elaborar conclusões acerca da predisposição dessas raças para o aparecimento de tumores intraoculares de origem melanocítica, apesar de existirem estudos anteriores sobre a predisposição de algumas raças para as neoplasias em questão. A popularidade das raças em questão pode justificar a sua elevada incidência.
- d) A apresentação do melanoma uveal felino sob a forma de uma hiperpigmentação difusa constitui uma das apresentações mais frequentes deste tipo de neoplasias desta espécie, ao contrário do cão, cuja apresentação corresponde na maior parte das vezes à existência de uma massa singular pigmentada ocupando grande parte da câmara anterior.
- e) Devido à inexistência de *follow up* na grande maioria dos casos, não se conseguiu prever o tempo de sobrevivência e a taxa de metastização após o diagnóstico do tumor ocular, apesar de a bibliografia referir que no gato, a taxa de metastização do melanoma uveal felino é maior que a taxa de metastização do melanoma uveal canino.
- f) Os resultados indicam que a úvea anterior é o local preferencial para o aparecimento de neoplasias intraoculares de origem melanocítica.
- g) Os resultados deste estudo sugerem a inexistência de relação entre o sexo do animal e o aparecimento de neoplasia uveal melanocítica. Contudo, para uma melhor avaliação dessa relação, seria necessário um estudo com um maior número de casos clínicos de cão e de gato.
- h) A técnica de imunohistoquímica com marcação para o Melan-A, Ki-67, CD117 parece ser útil na confirmação do diagnóstico histopatológico dos tumores uveais melanocíticos do cão e do gato.

- i) A marcação para o Ki-67, para além de poder confirmar o diagnóstico de neoplasia melanocítica uveal, permite fazer uma correta avaliação do índice de proliferação, contrariamente à técnica de coloração pela HE, que apenas permite avaliar o índice mitótico.
- j) A marcação para o Melan-A parece apresentar-se como uma ferramenta importante na confirmação do diagnóstico de melanomas uveais primários e na confirmação da origem dos melanomas metastáticos.
- k) Cinco dos dez casos de melanoma difuso da íris do gato (50%) tiveram marcação imunohistoquímica positiva para o CD117, enquanto que no cão todos os tumores (100%) apresentaram marcação positiva. Estes dados poderão ser importantes em termos terapêuticos, uma vez que a os inibidores do C-kit, como o masitinib, poderão constituir uma importante ferramenta na terapêutica dos tumores melanocíticos intraoculares do cão.
- l) O estudo de imunomarcadores que sejam alvos terapêuticos, como a proteína C-kit, poderá ser importante no desenvolvimento de novas opções de tratamento direcionado.
- m) O presente estudo não permitiu elaborar um prognóstico conclusivo com base nas características de imunomarcção observadas, devido à inexistência do follow up da maioria dos casos clínicos.

## IV - Bibliografia

- AB SCIENCE USA (2011). *Masitinib scientific data for veterinary medicine*. Acedido em Jun. 12, 2013, disponível em: <http://www.yumpu.com/en/document/view/6649338/masitinib-scientific-data-for-veterinary-medicine-kinavet>
- Bancroft, J. & Stevens, A. (1996). *Theory and Practice of Histological Techniques*. (4<sup>a</sup> Ed). Churchill Livingstone. Acedido em: Timóteo, A., Santos, C.C., Abrantes, R.R. & Carvalho, S.V. (2011). Aferição do branqueamento de melanina no estudo da imunomarcção em tumores melanocíticos de canídeo (*Canis familiaris*). *Micron - Revista técnica de anatomia patológica*, 15 (14), 22-26.
- Baptista, C.S., Villagrasa, M. & Marinho, A.A. (2004). Standardised B-scan and A-scan echographic evaluation of spontaneous anterior uveal melanomas in the dog [versão electrónica]. *The Veterinary Journal*, 171 (2006) 322–330. Acedido em Mai. 20, 2013, disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1090023304002473#>
- Bergin, I.L., Smedley, R.C., Esplin, D.G., Spangler, W.L. & Kiupel, M. (2011). Prognostic evaluation of Ki-67 threshold value in canine oral melanoma [versão electrónica]. *Veterinary Pathology online*, 48(1) 41-53. Acedido em Mai. 3, 2013, disponível em: <http://vet.sagepub.com/content/48/1/41.full.pdf+html>
- Bergman, P. (2012). Oral Melanoma FAQ and Melanoma Review. Acedido em Fev. 2, 2013, disponível em: <http://www.vin.com/Members/Proceedings/Proceedings.plx?CID=MEDFAQ&PID=14993&Category=1872&O=VIN#eleven>
- Borges, A. (2010). Imunocitoquímica. *Licenciatura em Anatomia Patológica, Citológica e Tanatológica*. Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa – Instituto politécnico de Lisboa.
- Boria, P.A., Murry, D.J., Bennett, P.F., Glickman, N.W., Snyder, P.W., Merkel, B.L., Schlittler, D.L., Mutsaers, A.J., Thomas, R.M. & Knapp, D.W. (2004). Evaluation of cisplatin combined with piroxicam for the treatment of oral malignant melanoma and oral squamous cell carcinoma in dogs [versão electrónica]. *JAVMA*, 224(3), 388-394. Acedido em Jun. 12, 2013, disponível em: <http://avmajournals.avma.org/doi/pdf/10.2460/javma.2004.224.388>
- Brockley, L.K., Cooper, M.A. & Bennett, P.F. (2012). Malignant melanoma in 63 dogs (2001-2011): the effect of carboplatin chemotherapy on survival [versão electrónica]. *New Zealand Veterinary Journal*, 61(1), 25-31. Acedido em Jun. 12, 2013, disponível em: [http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00480169.2012.699433?url\\_ver=Z39.88-2003&rfr\\_id=ori:rid:crossref.org&rfr\\_dat=cr\\_pub%3dpubmed&#.UihaDX8\\_opo](http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00480169.2012.699433?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%3dpubmed&#.UihaDX8_opo)

- Chu, P. & Weiss, L. (2009). *Modern Immunohistochemistry*. Cambridge University Press. Acedido em Abr. 10, 2013, disponível em: [http://books.google.pt/books?id=oTIUXWHFd2cC&printsec=frontcover&hl=pt-PT&source=gbs\\_ge\\_summary\\_r&cad=0#v=onepage&q&f=false](http://books.google.pt/books?id=oTIUXWHFd2cC&printsec=frontcover&hl=pt-PT&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false)
- Collins, B.K. & Moore, C.P. (1999). Diseases and surgery of the canine anterior uvea. In Gellat, K.N., *Veterinary ophthalmology*. (pp. 755-792). USA: Lippincott Williams & Wilkins
- Cullen, C.L., Haines, D.M., Jackson, M.L., Grahn, B.H. (2002). Lack of detection of feline leukemia and feline sarcoma viruses in diffuse iris melanoma of cats by immunohistochemistry and polymerase chain reaction [versão electrónica]. *Journal of veterinary diagnostic investigation*, 14, 340-343. Acedido em Nov. 28, 2012, disponível em: <http://vdi.sagepub.com/content/14/4/340.full.pdf+html>
- Dako (2002). *Polyclonal Rabbit Anti-Human CD117, c-kit*. Dinamarca.
- Delgado, E. (2010). Exame oftálmico. *Texto de apoio à disciplina de propedêutica médica*. Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade de Lisboa.
- Dubielzig, R.R., Ketring, K., McLellan, G.J. & Albert, D.M. (2010). *Veterinary ocular pathology: a comparative review*. Edinburgh: Saunders.
- Dubielzig, R.R. (2011). Ocular and periocular tumors in cats [versão electrónica]. *Proceedings of the 36th World Small Animal Veterinary Congress WSAVA, Jeju, Korea, 14-17 October, 2011*. Acedido a Jan. 2, 2013, disponível em: <http://www.ivis.org/proceedings/wsava/2011/195.pdf>
- Dubielzig, R.R. (2011). Tumors of the canine conjunctiva, eyelids, and orbit [versão electrónica]. *Proceedings of the 36th World Small Animal Veterinary Congress WSAVA, Jeju, Korea, 14-17 October, 2011*. Acedido a Nov.16, 2012, disponível em: <http://www.ivis.org/proceedings/wsava/2011/194.pdf>
- Dubielzig, R.R. (2011). Tumors of the canine globe [versão electrónica]. *Proceedings of the 36th World Small Animal Veterinary Congress WSAVA, Jeju, Korea, 14-17 October, 2011*. Acedido a Jan. 2, 2013, disponível em: <http://www.ivis.org/proceedings/wsava/2011/193.pdf>
- Dubielzig, R.R. (2002). Tumors of the eye. In D.J. Meuteu (Ed.), *Tumors in domestic animals*. (4<sup>th</sup> ed.). (pp. 744-748). Iowa, USA: Blackwell Publishing Company
- Eagle, R. C. (2012). *Eye pathology: an atlas and text*. Philadelphia. Lippincott Williams & Wilkins. Acedido em Abr. 10, 2013, disponível em: <http://books.google.pt/books?id=RViDSTiekSQC&hl=pt-PT>
- Finn, M., Krohne, S., Stiles, J. (2008). Ocular Melanocytic Neoplasia. Acedido em Abr.12, 2013, disponível em: [https://s3.amazonaws.com/assets.prod.vetlearn.com/mmah/ac/17ed00030848deb1ef3d9dde8166b7/filePV\\_30\\_01\\_19.pdf](https://s3.amazonaws.com/assets.prod.vetlearn.com/mmah/ac/17ed00030848deb1ef3d9dde8166b7/filePV_30_01_19.pdf)

- Gibson, Roberts, Severin, Steyn & Wrigley (1998). Comparison of gonioscopy and ultrasound biomicroscopy for evaluating the iridocorneal angle in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 213, 635–638. Acedido em:
- Giuliano, E. A., Chappell, R., Fischer, B. & Dubielzig, R.R. (1999). A matched observational study of canine survival with primary intraocular melanocytic neoplasia. *Veterinary Ophthalmology*, 2, 185-190.
- Gomes, J., Queiroga, F., Prada, J. & Pires, I. (2012). Study of c-kit immunoeexpression in canine cutaneous melanocytic tumors [versão electrónica]. *Melanoma Research*, 22(3), 195-201. Acedido em Jun. 22, 2013, disponível em: <http://ovidsp.tx.ovid.com/sp-3.10.0b/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=fulltext&D=ovft&AN=00008390-201206000-00003&NEWS=N&CSC=Y&CHANNEL=PubMed>
- Goulet AC, Einsphar JG, Alberts DS, Beas A, Burk C et al. (2003) Analysis of cyclooxygenase-2 (COX-2) expression during malignant melanoma progression. *Cancer Biology and Therapeutics*, 2, 713-718. (acedido em Pires, I., Garcia, A., Prada, J. & Queiroga, F.L. (2010). COX-1 and COX-2 expression in canine cutaneous, oral and ocular melanocytic tumours [versão electrónica]. *Journal of comparative pathology*, vol. 143, 142-149. Acedido em Jan. 12, 2013, disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021997510000241#>
- Grahn, B.H., Peiffer, R.L., Cullen, C.L., Haines, D.M. (2006). Classification of feline intraocular neoplasms based on morphology, histochemical staining, and immunohistochemical labeling. *Veterinary Ophthalmology*, 9, 6, 395–403.
- Grilo, A. P. C., Timóteo, A. D., Santos, C. F. C. & Abrantes, R. F. S. R. 2010. *Estudo da Imunomarcção dos Anticorpos Anti-CD117 (C-Kit), Anti-Ki-67 e Anti-PCNA em Tumores Melanocíticos de Canídeo (Canis familiaris)*. Trabalho final de licenciatura em Anatomia Patológica, Citológica e Tanatológica. Monte da Caparica: Escola Superior de Saúde Egas Moniz.
- Junqueira, L. & Carneiro, J. (2004). Histologia e Seus Métodos de Estudo. In L.C. Junqueira & José Carneiro (Eds), *Histologia Básica*. (10ª Ed.). (p. 3). Rio de Janeiro: Brasil.
- Ketring, K.L. (2003). Canine breed incidence of glaucoma and anterior uveal diseases [versão eletrónica]. In *Western Veterinary Conference 2003*. Acedido em Mar. 22, 2013, disponível em: <http://www.vin.com/Members/Proceedings/Proceedings.plx?CID=WVC2003&PID=3241&O=VIN>
- Kirkwood, J.M. & Sosman, J.A. (2013). Melanoma CCO Independent Conference Coverage of the 2013 American Society of Clinical Oncology Annual Meeting. [Microsoft ppt]. Chicago, Illinois. AMGEN & Genentech.

- Koenig, A., Wojcieszyn, J., Weeks, B.R. & Modiano, J.F. (2001). Expression of S100a, Vimentin, NSE, and Melan A/MART-1 in Seven Canine Melanoma Cell Lines and Twenty-nine Retrospective Cases of Canine Melanoma [versão electrónica]. *Veterinary Pathology online*, 38:427–435. Acedido em Jan. 16, 2013, disponível em: <http://vet.sagepub.com/content/38/4/427.full.pdf+html>
- Leica Biosystems (2013). *Mouse Monoclonal Antibody Ki67 Antigen*. Newcastle: UK
- Liao, J.C.F., Gregor, P., Wolchok, J.D., Orlandi, F., Craft, D., Leung, C., Houghton, A.N. & Bergman, P.J. (2007). Vaccination with human tyrosinase DNA induces antibody responses in dogs with advanced melanoma [versão electrónica]. *Cancer immunology. National Institute of Health*. Acedido em Jul. 2, 2013, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1976276/pdf/nihms26749.pdf>
- Mattoon & Nyland (2002). Eye. In: Nyland & Mattoon, (Eds.), *Small Animal Diagnostic Ultrasound second ed.* WB Saunders, Philadelphia, USA, pp. 305–323. Acedido em: Baptista, C.S., Villagrasa, M. & Marinho, A.A. (2004). Standardised B-scan and A-scan echographic evaluation of spontaneous anterior uveal melanomas in the dog [versão electrónica]. *The Veterinary Journal*, 171 (2006) 322–330. Acedido em Mai. 20, 2013, disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1090023304002473#>
- Mohammed, S.I., Craig, B.A., Mutsaers, A.J., Glickman, N.W. & Snyder, P.W. (2003). Effects of the cyclooxygenase inhibitor, piroxicam, in combination with chemotherapy on tumor response, apoptosis, and angiogenesis in a canine model of human invasive urinary bladder cancer. *Molecular Cancer Therapeutics*, 2, 183e188. (acedido em Pires, I., Garcia, A., Prada, J. & Queiroga, F.L. (2010). COX-1 and COX-2 expression in canine cutaneous, oral and ocular melanocytic tumours [versão electrónica]. *Journal of comparative pathology*, vol. 143, 142–149. Acedido em Jan. 12, 2013, disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021997510000241#>
- Morgan, R.V. (2008). *Veterinary Information Network*. Acedido em Mai. 28, 2013. URL: <http://www.vin.com/Members/Associate/Associate.plx?from=GetDzInfo&DiseaseId=759&id=4953438>
- National Cancer Institute (2012). *Intraocular (Uveal) Melanoma Treatment (PDQ®)*. Acedido em Abr. 27, 2013, disponível em: <http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/treatment/intraocularmelanoma/HealthProfessional/page4>
- Ogilvie, G. & Ahn, A. (2010). Masitinib – The efficacy of targeted therapy in veterinary medicine [versão electrónica]. *Veterinary cancer society newsletter summer 2010*, 34(2). Acedido em Jul. 1, 2013, disponível em: <http://www.campifarma.com/ficheiro.php?id=4>

- Pires, I., Garcia, A., Prada, J. & Queiroga, F.L. (2010). COX-1 and COX-2 expression in canine cutaneous, oral and ocular melanocytic tumours [versão electrónica]. *Journal of comparative pathology*, vol. 143, 142-149. Acedido em Jan. 12, 2013, disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021997510000241#>
- Planellas, M., Pastor, J., Torres, M., Peña, T. & Leiva, M. (2010). Unusual presentation of a metastatic uveal melanoma in a cat. *Veterinary Ophthalmology*, 13(6), 391-394.
- Ramos-Vara, J.A. (2005). Technical Aspects of Immunohistochemistry [versão electrónica]. *Veterinary Pathology Online*, 42, 405-426. Acedido em Mai. 8, 2013, disponível em: <http://vet.sagepub.com/content/42/4/405.full.pdf+html>
- Ramos-Vara, Miller, Johnson, Turnquist, Kreeger & Watson (2002). Melan A and S100 Protein Immunohistochemistry in Feline Melanomas: 48 Cases [versão electrónica]. *Veterinary Pathology Online*, 39, 127-132. Acedido em Mai. 8, 2013, disponível em: <http://vet.sagepub.com/content/39/1/127.full.pdf+html>
- Rassnick, K.M., Ruslander, D.M., Cotter, S.M., Al-Sarraf, Renee., Bruyette, D.S., Gamblin, R.M., Meleo, K.A. & Moore, A.S. (2001). Use of carboplatin for treatment of dogs with malignant melanoma: 27 cases (1989–2000) [versão electrónica]. *JAVMA*, 218(9), 1444-1448. Acedido em Jun. 23, 2013, disponível em: <http://avmajournals.avma.org/doi/pdf/10.2460/javma.2001.218.1444>
- Sevastre, B., Taulescu, M., Sarpataki, O., Bedecean, I., Stefan, A.C., Marcus, I. & Catoi, C. (2012). Immunohistochemical Identification of Canine Melanocytic Neoplasms and Prognostic Evaluation of Ki67 Expression [versão electrónica]. *Bulletin UASMV, Veterinary Medicine*, 69(1-2), 174-183. Acedido em Mai.12, 2013, disponível em: <http://journals.usamvcluj.ro/index.php/veterinary/article/view/8427/7133>
- Silva, B.R.F.D. 2013. *Neoplasias Oculares Em Cães e Gatos: Estudo Retrospectivo 2001-2012*. Tese de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade de Lisboa.
- Smedley, R.C., Spangler, W.L., Esplin, D.G., Kitchell, B.E., Bergman, P.J., Ho, H.Y., Bergin, I.L. & Kiupel, M. (2011). Prognostic Markers for Canine Melanocytic Neoplasms : A Comparative Review of the Literature and Goals for Future Investigation [versão electrónica]. *Veterinary Pathology online*, 48(1), 54-72. Acedido em Abr. 16, 2012, disponível em: <http://vet.sagepub.com/content/48/1/54.full.pdf+html>
- Smith, S. H., Goldschmidt, M. H. & McManus, P. M. (2002). A comparative review of melanocytic neoplasms [versão electrónica]. *Veterinary Pathology online*, 39:651–678. Acedido em Jan. 16, 2013, disponível em: <http://vet.sagepub.com/content/39/6/651.full.pdf+html>

- Spitler, L.E., Grossbard, M.L., Ernstoff, M.S., Silver, G., Jacobs, M., Hayes, F.A., Soong, S.J. (2000). Adjuvant Therapy of Stage III and IV Malignant Melanoma Using Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor [versão electrónica]. *Journal of clinical oncology*, vol.18, 1614-1621. Acedido em Jul. 15, 2013, disponível em: <http://jco.ascopubs.org/content/18/8/1614.full.pdf>
- Timóteo, A., Santos, C.C., Abrantes, R.R. & Carvalho, S.V. (2011). Aferição do branqueamento de melanina no estudo da imunomarcção em tumores melanocíticos de canídeo (*Canis familiaris*). *Micron - Revista técnica de anatomia patológica*, 15 (14), 22-26.
- Vical Inc. (2013). Oncept<sup>®</sup>. Acedido em Jan. 11, 2013, disponível em: <http://www.vical.com/products/cancer-immunotherapies/ONCEPT/default.aspx>
- World Health Organization (2000). *Histological Classification of Ocular and Otic tumors of domestic animals*. Washigton: WHO.
- Yervoy, guia do profissional de saúde (2011). Bristol-Myers Squibb.

## V – Anexos

**Anexo 1:** *Abstract* da comunicação a realizar no Congresso da Sociedade Europeia de Oftalmologia Veterinária (ESVO) em Bucareste, Roménia, nos dias 17 a 20 de Outubro de 2013.

### PROSTATIC METASTASIS OF A CANINE MALIGNANT UVEAL MELANOMA Esmeralda Delgado<sup>1</sup>, João X. Silva<sup>1</sup>, Hugo Pissarra<sup>1</sup>, Maria C. Peleteiro<sup>1</sup>

<sup>1</sup> CIISA, Faculdade de Medicina Veterinária-Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal

**Purpose.** This is a report of a late distant prostatic metastasis secondary to an uveal melanoma in a dog. **Methods.** An eight-year-old male Miniature Schnauzer was presented to consultation with right buphtalmia secondary to an intraocular tumour. Histopathological diagnosis after enucleation was of uveal melanoma with criteria of malignancy such as anisokariosis, destructive intraocular growth and a high mitotic index with 4 mitosis in ten 40x fields. For three years the dog remained asymptomatic and no local recurrence was observed, after which it developed urinary tract complaints. Abdominal ultrasonography showed prostate enlargement and a nodular lesion with mixed echogenicity and calcifications compatible with neoplastic disease. The other abdominal organs showed no changes. Thoracic x-rays and blood analysis were normal. Orchiectomy plus a prostate surgical biopsy were performed. **Results.** Histopathology classified the prostatic lesions as melanoma. Immunohistochemical labelling with MART-1 (Melan A) and Ki-67 were strongly positive for both uveal tumor and prostatic lesions confirming the diagnosis of metastatic melanoma. Radical prostatectomy or chemotherapy were declined by the owner. Six months later, due to worsening of the clinical condition, the animal was submitted to tomography and diagnosed with metastatic disease in the lymph nodes, right kidney and lungs being humanely euthanized. **Conclusions.** The most common metastases of uveal melanoma have been described in lungs, regional lymph nodes and liver. In retrospective studies a mitotic index in excess of 3 in ten 40X fields has been associated with a moderate risk of metastases. The invasive intraocular growth is a criteria of malignancy that is absent in melanocitomas. Although malignant ocular melanoma in dogs rarely metastasize, prognosis being only slightly guarded, in this case it metastasized to an unusual location, the prostate, and was fatal.

**Support:** Interdisciplinary Animal Health Research Centre/Foundation for Science and Technology (CIISA/FCT).

**Anexo 2:** Painele da comunicação a realizar no Congresso da Sociedade Europeia de Oftalmologia Veterinária (ESVO) em Bucareste, Roménia, nos dias 17 a 20 de Outubro de 2013.



## PROSTATIC METASTASIS OF A CANINE MALIGNANT UVEAL MELANOMA

E. Delgado<sup>1</sup>, João X. Silva<sup>1</sup>, H. Pissarra<sup>1</sup>, Maria C. Peleteiro<sup>1</sup>

<sup>(1)</sup> CIISA, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa, PORTUGAL



**Purpose:** This is a report of a late distant prostatic metastasis secondary to an uveal melanoma in a dog.

**Materials/Methods:** An eight-year-old male Miniature Schnauzer was presented to consultation with right buphtalmia secondary to an intraocular tumour (Fig. 1, 2). Histopathological diagnosis after enucleation (Fig. 3) was of uveal melanoma with criteria of malignancy such as anisokariosis, destructive intraocular growth and a high mitotic index with 4 mitosis in ten 40x fields. For three years the dog remained asymptomatic and no local recurrence was observed, after which it developed urinary tract complaints. Abdominal ultrasonography showed prostate enlargement and a nodular lesion with mixed echogenicity and calcifications compatible with neoplastic disease. The other abdominal organs showed no changes. Thoracic x-rays and blood analysis were normal. Orchiectomy plus a prostate surgical biopsy were performed.

**Results:** Histopathology classified the prostatic lesions as melanoma. Immunohistochemical labelling with MART-1 (Melan A) and Ki-67 were strongly positive for both uveal tumor and prostatic lesions confirming the diagnosis of metastatic melanoma (Fig. 4). Radical prostatectomy or chemotherapy were declined by the owner. Six months later, due to worsening of the clinical condition, the animal was submitted to tomography and diagnosed with metastatic disease in the lymph nodes, right kidney and lungs being humanely euthanized.



Fig 1 – Eight-year-old male Miniature Schnauzer presented with right buphtalmia.



Fig 2 – Right buphtalmia secondary to an intraocular tumour.



Fig 3 – Right eye enucleation and ocular neoplasia.

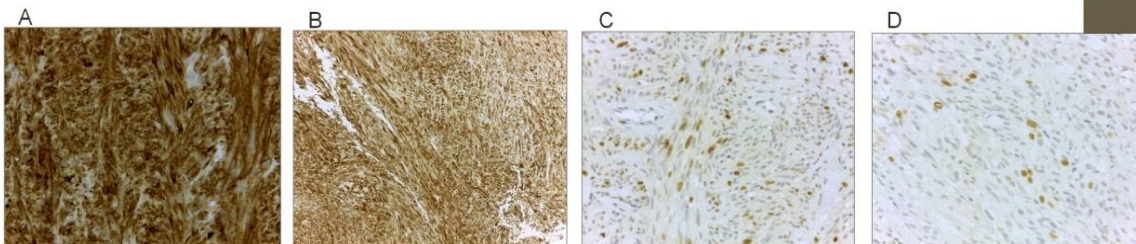


Fig 4. A - Immunohistochemical labelling with MART-1 (Melan A): Uveal melanoma with a strong positive staining (+++), x 400. B - Immunohistochemical labelling with MART-1 (Melan A): Prostatic metastatic melanoma with a strong positive staining (+++) confirming the diagnosis of metastatic melanoma, x 400. C - Immunohistochemical labelling with Ki-67: Uveal melanoma with a high score of positive cells, x 400. D - Immunohistochemical labelling with Ki-67: Prostatic metastatic melanoma with a medium score of positive cells, x 400.

**Conclusions.** The most common metastases of uveal melanoma have been described in lungs, regional lymph nodes and liver. In retrospective studies a mitotic index in excess of 3 in ten 40X fields has been associated with a moderate risk of metastases. The invasive intraocular growth is a criteria of malignancy that is absent in melanocytomas. Although malignant ocular melanoma in dogs rarely metastasize, prognosis being only slightly guarded, in this case it metastasized to an unusual location, the prostate, and was fatal. Support: Interdisciplinary Animal Health Research Centre/Foundation for Science and Technology (CIISA/FCT).

