RICARDO DE FRANCISCO STREFEZZI

INDICADORES PROGNÓSTICOS PARA MASTOCITOMAS:
ESTUDO MORFOMÉTRICO E IMUNOISTOQUÍMICO

SÃO PAULO

2007

RICARDO DE FRANCISCO STREFEZZI

INDICADORES PROGNÓSTICOS PARA MASTOCITOMAS:
ESTUDO MORFOMÉTRICO E IMUNOISTOQUÍMICO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Departamento:

Patologia

Área de concentração:

Patologia Experimental e Comparada

Orientador:

Prof. Dr. José Luiz Catão-Dias

SÃO PAULO

2007

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1887
FMVZ

Strefezzi, Ricardo De Francisco

Indicadores prognósticos para mastocitomas: estudo morfométrico e imunoistoquímico / Ricardo De Francisco Strefezzi. – São Paulo: R. F. Strefezzi, 2007.
93 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, 2007.

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.
Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Prof. Dr. José Luiz Catão-Dias.

1. Sarcoma de mastócito. 2. Morfometria. 3. Histopatologia.
4. Citologia. 5. Imunoistoquímica. I. Título.

ERRATA

Página 66, parágrafo 1, linha 1, onde se lê:

“Quando utilizado o método de escores mistos para classificação da expressão de BAX, verificou-se expressão do padrão Bax-1 (marcação fraca) em 60,7% dos tumores (17/28), sendo 35,3% de grau histopatológico I (6/17), 47,1% de grau II (8/17) e 17,6% de grau III (3/17); e Bax-2 (marcação intensa) em 39,3% dos tumores (11/28), sendo 63,7% de grau II (7/11) e 36,3% de grau III (4/11).”

Leia-se:

“Quando utilizado o método de escores mistos para classificação da expressão de BAX, verificou-se expressão do padrão Bax-1 (marcação fraca) em 38,5% dos casos (13/24), sendo 38,5% de grau histopatológico I (5/13), 58,3% de grau II (7/13) e 7,7% de grau III (1/13); e Bax-2 (marcação intensa) em 45,8% dos tumores (11/24), sendo 45,5% de grau II (5/11) e 54,5% de grau III (6/11).”

Página 66, parágrafo 1, linha 1, onde se lê:

“Não foram identificadas diferenças estatisticamente significantes entre os graus histopatológicos em relação aos escores de bax, quando analisados pelos métodos misto ou simples, através de Teste de Kruskal-Wallis ($p=0,3216$ e $p=0,4477$, respectivamente), seguido de pós-teste de Dunn entre os grupos ($p>0,05$).”

Leia-se:

“Detectaram-se diferenças estatisticamente significantes entre os graus histopatológicos em relação aos escores de bax, quando analisado pelo método misto por meio do Teste de Kruskal-Wallis ($p=0,0148$), seguido de pós-teste de Dunn entre os grupos ($p<0,05$, entre graus I e III).”

Página 66, parágrafo 2, linha 1, onde se lê:

“Dos animais que morreram em função dos mastocitomas, três animais apresentavam tumores com padrão Bax-1 (3/7, 42,8%) e 4 com padrão Bax-2 (4/7, 44,4%), quando utilizados os escores mistos.”

Leia-se:

“Todos os animais que morreram em função dos mastocitomas (7/24, 29,2%) apresentavam tumores com padrão Bax-2 sendo esta diferença estatisticamente significativa pelo teste exato de Fisher ($p=0,0010$).”

Página 67, parágrafo 1, linha 1, onde se lê:

“Quando os dois grupos foram analisados de forma independente quanto à sobrevida, a análise de Kaplan-Meier, seguida de “logrank test” não revelou diferenças estatisticamente significantes, em ambos os tipos de escores/análises ($p=0,2973$ e $p=0,7177$, respectivamente).”

Leia-se:

“Quando os dois grupos foram analisados de forma independente quanto à sobrevida, a análise de Kaplan-Meier, seguida de “logrank test”, revelou menor sobrevida para animais com tumores de padrão BAX-2 ($p=0,0009$), atingindo a mediana de sobrevida de 407 dias.

Página 67, figura 15 onde se lê:

Figura 15 - Gráficos de Curva de Sobrevida dos casos estudados em função da marcação imunoistoquímica para BAX, divididos segundo os tipos de Escores, Misto ou Simples ($p=0.2973$ e $p=0.7177$, respectivamente, logrank test). Pontos = dados censurados pela análise de Kaplan-Meier.

Leia-se:

Figura 15 - Gráficos de Curva de Sobrevida dos casos estudados em função da marcação imunoistoquímica para BAX, divididos segundo os tipos de Escores, Misto ou Simples ($p=0.0009$ e $p=0.7177$, respectivamente, logrank test). Pontos = dados censurados pela análise de Kaplan-Meier

Página 79, parágrafo 3, linha 8, onde se lê:

“Não foram identificadas associações, em ambos os tipos de escores, entre a expressão de BAX e os graus histopatológicos ($p=0,3216$ e $p=0,4477$, respectivamente), assim como com a mortalidade em função dos mastocitomas ($p=0,3564$ e $p=1,000$, respectivamente) (Tabela 11). O mesmo se repetiu para as análises de sobrevida de Kaplan-Meier ($p=0,2973$ e $p=0,7177$, respectivamente) (Figura 15).”

Leia-se:

“Foram identificadas associações entre a expressão de BAX e os graus histopatológicos ($p=0,0148$) quando utilizados os escores mistos, assim como com a mortalidade em função dos mastocitomas ($p=0,0010$). O mesmo se repetiu para a análise de sobrevida de Kaplan-Meier ($p=0,0009$).

Página 79, parágrafo 4, linha 1, onde se lê:

“Os resultados aqui apresentados sugerem, preliminarmente, que variações na detecção imunoistoquímica de BAX não estão relacionadas com maior agressividade dos mastocitomas caninos.”

Leia-se:

“Os resultados aqui apresentados sugerem, preliminarmente, que variações na detecção imunoistoquímica de BAX está relacionada com maior agressividade dos mastocitomas caninos.”

Página 84, parágrafo 5, linha 1, onde se lê:

"A detecção imunoistoquímica da proteína BAX em mastocitomas cutâneos caninos não apresentou correlação com a graduação histopatológica, o mesmo se repetindo para a mortalidade em função da doença e para a sobrevida após tratamento cirúrgico, tanto quando avaliada por métodos que levam em conta intensidade de marcação e porcentagem de células marcadas, quanto quando somente porcentagem de células positivas, independentemente da intensidade."

Leia-se:

"A detecção imunoistoquímica da proteína BAX em mastocitomas cutâneos caninos apresentou correlação com a graduação histopatológica, o mesmo se repetindo para a mortalidade em função da doença e para a sobrevida após tratamento cirúrgico, quando avaliada por métodos que levam em conta intensidade de marcação e porcentagem de células marcadas."

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Assistência Acadêmica

P A R E C E R

Interessado: Ricardo de Francisco Strefezzi

Assunto: Protocolo de experimentação adotado em experimento animal.

A Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, após analisar o projeto sob o número 744/2005, intitulado: "Indicadores prognósticos para mastocitomas: estudo morfométrico e imunoistoquímico", utilizando 20 cadáveres de cães, sob responsabilidade do Prof. Dr. José Luiz Catão Dias, constatou que o mesmo foi realizado de acordo com os princípios de bioética, adotados por esta Comissão.

São Paulo, 06 de setembro de 2005

Profª. Dra. *Júlia Maria Matêra*

Presidente da Comissão de Bioética

FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: STREFEZZI, Ricardo De Francisco

Título: Indicadores prognósticos para mastocitomas: estudo morfométrico e imunoistoquímico

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora:

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

*Aos meus pais,
esposa, filho
e amigos.*

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. José Luiz Catão Dias, amigo e orientador, pelo acompanhamento e incentivo durante toda minha vida acadêmica, e pela paciência e confiança, desde os primeiros estágios no VPT, até o desenvolvimento e conclusão desta tese.

Aos amigos José Guilherme Xavier e Silvia Regina Kleeb, pelo apoio e carinho durante estes anos de amizade e convivência acadêmica, e pela co-orientação no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Omar Miguel por seu grande exemplo de dedicação à docência, persistência, amor e luta pela vida.

À UNIBAN, na pessoa do Prof. Dr. José Alberto Pereira da Silva, por permitir e incentivar a atualização e especialização de seus professores.

À Profa. Júlia Maria Matera, do Departamento de Cirurgia da FMVZ-USP, e ao Prof. Nilton Abreu Zanco, diretor da Faculdade de Medicina Veterinária da UMESP, pela oportunidade da realização deste trabalho nos respectivos Hospitais Veterinários.

Ao Dr. L. H. Câmara Lopes, pela oportunidade de processamento imunoistoquímico das lâminas no Laboratório de Patologia Celular e Molecular do Hospital Sírio-Libanês.

Às médicas veterinárias Aline Machado, Angélica Cecília Tatarunas, Cláudia Ronca Fellizola, Patrícia Ferreira de Castro e Sandra A. Rosner, aos residentes e funcionários do Setor de Cirurgia do HOVET-USP; às médicas veterinárias Ana Paula Teixeira e Renata Achkar, do Hospital Veterinário da UNIBAN; aos médicos veterinários do Hospital Veterinário da UMESP, em especial ao colega Vinicius Carreira, pela cordialidade durante nossa convivência e auxílio na coleta de materiais e dados clínicos.

Aos amigos Cláudio Arroyo e Luciano Antas Bugalho, do Laboratório de Histopatologia do VPT, e Isaque Santana e Josiane Costa, do Laboratório de Patologia Celular e Molecular do Hospital Sirio-libanês, pela presteza e carinho na confecção das lâminas.

Aos amigos de UNIBAN pelo incentivo, em especial à querida Ana Cristina Tasaka (Pastel), e por me substituir nas aulas nos momentos de maior desespero...

Aos Profs. Drs. Fernando Ferreira, do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da FMVZ-USP, Jorge Camilo Flório, do Departamento de Patologia da FMVZ-USP, e Felícia Rocha, do IPEN-USP e UNIBAN, pelo auxílio na análise estatística.

Aos proprietários dos animais estudados pela cordialidade em fornecer informações, por vezes comoventes, sobre a evolução do quadro clínico de seus queridos companheiros.

Aos pacientes, em especial à Aleca, que com seus olhares, abanos de cauda, latidos (e até mesmo rosnados e mordidas, na tentativa de se defender!), permitiram a realização desta pesquisa, mesmo sem a opção de participarem dela ou não...

Aos funcionários da Biblioteca da FMVZ-USP, pela cordialidade e rapidez no atendimento durante a realização deste trabalho.

À FAPESP pelo suporte financeiro, processos 05/50407-3, 97/09459-7 e 96/4903-8.

12-04-1914

Mestre são plácidas
Todas as horas
Que nós perdemos,
Se no perdê-las,
Qual numa jarra,
Nós pomos flores.

Não há tristezas
Nem alegrias
Na nossa vida.
Assim saibamos,
Sábios incautos,
Não a viver,

Mas decorrê-la,
Tranqüilos, plácidos,
Tendo as crianças
Por nossas mestras,
E os olhos cheios
De Natureza...

À beira-rio,
À beira-estrada,
Conforme calha,
Sempre no mesmo
Leve descanso
De estar vivendo.

O tempo passa,
Não nos diz nada.
Envelhecemos.
Saibamos, quase
Maliciosos,
Sentir-nos ir.

Não vale a pena
Fazer um gesto.
Não se resiste
Ao deus atroz
Que os próprios filhos
Devora sempre.

Colhamos flores.
Molhemos leves
As nossas mãos
Nos rios calmos,
Para aprendermos
Calma também.

Girassóis, sempre
Fitando o sol,
Da vida iremos
Tranqüilos, tendo
Nem o remorso
De ter vivido.

Ricardo Reis
(Fernando Pessoa)

RESUMO

STREFEZZI, R. F. **Indicadores prognósticos para mastocitomas:** estudo morfométrico e imunoistoquímico. [Prognostic indicators for mast cell tumors: a morphometric and immunohistochemical study]. 2007. 93 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

Noventa e três mastocitomas cutâneos caninos, presentes em 74 animais, tiveram seus históricos clínicos investigados. Destes, 25 casos foram submetidos à análise morfométrica nuclear em lâminas de citopatologia nas colorações Panótico rápido e H&E; e 28 casos à graduação histopatológica e à imunoistoquímica para detecção das expressões de KIT, BAX, Ki-67 e PCNA, de modo a identificar os melhores indicadores prognósticos para a neoplasia. Os parâmetros citomorfométricos nucleares investigados foram: área, diâmetro-médio e perímetro. Os tumores foram classificados em graus histopatológicos I (bem diferenciados), II (de diferenciação intermediária) ou III (pobrementemente diferenciados), segundo a proposta de Patnaik, Ehler e MacEwen (1984). Os resultados obtidos através dos indicadores investigados foram comparados às graduações oferecidas pelo exame histopatológico, bem como aos tempos de sobrevida pós-cirúrgica e à mortalidade em função da doença. A citomorfometria obteve correlação com a mortalidade e o tempo de sobrevida dos animais em ambas as colorações testadas. Entre os marcadores imunoistoquímicos, as expressões de Ki-67 e BAX mostraram-se eficientes na previsão da sobrevida e mortalidade para o tumor, enquanto que as de KIT e PCNA não foram indicadores prognósticos para a neoplasia. Quanto maiores os parâmetros citomorfométricos e as porcentagens de núcleos positivos para Ki-67 e BAX, maiores as taxas de mortalidade e menores os períodos de sobrevida pós-cirúrgica. Finalmente, a graduação histopatológica foi o método que obteve os resultados mais expressivos na histopatologia, demonstrando ainda ser o método mais confiável deste painel. Nossos resultados apresentam um novo método de classificação para os mastocitomas cutâneos caninos, a partir da análise morfométrica aliada ao exame citopatológico, e confirmam que as avaliações imunoistoquímicas de Ki-67 e BAX, podem auxiliar na graduação dos mastocitomas, contribuindo com o estabelecimento de prognósticos e tratamentos mais precisos.

Palavras-chave: Sarcoma de mastócito. Morfometria. Histopatologia. Citologia. Imunoistoquímica

ABSTRACT

STREFEZZI, R. F. **Prognostic indicators for mast cell tumors:** a morphometric and immunohistochemical study. [Indicadores prognósticos para mastocitomas: estudo morfométrico e imunoistoquímico]. 2007. 93 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

Ninety-three canine cutaneous mast cell tumors, of 74 dogs, had their clinical history investigated. Among these, 25 cases were submitted to nuclear morphometric analysis on cytopathology slides stained by panoptic method and hematoxylin & eosin; and 28 cases were submitted to histopathologic grading and immunohistochemistry to evaluate KIT, BAX, Ki-67 e PCNA expressions, in order to identify the best prognostic indicators for this neoplasm. The nuclear cytomorphometric parameters used in the present study were: area, average-diameter and perimeter. The tumors were histologically classified as grades I (well differentiated), II (of intermediate differentiation) or III (poorly differentiated), as proposed by Patnaik, Ehler and MacEwen (1984). The results obtained by the indicators investigated were compared to the histopathologic grading, as well as to post-surgical survival times and mortality due to mast cell disease. Cytomorphometry was correlated with mortality and survival times in both staining methods. Among the immunohistochemical markers, Ki-67 and BAX expressions were efficient in predicting survival times and mortality due to mast cell tumors. KIT and PCNA expressions were not prognostic indicators for this tumor. The increases observed in the cytomorphometric parameters, and Ki-67 and BAX positive nuclei percentages were correlated with higher mortality rates and reduced post-surgical survival times. Finally, using the histopathologic grading system, we obtained the best results on histopathology, being this the most trustworthy method of this diagnostic panel. Our results presents a new grading system for canine cutaneous mast cell tumors, based on morphometric analysis on cytopathology slides, and confirm that immunohistochemical evaluation of Ki-67 and BAX expression may contribute to mast cell grading, leading to more accurate prognosis and treatment.

Key words: Mastocytoma. Morphometry. Histopathology. Cytology. Immunohistochemistry.

Sumário

1	INTRODUÇÃO E OBJETIVOS	13
2	REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1	O MASTÓCITO	15
2.2	OS MASTOCITOMAS CUTÂNEOS CANINOS	17
2.2.1	Incidência e Etiopatogenia	17
2.2.2	Diagnóstico Citológico	19
2.2.3	Comportamento Biológico e Metástases	20
2.2.4	Tratamento	21
2.2.5	Indicadores Prognósticos	23
2.2.5.1	Parâmetros Clínicos	24
2.2.5.2	Graduação Histopatológica	25
2.2.5.3	Índice Mitótico	27
2.2.5.4	Morfometria	28
2.2.5.5	Métodos Histo e Imunoistoquímicos	30
2.2.5.5.1	<i>Avaliação da Atividade Proliferativa</i>	30
2.2.5.5.2	<i>Oncogenes</i>	32
2.2.5.5.3	<i>Antioncogenes ou Genes Supressores de Tumores</i>	34
2.2.5.5.4	<i>Genes Reguladores da Apoptose</i>	35
3	MATERIAIS E MÉTODOS	38
3.1	ORIGEM DO MATERIAL	38
3.2	INFORMAÇÕES CLÍNICAS E EVOLUÇÃO DOS CASOS	39
3.3	PROCESSAMENTO CITOPATOLÓGICO	39
3.4	PROCESSAMENTO HISTOPATOLÓGICO	40
3.5	PROCEDIMENTOS IMUNOISTOQUÍMICOS	41
3.6	GRADUAÇÃO HISTOPATOLÓGICA	42
3.7	ANÁLISE MORFOMÉTRICA NUCLEAR	45
3.8	AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE KIT	45
3.9	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE PROLIFERATIVA: PCNA E KI-67	47
3.10	AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE BAX	48

3.11	ANÁLISE ESTATÍSTICA	50
4	RESULTADOS	51
4.1	MATERIAL OBTIDO	51
4.2	EVOLUÇÃO CLÍNICA DOS CASOS	53
4.3	ANÁLISE CITOMORFOMÉTRICA	56
4.3.1	Divisão em graus pela citomorfometria	57
4.4	GRADUAÇÃO HISTOPATOLÓGICA E MARCADORES IMUNOISTOQUÍMICOS	62
4.4.1	Expressão de KIT	64
4.4.2	Expressão de BAX	66
4.4.3	Marcadores de Proliferação Celular: PCNA e Ki-67	68
4.4.3.1	PCNA	68
4.4.3.1.1	<i>Divisão em grupos pelos escores de PCNA</i>	68
4.4.3.2	Ki-67	69
4.4.3.2.1	<i>Divisão em grupos pelos escores de Ki-67</i>	70
5	DISCUSSÃO	72
5.1	MATERIAL OBTIDO E ACOMPANHAMENTO CLÍNICO	72
5.2	INDICADORES PROGNÓSTICOS	74
5.2.1	Citomorfometria computadorizada	75
5.2.2	Indicadores Imunoistoquímicos	77
5.2.2.1	Expressão de KIT	77
5.2.2.2	Expressão de BAX	78
5.2.3.3	Marcadores de Proliferação: PCNA e Ki-67	80
5.2.3	Graduação Histopatológica de Patnaik, Ehler e MacEwen (1984)	81
5.3	CONSIDERAÇÕES FINAIS	83
6	CONCLUSÕES	84
	REFERÊNCIAS	86

1 INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

Os mastocitomas estão entre as neoplasias cutâneas mais comuns na espécie canina. Estes tumores são rotineiramente graduados quanto à malignidade baseando-se em características histomorfológicas, as quais mantêm relação com a evolução pós-cirúrgica dos casos. Tal classificação consiste no principal critério utilizado por clínicos e cirurgiões para direcionamento da terapia a ser instituída.

Apesar disso, seu comportamento biológico é bastante variável, fato que leva a freqüentes insucessos no tratamento dos pacientes. Tais falhas ocorrem, principalmente, nos casos de mastocitomas de diferenciação intermediária, como os de grau II da classificação histológica de Patnaik, Ehler e MacEwen (1984). Esta dificuldade pode ser explicada pelo fato de este subgrupo compartilhar características histomorfológicas tanto com os tumores bem diferenciados como com os anaplásicos.

O presente estudo teve como objetivos a investigação de novos indicadores prognósticos para mastocitomas cutâneos caninos, além de sua comparação a outros métodos já analisados, propondo um painel de testes para previsão do comportamento desta neoplasia de forma mais completa e precisa.

Dentre as ferramentas prognósticas já investigadas por outros autores, re-avaliemos a tradicional graduação histopatológica (PATNAIK; EHLER; MACEWEN, 1984) - até hoje não superada por nenhum outro método na previsão do comportamento desta neoplasia; marcadores imunoistoquímicos de proliferação, como o Antígeno Nuclear de Proliferação Celular – PCNA - (SIMOES; SCHONING; BUTINE, 1994; ABADIE; ARMADEILH; DELVERDIER, 1999) e o Ki-67 (ABADIE; ARMADEILH; DELVERDIER, 1999; SAKAI et al., 2002); e os padrões morfológicos de expressão do oncogene *KIT* (LONDON et al., 1999; REGUERA et al., 2000; ZEMKE; YAMINI; YUZBASIYAN-GURKAN, 2002; KIUPEL et al., 2004; WEBSTER et al., 2007).

Para complementamos a investigação relativa ao processo apoptótico, foi realizada, através de detecção imunoistoquímica, a análise da expressão do gene *BAX*, que codifica uma das principais proteínas pró-apoptóticas celulares, inédita para os mastocitomas cutâneos caninos.

Este estudo traz, também, o aperfeiçoamento e re-avaliação da técnica de morfometria nuclear computadorizada, analisando a evolução clínica de novos casos e dos já

estudados por nosso grupo anteriormente (STREFEZZI, 2001; STREFEZZI; XAVIER; CATÃO-DIAS, 2003) para sua validação ou não como indicador prognóstico para esta neoplasia.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O MASTÓCITO

Paul Ehrlich (1956 apud MACY, 1985, p. 783)¹, em 1877, ao investigar a afinidade tintorial de diversos tecidos, notou a presença de células que possuíam citoplasma repleto de um material bastante compactado. Por sua aparência “bem nutrida/alimentada”, as mesmas foram batizadas “mastzellen”, da palavra alemã “mast”, que significa comida.

O primeiro mastócito canino foi descrito por Bashford (1905 apud MACY, 1985, p. 783)². Já o termo “mastocitoma” foi utilizado pela primeira vez em 1952 por Bloom (apud MACY, 1985, p. 783)³.

Os mastócitos são células pleomórficas à avaliação histológica: fusiformes, esféricas ou estreladas. Apresentam núcleo redondo e possuem grânulos citoplasmáticos que contêm proteoglicanos ácidos, os quais se ligam aos corantes básicos. Alguns destes corantes, como os do tipo Romanowsky, assumem uma coloração diferente quando se ligam aos grânulos do que quando ao DNA nuclear, sendo então são chamados “metacromáticos”. Os grânulos são compostos de várias substâncias biologicamente ativas como histamina, enzimas proteolíticas e heparina (MARIANO, 1968; MACY, 1985; O’KEEFE, 1990; PULLEY; STANNARD, 1990; CROSS; MERCER, 1993; ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2000). Os mastócitos neoplásicos também contêm grânulos, os quais podem variar em número e conteúdo de acordo com o grau de diferenciação (O’KEEFE, 1990).

Os mastócitos podem ser encontrados em diferentes localizações como pulmões, mucosa gástrica, derme e regiões perivasculares. Sua distribuição varia de acordo com a espécie animal, aumentando em número conforme a idade. Parecem ser originários de células hematopoiéticas pluripotentes, apesar de apresentarem características funcionais, bioquímicas e morfológicas diferentes. Acredita-se que os elementos celulares progenitores

---

¹ EHRlich, P. **Beitrage zur theorie und praxis der hischen farbung hemmelweit's collected papers of Paul Ehrlich**. Elmsford, New York: Pergamon Press, 1956. v. 1, p. 65-98.

² BASHFORD, E. F.; MURRAY, J. A.; CRAMER, W. Comparison between the transmission of an effective granuloma of the dog and carcinoma of the mouse. **Sci. Rep. Cancer Res. Fd.**, n. 2, pt. 2, p. 33-37, 1905.

³ BLOOM, F. Effect of cortisone on mast cell tumors (mastocytoma) of the dog. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 79, p. 651-654, 1952.

migrem da medula óssea para os tecidos periféricos como células imaturas e, posteriormente, sofram diferenciação *in situ* (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2000).

Nos roedores, os mastócitos podem assumir dois fenótipos distintos: os “de mucosa”, no trato gastrointestinal, que possuem sulfato de condroitina como principal proteoglicano granular; e os “de tecido conjuntivo”, encontrados no tecido pulmonar e nas serosas, que contém heparina como principal proteoglicano granular, além de produzirem grandes quantidades de histamina. Também podem ser obtidos e cultivados, na presença de Interleucina-3 (IL-3), a partir da medula óssea de roedores. Estes se assemelham aos das mucosas com base nas características dos grânulos. Foi sugerido que os fenótipos de mucosa e de tecido conjuntivo não são fixos, e que podem ser possíveis mudanças bidirecionais em microambientes adequados (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2000).

No homem, os fenótipos dos mastócitos não estão tão claramente diferenciados quanto no camundongo. As principais diferenças residem na morfologia estrutural e na composição das proteases encontradas nos grânulos (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2000).

Os basófilos compartilham numerosas semelhanças com os mastócitos, tanto tintoriais quanto em componentes de grânulos. Este tipo celular também possui receptores $Fc\epsilon$ de alta afinidade ($Fc\epsilon RI$), podendo ser ativados por ligação de antígeno à IgE. Porém, deve ser considerado um tipo celular distinto, pois se diferenciam na medula óssea e circulam em sua forma madura. Como outros granulócitos, só emigram dos vasos em direção aos tecidos quando recrutados para locais de inflamação. Assim como os neutrófilos, expressam numerosas moléculas de adesão importantes à aderência ao endotélio e diapedese, como LFA-1 (CD11aCD18), Mac-1 (CD11bCD18) e CD44 (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2000; MISDORP, 2004).

A ativação dos mastócitos resulta em três tipos de respostas biológicas: (1) a desgranulação, na qual o conteúdo pré-formado de seus grânulos é liberado por exocitose; (2) a síntese de mediadores químicos derivados de membranas celulares, como os metabólitos do ácido aracdônico; e (3) a transcrição, tradução e secreção de citocinas. A desgranulação pode ser desencadeada por estímulos físicos, químicos, neurológicos e imunológicos (MACY, 1985; ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2000). As substâncias liberadas provocam vasodilatação, aumento de permeabilidade vascular, contração de células musculares lisas, secreção de muco, quimiotaxia de neutrófilos e eosinófilos, prurido, anticoagulação e destruição tecidual. São também capazes de produzir, quando ativados por

anticorpos como a IgE, leucotrienos e TNF- α . Após a desgranulação possuem membrana citoplasmática em excesso, pela fusão de membrana de grânulos (CROSS; MERCER, 1993; ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2000; MISDORP, 2004; KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005).

Foram relatados receptores de estrógeno e progesterona, localizados no citosol de mastócitos de mastocitomas caninos (MACY, 1985) e a administração de estrógenos em primatas inibiu a desgranulação de mastócitos por estímulos químicos. A avaliação da presença de receptores de estrógeno não apresentou correlação com a graduação histopatológica utilizada usualmente (LARSEN; GRIER, 1989), sugerindo não haver relação entre a presença destes e a agressividade das neoplasias. Receptores para glicocorticóides também foram encontrados no citosol de mastócitos de camundongos, o que pode ajudar a explicar respostas dramáticas à terapia com glicocorticóides em alguns casos de mastocitomas (MACY, 1985).

A proliferação de mastócitos no homem, com acúmulo em um ou mais órgãos é denominada, genericamente, mastocitose. Considerada um distúrbio hematopoiético, pode assumir diferentes formas como as mastocitoses cutânea e sistêmica. Apresentam diversos comportamentos e tipos de manifestações clínicas, compreendendo desde lesões de pele que regredem espontaneamente, até doenças sistêmicas extremamente agressivas. Diferentemente dos cães, sua incidência é baixa, podendo ser considerada rara (VALENT et al., 2001; HARTMANN et al., 2003; KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005).

2.2 OS MASTOCITOMAS CUTÂNEOS CANINOS

2.2.1 Incidência e Etiopatogenia

Os mastocitomas são os tumores de pele mais comuns em cães, representando entre 7 e 25% de todos os tumores de pele e entre 11 e 27% de todas as neoplasias malignas cutâneas. Não foi relatada predisposição sexual e sua incidência aumenta de acordo com a idade, com média em torno de 8,5 anos. As raças mais acometidas são as que possuem a Bulldog como ancestral - principalmente as Boxer, Boston Terrier e English Bulldog -, além

da Labrador, Golden Retriever e Shar Pei (HOTTENDORF; NIELSEN, 1967; BOSTOCK, 1973; PATNAIK; EHLER; MACEWEN, 1984; YAGER; SCOTT, 1993; SIMOES et al., 1994; ROGERS, 1996; GINN et al., 2000; JAFFE et al., 2000; STREFEZZI, 2001; STREFEZZI; XAVIER; CATÃO-DIAS, 2003; LONDON; SÉGUIN, 2003; MISDORP, 2004).

Apesar dos mastócitos serem encontrados em abundância nos pulmões e no trato gastrointestinal de cães, a maioria dos mastocitomas nesta espécie ocorre nas regiões da derme e subcutâneo, sendo raras as manifestações primárias em outros locais (BOSTOCK, 1973; LONDON; SÉGUIN, 2003). Também rara é a ocorrência de leucemia primária de mastócitos, mais comumente sendo resultado da disseminação sistêmica de mastocitomas cutâneos (MCMANUS, 1999; LONDON; SÉGUIN, 2003).

Dentre as lesões cutâneas, as regiões mais afetadas são: o tronco e períneo, em 50 a 63% dos casos; extremidades, 33 a 40%; cabeça e pescoço, 10 a 15%. Lesões múltiplas são observadas em 3 a 14% dos casos (SIMOES et al., 1994; ROGERS, 1996; ABADIE; ARMADEILH; DELVERDIER, 1999; GINN et al., 2000; LONDON; SÉGUIN, 2003). Strefezzi (2001) relatou como localização mais freqüente extremidades/membros (54,2%), seguido de lesões torácicas (20,8%), inguinais/perineais (16,7%) e abdominais (8,3%). Não foram encontrados mastocitomas em região de cabeça/pescoço neste trabalho.

Os mastocitomas cutâneos podem surgir da derme ou a partir do tecido conjuntivo subcutâneo e apresentam características macroscópicas extremamente variáveis, fato que dificulta ou impossibilita especulações sobre o comportamento da neoplasia quando nos baseamos apenas nestas características (STREFEZZI, 2001; LONDON; SÉGUIN, 2003). Os tumores dérmicos podem ser massas elevadas, bem definidas, freqüentemente alopecicas e eritematosas, algumas vezes ulceradas e/ou com presença de prurido. A maioria tem menos de 3 cm de diâmetro, mas podem chegar a 10 cm ou mais. Também podem ocorrer como espessamentos da pele. Os tumores subcutâneos têm limites pouco definidos, são macios, cobertos por pêlos, sem eritema e prurido, e podem ser clinicamente confundidos com lipomas (HOTTENDORF; NIELSEN, 1967; YAGER; SCOTT, 1993; LONDON; SÉGUIN, 2003).

Esta neoplasia já foi transmitida experimentalmente a partir de extratos de células, o que sugere a etiologia viral (MISDORP, 2004). Porém, partículas virais não foram demonstradas ultraestruturalmente (MADEWELL; MUNN; PHILLIPS, 1984).

A alta incidência em algumas raças como Boxer, Bulldog e Boston Terrier foi investigada como podendo ser ocasionada por fragilidade cromossômica. Foram detectadas

instabilidades nos cromossomos 3, 4 e 15, mas essas alterações foram interpretadas como conseqüências da idade avançada dos animais, e não uma síndrome racial específica ou doença familiar (STONE; JACKY; PRIEUR, 1991; GINN et al., 2000).

Mutações no protooncogene *KIT* (c-kit/CD117), que codifica o receptor KIT - também denominado SCFR, do inglês "*stem cell factor receptor*" - parecem estar envolvidas na patogênese desta neoplasia. KIT é um receptor transmembrânico de atividade tirosinocinase que desencadeia proliferação e diferenciação celulares. Expresso em células hematopoiéticas e mastócitos, mas não em histiócitos e melanócitos, tem sido utilizado como marcador imunoistoquímico para mastocitomas. Duplicações e deleções do domínio justamembrânico de *KIT* foram descritas e relacionadas com maior agressividade dos tumores (LONDON et al., 1996; LONDON et al., 1999; MISDORP, 2004).

2.2.2 Diagnóstico Citológico

O diagnóstico de mastocitomas cutâneos pode ser feito através de Punção por Agulha Fina (PAF) ou por meio de decalque das lesões sobre lâmina de microscopia. As colorações de eleição são as do tipo Romanowsky ou a de Azul de Metileno (MACY, 1985; O'KEEFE, 1990; LONDON; SÉGUIN, 2003). Os mastocitomas são incluídos no grupo das neoplasias de células redondas juntamente com linfoma, plasmocitoma, histiocitoma, melanoma e o tumor venéreo transmissível (DUNCAN; PRASSE, 1979; LONDON; SÉGUIN, 2003).

A presença de grânulos intracitoplasmáticos, importante característica diagnóstica desta neoplasia, pode não ser detectada por alguns métodos de coloração, como o Diff-Quik, por exemplo. Ainda, nos tumores menos diferenciados, a quantidade de grânulos pode ser tão pequena que dificulte sua visualização e, conseqüentemente, o diagnóstico. Nestas situações deve-se optar pelas colorações de Giemsa ou Azul de Toluidina, que tornam os grânulos metacromáticos de coloração azul-violácea, facilitando sua identificação (LONDON; SÉGUIN, 2003). A eficiência da punção aspirativa por agulha fina (PAAF) pôde ser verificada em um estudo retrospectivo de 64 tumores de células redondas, no qual 94% (60/64) dos casos obtiveram os mesmos resultados da histopatologia, apontando o exame citopatológico

como altamente eficiente no diagnóstico deste grupo de neoplasias (DUNCAN; PRASSE, 1979). London e Séguin (2003) consideram importante a avaliação citológica de todos os nódulos cutâneos, já que todos podem se tratar de mastocitomas.

Caso o diagnóstico através de exame citopatológico se torne difícil, o mesmo pode também ser realizado por técnicas histopatológicas através de biópsias incisionais, por “punch” ou agulhas “tru-cut” (DUNCAN; PRASSE, 1979; LONDON; SÉGUIN, 2003). Células pobres em grânulos são mais facilmente reconhecidas na citopatologia que na histopatologia por causa da maior resolução de grânulos citoplasmáticos. Portanto, a avaliação citopatológica foi considerada como muito importante ao diagnóstico (DUNCAN; PRASSE, 1979; MACY, 1985).

2.2.3 Comportamento Biológico e Metástases

O comportamento dos mastocitomas é extremamente variável, fazendo com que clínicos e cirurgiões os considerem como neoplasias potencialmente malignas. Aproximadamente 50% são agressivos, apresentando taxas de recidiva e/ou metástases em 28 a 80% dos casos. As mesmas ocorrem, principalmente, para linfonodos regionais, em 76 a 96% dos casos, além de baço e fígado (MACY, 1985; O’KEEFE, 1990; YAGER; SCOTT, 1993; SIMOES et al., 1994;\).

Outras complicações como úlceras gastroduodenais, distúrbios na coagulação e retardo na cicatrização, vêm sendo observadas por diversos autores (MACY, 1985; O’KEEFE, 1990; PULLEY; STANNARD, 1990; ROGERS, 1993; YAGER; SCOTT, 1993). As ulcerações têm localização mais comum em estômago que em duodeno, e a frequência relatada pelos diferentes autores varia de 25% (YAGER; SCOTT, 1993) a 83% dos animais necropsiados (MACY, 1985; O’KEEFE, 1990). A hipótese mais aceita para explicar o aparecimento destas lesões é a de que a histamina liberada pelos mastócitos provocaria lesões endoteliais levando à liberação de fibrolisina e à lesão da vasculatura da submucosa gástrica, com conseqüente trombose e infarto destas áreas (MACY, 1985; O’KEEFE, 1990; ROGERS, 1993; YAGER; SCOTT, 1993). O retardo na cicatrização das áreas acometidas é atribuído aos efeitos de enzimas proteolíticas e aminas vasoativas liberadas pelo tumor. A histamina se ligaria a

receptores H₁ e H₂ de macrófagos resultando em liberação de fator supressor de fibroblastos, situação que prejudica a cicatrização local (MACY, 1985). Os defeitos de coagulação, relacionados à liberação de heparina que ocasionam principalmente hemorragias locais, são achados menos freqüentes (MACY, 1985; O'KEEFE, 1990; ROGERS, 1993). O choque hipotensivo pode ocorrer por desgranulação excessiva dos mastócitos em casos de manipulação excessiva ou criocirurgia (ROGERS, 1993; YAGER; SCOTT, 1993). Glomerulite multifocal foi observada em aproximadamente 70% dos cães, caracterizada por infiltrados pericorpusculares de plasmócitos, acúmulo focal de material eosinofílico amorfo em membrana basal glomerular e espessamento da cápsula de Bowmann (PULLEY; STANNARD, 1990).

2.2.4 Tratamento

Indica-se, como principal tratamento, a excisão cirúrgica (MISDORP, 2004). Ela deve ser realizada de forma ampla, quando possível com margem cirúrgica de aproximadamente 3 cm em todas as direções. De forma geral, segundo a OMS, a escolha pelo procedimento cirúrgico deve ser feita quando o tumor apresenta-se em massa única, com ou sem acometimento dos linfonodos mais próximos. Já nos casos onde há metástases, ou quando há várias massas tumorais, devem-se realizar outros tipos de abordagem (MACY, 1985; O'KEEFE, 1990; ROGERS, 1993; MISDORP, 2004). Séguin et al. (2001) e Weisse, Shofer e Sorenmo (2002) relatam que, para os mastocitomas moderadamente diferenciados, ou de grau II, a excisão cirúrgica como única forma de tratamento teve sucesso em 95% e 89% dos casos, respectivamente, quanto à recidiva e metástases, sendo desnecessárias outras formas sistêmicas de tratamento. A presença de células tumorais junto às margens cirúrgicas não é indicativa de recidiva local, ou mesmo insucesso no tratamento (MICHELS et al., 2002; MISDORP, 2004; MURPHY et al., 2004).

A radioterapia é recomendada para todos os estágios clínicos, sendo mais efetiva assim que o tumor é detectado, ou quando a excisão cirúrgica não pode ser realizada da forma ampla idealizada. Nas doses de 3000 a 4000 rads, em 3 a 4 aplicações semanais, foram observadas taxas de controle do crescimento tumoral por 12 meses que variaram de

48 a 78% dos casos. Apesar da alta radiosensibilidade dos mastócitos, a principal desvantagem desse tratamento é o custo e a disponibilidade de equipamento, que só é encontrado nos principais centros de referência (MACY, 1985; O'KEEFE, 1990; ROGERS, 1993).

Por outro lado, a quimioterapia é mais acessível e, conseqüentemente, mais utilizada na prática diária. É recomendada a partir do estágio clínico II, e no estágio I quando o grau histopatológico é III, ou seja, para neoplasias que atingem, no máximo, os linfonodos regionais. O quimioterápico mais utilizado é a Prednisona/Prednisolona, um glicocorticoide, cuja ação se baseia em reduzir a síntese de DNA, mitoses e, conseqüentemente, a multiplicação de células tumorais (MCCAW et al., 1994; MISDORP, 2004). A existência ou não de receptores intracitoplasmáticos para este tipo de droga pode explicar as diferentes respostas frente a este tratamento, que têm produzido remissões parciais ou totais. McCaw et al. (1994) sugerem que a prednisona pode ter maior ação em tumores mais bem-diferenciados.

Outras drogas são citadas, mas ainda sem comprovação clínica de sua eficiência, como a L-asparaginase, a ciclofosfamida e a doxorubicina (MACY, 1985; O'KEEFE, 1990; ROGERS, 1993). A vincristina foi administrada em quatro doses de 0,75 mg/m², tendo se mostrado um quimioterápico ineficiente como única forma de tratamento para os mastocitomas por produzir um grande número de reações gastrintestinais adversas aos pacientes (MCCAW, et al. 1997; MISDORP, 2004). A CCNU/Lomustine parece ser a mais eficiente, atingindo resposta mensurável em 42% (8/19) dos cães tratados, sendo uma remissão completa e 7 casos com redução de mais de 50% do volume tumoral. Esta droga foi bem tolerada pelos animais, mas, mesmo assim, apresentou efeitos adversos. O principal foi neutropenia, sendo esta severa em 41% dos animais, o que levou os autores desse trabalho a, ainda, considerar o tratamento como auxiliar à cirurgia e radioterapia (RASSNICK et al., 1999).

A injeção de água destilada, proposta por Paul Ehrlich há mais de um século, causa destruição celular por hiposmolaridade. Este método foi testado por Grier et al. (1995), na tentativa de prevenir a recidiva dos mastocitomas após a remoção cirúrgica das lesões, e também como forma de tratamento nas menores massas tumorais. A água foi injetada tanto por via subcutânea quanto intradérmica, até que a lesão tivesse aparência elevada, gelatinosa e acinzentada, de 7 em 7 dias, em quatro aplicações. Comparando os resultados

dos tratamentos exclusivamente cirúrgicos com aqueles obtidos com as injeções de água destilada, as taxas de recidiva foram, respectivamente: 37,5% versus 8,3% para as neoplasias de grau I; e 83,3% versus 30% para as neoplasias de grau II. Todos os 10 casos que foram tratados apenas com água destilada regrediram em quatro semanas. Os resultados com os mastocitomas de grau III não foram bons, segundo os autores, pois estes tumores eram extensos e difíceis de ser injetados em toda sua extensão, além de possuírem células menos diferenciadas e, postulam os mesmos, mais resistentes à hiposmolaridade.

Tratamentos auxiliares são considerados importantes. A utilização de Cimetidina, um competidor da histamina pelos receptores H_2 das células parietais gástricas, reduz a secreção de HCl. Além desta forma de prevenção das ulcerações gástricas, é recomendada a utilização de Sucralfato, que reage com o ácido gástrico formando uma substância pastoso-viscosa e adesiva que se deposita na superfície de úlceras gástricas e intestinais. Antagonistas H_1 são administrados antes e depois da remoção cirúrgica de mastocitomas para bloquear os efeitos negativos da liberação local de histamina na fibroplasia e cicatrização (MACY, 1985; O'KEEFE, 1990; ROGERS, 1993).

2.2.5 Indicadores Prognósticos

Os mastocitomas cutâneos têm provocado, freqüentemente, frustrações terapêuticas. Devido à dificuldade de previsão do comportamento biológico e, conseqüentemente, à definição dos tratamentos instituídos, a busca por indicadores prognósticos mais precisos para esta neoplasia canina vem se intensificando e se diversificando nas últimas décadas. Diversos métodos têm sido investigados e utilizados, como descreveremos a seguir.

2.2.5.1 Parâmetros Clínicos

Dentre os parâmetros clínicos utilizados na tentativa de previsão do comportamento biológico destacam-se a localização dos tumores, idade, raça, sexo, presença de múltiplas massas e as características de crescimento.

Mastocitomas no focinho apresentam tendência à agressividade por possuírem taxas de metastatização maiores que mastocitomas em outras localizações (GIEGER et. al, 2003; KIUPEL et al., 2005). As lesões inguinais, prepuciais e perineais geralmente são consideradas mais malignas, mas estas observações não são baseadas em evidências científicas que gerem índices estatísticos, e sim em impressões clínicas (DEAN, 1988; MISDORP, 2004).

Al-Sarraf et al. (1996) testaram a idade, sexo, raça, localização e número de procedimentos cirúrgicos em relação ao período de sobrevida dos animais, mas não obtiveram diferenças estatisticamente significantes. Já Kiupel et al. (2005) relataram tendências de animais idosos e da raça Boxer apresentarem recidiva à distância, e de machos idosos a apresentarem sobrevidas menores.

A presença de múltiplas massas está relacionada com piores prognósticos. Porém, a profundidade das lesões, utilizada como critério na classificação de Patnaik, Ehler e MacEwen (1984), não apresentou significado prognóstico (KIUPEL et al., 2005), assim como o volume tumoral no momento do diagnóstico (BOSTOCK, 1973; O'KEEFE, 1990; ROGERS, 1996; LONDON; SÉGUIN, 2003).

A classificação clínica em estágios tem por objetivo identificar a extensão da doença num determinado animal. É um procedimento importante, pois influencia o prognóstico e auxilia no direcionamento do tratamento a ser realizado. A graduação mais comumente empregada para isto é a proposta pela Organização Mundial de Saúde, em quatro graus ou estágios (MACY, 1985; DEAN, 1988; O'KEEFE, 1990). Turrel et al. (1988) utilizaram uma versão modificada desta classificação adicionando à mesma o estágio zero. Por esta classificação, os estágios exibiram as seguintes características: estágio 0, quando o animal apresentava uma neoplasia incompletamente excisada na região da derme, identificada histologicamente e por biópsia aspirativa, sem envolvimento de linfonodo regional; estágio I, quando a neoplasia estava confinada à derme, sem envolvimento de linfonodo regional; estágio II, tumor confinado à derme, com envolvimento de linfonodo regional; estágio III,

múltiplas massas confinadas à derme ou uma grande massa infiltrativa, com ou sem envolvimento de linfonodos regionais; e estágio IV, qualquer neoplasia, com metástase, incluindo leucemia e/ou envolvimento de medula óssea, ou recidiva com metástase.

2.2.5.2 Graduação Histopatológica

A graduação histopatológica tem sido o método de eleição na tentativa de prever o comportamento biológico desta neoplasia (SIMOES; SCHONING; BUTINE, 1994; LONDON; SÉGUIN, 2003; MISDORP, 2004). Vários autores vêm propondo classificações histomorfológicas para mastocitomas cutâneos caninos, sendo as mais citadas em literatura as de Hottendorf e Nielsen (1967), Bostock (1973) e Patnaik, Ehler e MacEwen (1984).

Nas últimas três décadas, a referência mais utilizada é a de Patnaik, Ehler e MacEwen (1984), por ser considerada a mais lógica pela maioria dos autores (MACY, 1985; O'KEEFE, 1990; ROGERS, 1996; STREFEZZI, 2001; STREFEZZI; XAVIER; CATÃO-DIAS, 2003; LONDON; SÉGUIN, 2003; MISDORP, 2004). Nesta, os tumores foram divididos em três graus: Grau I ou bem diferenciados; Grau II ou moderadamente diferenciados; e Grau III ou pouco diferenciados. A divisão em graus é baseada na análise de diversas características histomorfológicas, como transcritas a seguir, de Patnaik, Ehler e MacEwen (1984):

Grau I. Mastocitomas grau I foram diagnosticados em 36% (30/83) dos cães. As lesões nestas neoplasias estavam confinadas à derme e espaços interfoliculares. Mastócitos bem-diferenciados estavam arranjados em fileiras ou pequenos grupos, separados por fibras colágenas maduras da derme. As células eram redondas e monomórficas com citoplasma amplo; a maioria tinha limites citoplasmáticos distintos e de tamanho médio. Os núcleos eram redondos e com cromatina condensada. Células em mitose estavam ausentes. O edema e necrose eram mínimos nas lesões que haviam sido traumatizadas.

Grau II. Os mastocitomas grau II foram diagnosticados em 43% (36/83) dos cães. Estas neoplasias eram de moderada a altamente celulares, e as células neoplásicas infiltraram ou substituíram a derme e o tecido subcutâneo. Alguns tumores estenderam-se aos músculos esqueléticos ou tecidos adjacentes. Células moderadamente pleomórficas estavam arranjadas em grupos com estroma fibrovascular fino. Em alguns locais o estroma estava mais espesso e fibrocolagenizado com áreas de hialinização. As células neoplásicas eram redondas a ovaladas e havia células fusiformes e células gigantes espalhadas difusamente. A maioria das células possuía citoplasma distinto com grânulos intracitoplasmáticos finos; entretanto, o citoplasma em algumas era indistinto e possuía grânulos grandes e hipercromáticos. Os núcleos eram redondos a indentados com cromatina difusa e nucléolos únicos; células ocasionais possuíam dois núcleos. As figuras mitóticas eram raras, variando de 0 a 2 por campo de grande aumento (objetiva de 40x). Havia áreas de edema difusas e necrose.

Grau III. Mastocitomas de grau III foram diagnosticados em 20% (17/83) dos cães. Estas neoplasias eram celulares, pleomórficas, e o tecido neoplásico tomou o lugar dos

tecidos subcutâneo e mais profundos. As células neoplásicas pleomórficas, de tamanho médio, redondas, ovais ou fusiformes estavam arrançadas em grupos bem compactos. O citoplasma era indistinto com grânulos finos intracitoplasmáticos ou grânulos que não eram óbvios. O estroma era fibrovascular ou espesso e fibrocolagenizado com áreas de hialinização. Os núcleos vesiculosos, indentados a redondos, possuíam um ou mais nucléolos proeminentes. Células binucleadas eram comuns. Havia muitas células gigantes e células multinucleadas difusamente distribuídas. Células em mitose também eram comuns, variando de 3 a 6 por campo de grande aumento. Edema, hemorragia e necrose eram comuns.

Neste trabalho, 46% dos cães foram sacrificados ou morreram em função do tumor, num período de 1500 dias, reforçando a potencial malignidade dos mastocitomas. O tempo de sobrevida dependia do grau de diferenciação celular dos tumores, pois, no mesmo período, 93% dos cães portadores de neoplasias de grau I sobreviveram, enquanto apenas 44% e 6% daqueles com neoplasias de graus II e III, respectivamente, permaneceram vivos (PATNAIK; EHRLER; MACEWEN, 1984).

A graduação histopatológica é feita através de parâmetros subjetivos como índice mitótico, quantidade de grânulos citoplasmáticos e grau de anisocitose, gerando variações intra e interobservador importantes, principalmente nos tumores limítrofes ou de grau II (YAGER; SCOTT, 1993; SIMOES; SCHONING; BUTINE, 1994; STREFEZZI; XAVIER; CATÃO-DIAS, 2003; MISDORP, 2004; KIUPEL et al., 2005; MAIOLINO et al., 2005; NORTHRUP et al., 2005). Por isso a avaliação de casos-limite entre os três graus necessita de maior precisão, pois o método ainda não é capaz de prever o comportamento de todos os tumores (LONDON; SÉGUIN, 2003).

Abadie, Armadeilh e Delvedier (1999) e Ginn et al. (2000) afirmam que as frequências diferentes encontradas por diversos autores entre os graus histopatológicos têm explicação na subjetividade da classificação, onde um tumor era classificado de duas formas diferentes por dois patologistas.

Em um recente trabalho multi-institucional para avaliação de variações interobservadores na graduação de mastocitomas cutâneos caninos, Northrup et al. (2005) relataram diferenças significantes entre diferentes patologistas, reforçando a tese de que as classificações histomorfológicas ainda necessitam de critérios mais objetivos. Segundo os autores, estas discrepâncias foram ocasionadas pelos métodos de classificação escolhidos, devido às possibilidades de inclusão, no grupo dos mastocitomas de baixo-grau, de tumores com mitoses e atingindo o subcutâneo.

Porém, apesar das críticas, a graduação histopatológica ainda é considerada indispensável e, até o momento, não foi superada por nenhum outro indicador prognóstico mais eficiente (LONDON; SÉGUIN, 2003; MISDORP, 2004; WEBSTER et al., 2007).

2.2.5.3 Índice Mitótico

A contagem de figuras de mitose por campo, ou o índice mitótico, expresso em porcentagem, têm sido realizada para avaliação da atividade proliferativa de neoplasias humanas, como carcinomas tireoidianos e mamários, e de animais, como sarcomas de partes moles, tumores mamários e melanomas cutâneos (QUINN; WRIGHT, 1990; ROMANSIK et al., 2007). De procedimento relativamente simples, por não requerer técnicas histoquímicas especiais, esta avaliação ainda apresenta problemas de reprodutibilidade devido à seleção de campos a serem avaliados, variações interobservadores e de tamanho dos campos de diferentes objetivas, dificuldades de distinção com núcleos picnóticos, além de representarem apenas uma das fases do ciclo celular, a fase M (QUINN; WRIGHT, 1990).

Uma recente pesquisa demonstrou correlação entre o índice mitótico em mastocitomas e os graus histopatológicos de Patnaik, Ehler e MacEwen (1984), taxa de ocorrência de metástases e tempo de sobrevida (ROMANSIK et al., 2007). Além disso, o índice mitótico foi útil na divisão de casos de mastocitomas de grau II, demonstrando que tumores com alto índice mitótico possuíam tempos de sobrevida bastante reduzidos. Foi identificado, também, um subgrupo com baixo índice mitótico entre os tumores de grau III, que apresentavam melhor prognóstico. Apesar dos resultados animadores, esta técnica ainda necessita de validação através da análise de outras amostras tumorais, bem como avaliação das variações inter e intraobservador.

2.2.5.4 Morfometria

O diagnóstico morfológico é baseado no reconhecimento de padrões visuais ou critérios diagnósticos, para vários tecidos diferentes, por um observador qualificado. Apesar de muitos destes critérios serem bem definidos para cada doença, variações interobservadores, e até mesmo intraobservador, têm sido documentadas. Tais discrepâncias de reprodutibilidade chegam a atingir 50 a 60% de discordância entre patologistas experientes (KOSS, 1992; MARCHEVSKY; ERLER, 1994; STREFEZZI; XAVIER; CATÃO-DIAS, 2003; KIUPEL et al., 2005; NORTHRUP et al., 2005).

Talvez a melhor solução, surgida nas últimas décadas, para a eliminação das variações inter e intraobservador das classificações histopatológicas tenha sido a análise computadorizada de imagens. Este método, de alta precisão e reprodutibilidade, visa à mensuração de parâmetros como, por exemplo, a área, perímetro e o diâmetro médio de células e/ou núcleos, bem como o reconhecimento de suas formas ou intensidades de coloração, tentando correlacioná-los com o comportamento biológico do tumor em questão (DARDICK et al., 1984; KOSS, 1992; MARCHEVSKY; ERLER, 1994; ELDAR et al., 1999; STREFEZZI, 2001).

Compreende-se por morfometria a quantificação de estruturas visíveis numa lâmina histo ou citológica, de forma bidimensional. As características tridimensionais são objetos de estudo de outra ciência: a estereologia. O que se vê em histopatologia são secções de estruturas, muitas vezes não refletindo a medida máxima das mesmas. Em citopatologia, a célula está espalhada na lâmina e sua imagem é uma projeção da mesma por completo. Neste caso, não há problemas tridimensionais envolvidos (GIL; BARBA, 1994).

A morfometria pode ser realizada com o auxílio de várias ferramentas: (1) a mensuração linear para obtenção da distância entre dois pontos, que pode ser realizada através de uma objetiva especial contendo uma escala gravada ou, alternativamente, com uma régua medindo-se a figura projetada ou fotografada; (2) a análise de imagens utilizando-se sistemas computacionais interativos, que tem ganhado muita popularidade na obtenção de dados histo e citométricos, em particular para o exame de características nucleares; e (3) os sistemas de processamento e análise de imagens, totalmente automatizados, que removem o erro/variação humana e são mais rápidos, sendo mais bem

utilizados em exames citológicos que em histopatológicos, pois este último possui imagens complexas e difíceis para o computador medir (HAMILTON; ALLEN, 1995).

O grande valor da análise de imagens para o patologista é a possibilidade de estipular valores quantitativos precisos, tanto através de microscopia de luz quanto eletrônica, de modo a formar bases de dados para parâmetros de células ou tecidos normais, atípicos e neoplásicos, contribuindo desta maneira para a formulação do prognóstico (DARDICK; PAYNE, 1992; ELDAR et al., 1999).

Pequenas variações na forma, tamanho e/ou textura, na grande maioria das vezes imperceptíveis ao olho humano mesmo com o auxílio de microscopia óptica e eletrônica, podem ser percebidas por análise de imagens computadorizada (DARDICK; PAYNE, 1992; ELDAR et al., 1999). Como exemplo, temos a capacidade do computador em interpretar tons de cinza ou cores: enquanto o olho humano distingue por volta de 50 tons diferentes de cinza, o computador identifica 256 (DARDICK; PAYNE, 1992).

Apesar das grandes vantagens oferecidas, muitos estudos ainda são necessários para formar bases de dados completas, pois as técnicas de morfometria ainda não foram incorporadas à prática diária do patologista (DARDICK; PAYNE, 1992; MARCHEVSKY; ERLER, 1994). Os modelos probabilísticos que utilizam este método para a coleta dos dados também precisam ser melhorados, principalmente de modo a satisfazer as necessidades práticas de planejamento de cirurgias e, ainda, adequando-se às biópsias aspirativas por agulha fina (ELDAR et al., 1999).

A análise quantitativa de imagens tem sido realizada frequentemente em oncologia humana, com o intuito de se definir graduações tumorais que informem ao patologista, de maneira mais precisa, sobre a malignidade do tumor em questão (DARDICK; PAYNE, 1992). A morfometria já demonstrou ter aplicações em biópsias de músculo, osso, e jejuno; avaliação de profundidade de invasão de melanomas bem como linfangiogênese tumoral destas neoplasias (MASSI et al., 2006); neoplasias de mama, ovário, endométrio e pâncreas endócrino (HAMILTON; ALLEN, 1995; HSU et al., 2005), adenocarcinomas gástricos (IKEGUCHI et al., 1999), carcinomas e adenomas foliculares tireoidianos (ELDAR et al., 1999), linfomas não-Hodgkin imunoblásticos e de grande células não-clivadas (DARDICK et al., 1984).

Em oncologia veterinária, as pesquisas sobre morfometria como indicador prognóstico de processos neoplásicos têm evoluído, principalmente, na última década. Seu

potencial foi verificado em neoplasias mamárias (CIUREA et al., 1992; DE VICO; MAIOLINO, 1997; SIMEONOV; SIMEONOVA, 2006a, b, 2007), melanomas (ROELS et al., 2000), carcinomas espinocelulares de pele (MAIOLINO et al., 2002; MARTANO et al., 2006) e mastocitomas cutâneos (STREFEZZI; XAVIER; CATÃO-DIAS, 2003; MAIOLINO et al., 2005)

Strefezzi, Xavier e Catão-Dias (2003) demonstraram correlação entre os parâmetros morfométricos nucleares em exames citopatológicos e a graduação histopatológica de mastocitomas. Tal método facilitou a graduação dos tumores quanto à diferenciação, mas ainda não estabeleceu limites ou valores fixos para tais parâmetros, o que conferiria maior velocidade e precisão ao diagnóstico. Em adição, ainda se faz necessário o acompanhamento clínico no intuito de estabelecer uma possível correlação entre os parâmetros morfométricos nucleares e o comportamento dos tumores e a sobrevida dos animais estudados. Maiolino et al. (2005) realizaram a análise morfométrica nuclear em lâminas de histopatologia, corroborando estas observações, e reforçando a utilidade da morfometria computadorizada na graduação de mastocitomas.

2.2.5.5 Métodos Histo e Imunoistoquímicos

2.2.5.5.1 Avaliação da Atividade Proliferativa

A mensuração da atividade proliferativa através de marcações histo e imunoistoquímicas tenta complementar ou, até mesmo, substituir a contagem de mitoses, considerada por muitos um método subjetivo, trabalhoso e de baixa reprodutibilidade (ELLIS; WHITEHEAD, 1981; QUINN; WRIGHT, 1990; ABADIE; ARMADEILH; DELVERDIER, 1999). Merecem destaque os métodos de determinação da frequência de Regiões Organizadoras Nucleolares com afinidade pela prata - AgNOR -(BOSTOCK et al., 1989; SIMOES; SCHONING; BUTINE, 1994; KRAVIS et al., 1996), contagem de células positivas para o Antígeno Nuclear de Proliferação Celular - PCNA -(SIMOES; SCHONING; BUTINE, 1994; ABADIE; ARMADEILH; DELVERDIER, 1999) e a contagem de células positivas para Ki-67 (ABADIE; ARMADEILH; DELVERDIER, 1999; SAKAI et al., 2002).

As Regiões Organizadoras de Nucléolo (NORs) são alças de DNA que transcrevem o RNA ribossomal, e podem ser demonstradas através de método de impregnação pela prata. O número de AgNORs reflete a atividade proliferativa de uma população celular, e está relacionado com a velocidade com que as células percorrem o ciclo celular (QUINN; WRIGHT, 1990; MELO; ALVES, 1999). A grande variação entre as técnicas de coloração, empregadas pelos vários grupos de pesquisa, inviabiliza a comparação confiável dos resultados obtidos, apesar de, isoladamente, os resultados serem consistentes (SCASE et al., 2006).

O PCNA é uma proteína não-histona necessária à síntese e reparo de DNA, detectada desde a fase G1 até a transição G2-M, atingindo seu máximo na fase S do ciclo celular (MADEWELL, 2001). Está ausente na fase G0, mas, diferentemente do Ki-67, sua expressão varia muito nas fases G1-S-G2-M. Pode ser induzida por dano ao DNA e, ainda, possui meia-vida longa, fazendo com que as frações proliferativas sejam, muitas vezes, super-representadas (ABADIE; ARMADEILH; DELVERDIER, 1999; MADEWELL, 2001).

Nos últimos anos, a marcação imunoistoquímica de Ki-67 tornou-se a melhor ferramenta para avaliação da fração de crescimento de uma população celular. Apesar de sua função ainda não ter sido completamente elucidada, parece estar relacionado com RNA nucleolar e está presente somente em células durante as fases ativas do ciclo celular: G1, S, G2 e M. Sua meia-vida é curta, pois é degradado em aproximadamente uma hora após a mitose. Sendo assim, mesmo marcações tênues podem ser consideradas positivas, dispensando os "cut offs", geralmente utilizados para a avaliação do PCNA (QUINN; WRIGHT, 1990; ABADIE; ARMADEILH; DELVERDIER, 1999; MELO; ALVES, 1999; SCASE et al., 2006).

Bostock et al. (1989) encontraram diferenças significantes na contagem de AgNORs/célula entre os três graus de malignidade dos mastocitomas. Contagens maiores de AgNORs/célula representavam prognósticos sombrios, com mortalidade de 75% dos indivíduos nos primeiros quatro meses após tratamento cirúrgico. Dentre os que apresentaram contagem intermediária, apenas um terço dos animais morreu em função da neoplasia, enquanto que nenhum cão morreu em 6 meses com contagens menores que 1,7 AgNORs/célula. Quando separados em dois grupos de acordo com a contagem de AgNORs houve diferença estatisticamente significante ($p < 0,001$) para este mesmo período. Kravis et al. (1996), realizaram a contagem de AgNORs em lâminas de citopatologia e obtiveram correlação com a graduação histopatológica: os tumores de grau III tiveram uma frequência significantemente maior de AgNOR/célula do que os de grau I e II ($p < 0,001$).

Simoës, Schoning e Butine (1994) compararam o valor da graduação histopatológica proposta por Patnaik, Ehler e MacEwen (1984) com a contagem de AgNORs e a fração marcada pelo PCNA como indicadores prognósticos. O número de AgNORs foi o indicador mais preciso para neoplasias recidivantes no período de 3 meses, seguido por PCNA e graduação histopatológica. Para o período de 6 meses, o melhor indicador foi o PCNA, seguido por graduação histopatológica e AgNOR. E, finalmente, no período de 9 meses sem recidiva, a graduação histopatológica foi o melhor método prognóstico, seguido por PCNA e AgNOR. A combinação dos três métodos previu corretamente o comportamento tumoral em 80% dos casos.

Para Abadie, Armadeilh e Delverdier (1999) e Scase et al. (2006), o índice de PCNA foi maior nos animais que vieram a óbito em função do mastocitoma do que nos que sobreviveram, mas, apesar disso, não foi demonstrada diferença estatisticamente significativa entre os graus histopatológicos. Já para o Ki-67 houve diferença altamente significativa entre os graus histopatológicos ($p < 0,001$). Sakai et al. (2002), também encontraram diferenças significantes entre os graus histopatológicos na contagem de células positivas para o Ki-67 ($p < 0,01$), concluindo ser este um importante marcador de proliferação para mastocitomas. Scase et al. (2006) confirmaram a utilidade do Ki-67 como indicador prognóstico independente da graduação histológica, sendo este útil, principalmente, na subdivisão de mastocitomas de grau II quanto à agressividade. Além disso, reforçaram a possibilidade de utilização da contagem de AgNORs como coadjuvante ao prognóstico e a falha do PCNA em prever o tempo de sobrevida dos pacientes. Webster et al. (2007) recomendam a utilização de AgNOR e Ki-67, em associação à avaliação da expressão de c-kit como métodos rotineiros para indicação do prognóstico em mastocitomas.

2.2.5.5.2 *Oncogenes*

Os oncogenes, genes causadores de câncer, derivam de proto-oncogenes, genes que regulam o crescimento e a diferenciação celular normais. Diversos produtos dos oncogenes – as oncoproteínas – já foram relatados. Entre eles estão os receptores de fatores de

crescimento, que podem estar ativados constantemente ou hiperexpressos no câncer (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005).

No que diz respeito a genes envolvidos no desenvolvimento de mastocitomas, um dos mais bem investigados é o proto-oncogene *KIT*. Este proto-oncogene codifica um receptor transmembrânico de atividade tirosino-cinase, ao qual se liga o “Stem Cell Factor” (SCF) – ou Fator de Crescimento para Mastócitos ou, ainda, Ligante de KIT -, uma citocina que estimula desenvolvimento, maturação e sobrevivência de mastócitos, além de várias outras linhagens celulares, tais como “stem cells” hematopoiéticas e melanócitos (LONDON et al., 1996; LONDON et al., 1999). Mutações pontuais e pequenas deleções nos domínios cinase, ou justamembrânico, têm sido responsabilizadas por causar ativação constitutiva do receptor, mesmo na ausência de seu ligante, em humanos e roedores (ZEMKE; YAMINI; YUZBASIYAN-GURKAN, 2002). Tal ativação constante parece ser responsável pela proliferação descontrolada das células e pelo potencial agressivo dos tumores.

As mutações em mastócitos de cães foram recentemente identificadas, e caracterizadas como duplicações do domínio justamembrânico (LONDON et al., 1999; MA et al., 1999). Reguera et al. (2000) identificaram aumento da expressão de *KIT* quanto menor a diferenciação tumoral e, ainda, dois padrões de marcação imunoistoquímica: na membrana citoplasmática e no citoplasma, geralmente ao redor do núcleo. Finalmente, Zemke; Yamini; Yuzbasiyan-Gurkan (2002) relataram mutações nos tumores de graus II e III e não nos de grau I. Tais informações sugerem que a expressão e as mutações de *KIT* podem estar relacionadas com a gênese e progressão tumoral, sendo a expressão de *KIT* um potencial indicador prognóstico para mastocitomas (LONDON; SÉGUIN, 2003).

Kiupel et al. (2004) propuseram nova classificação dos mastocitomas cutâneos caninos segundo o padrão de marcação imunoistoquímica para *KIT*. Nesta proposta, foram relatados três padrões distintos de marcação, sendo: (I) marcação predominante em membrana citoplasmática, com mínima marcação citoplasmática; (II) marcação intensa citoplasmática em focos, ou em pontilhados; e (III) marcação difusa citoplasmática, obscurecendo outras características citoplasmáticas. Demonstrou-se que os padrões KIT-II e KIT-III estavam significativamente relacionados à taxa de recidiva local e a menores períodos de sobrevida dos animais. Estes resultados foram, posteriormente, confirmados pelo mesmo grupo de pesquisadores e associados aos marcadores de proliferação AgNOR, PCNA e Ki-67 como complementos necessários à graduação histológica. Segundo Webster et al. (2007), os

melhores resultados na caracterização do comportamento biológico de mastocitomas foram obtidos com a avaliação conjunta de grau histopatológico, padrão de localização de KIT, AgNOR e Ki-67. Adicionalmente, sugeriu-se a associação entre a localização aberrante de KIT e o aumento da atividade proliferativa de mastocitomas.

O *MDM2* - “mouse double minute-2” - é um proto-oncogene cujo potencial oncogênico baseia-se em sua hiperexpressão / amplificação. Foi originalmente identificado em linhagens de células murinas, e sua amplificação têm sido demonstrada em neoplasias humanas e caninas, principalmente sarcomas e tumores mamários (SETOGUSHI et al., 2001), nas quais a amplificação de *MDM2* está, muitas vezes, associada à presença de *TP53* normal (NASIR et al., 2000; NASIR et al., 2001, SETOGUSHI et al., 2001). A oncoproteína *MDM2* regula negativamente a ação de P53, catalisando a ubiquitinização, e conseqüentemente sua exclusão do núcleo, além da subsequente degradação da mesma. Isto possibilita a diminuição da atividade de P53, mesmo na ausência de mutação no gene *TP53* (NASIR et al., 2001; MICHAEL; OREN, 2003; O’BRATE; GIANNAKAKOU, 2003; SHIMIZU; HUPP, 2003). A expressão de *MDM2* foi investigada em mastocitomas cutâneos caninos por Wu, Hayashi e Inoue (2006) que constataram a hiperexpressão da oncoproteína em tumores de grau III quando comparados aos de menor grau, apesar de nem todos os tumores serem positivos para a mesma. Além disso, observou-se que apenas uma pequena parte dos mastocitomas *MDM2* positivos, 12,8% (5/39), eram positivos também para P53. Tais resultados sugerem que a hiperexpressão de *MDM2* pode acontecer independentemente da de *TP53* e, ainda, ser responsável por sua exclusão do núcleo e sua degradação/ubiquitinização.

2.2.5.5.3 Antioncogenes ou Genes Supressores de Tumores

Dentre os genes supressores de tumores, responsáveis por inibir o crescimento e diferenciação celulares, pesquisam-se, com frequência, a presença de mutações no gene *TP53*. A P53 normal regula a transição da fase G1 para a fase S do ciclo celular, promovendo ou reprimindo a síntese de RNAm. Sua função é garantir a fidelidade genômica reparando o DNA danificado ou induzindo a apoptose quando estes danos são irreparáveis (GINN et al., 2000; JAFFE et al., 2000; NASIR et al., 2001; KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005). Suas principais

interações acontecem com os genes *CDKN1A* (p21) e *BAX*: na primeira, inibindo a progressão para a mitose; e na segunda, iniciando o processo apoptótico (LEVINE; FLEISCHLI, 2000; NASIR et al., 2001; ADAMS; CORY, 2007; MADDIKA et al., 2007).

A mutação do gene *TP53* tem sido considerada a alteração mais comum em cânceres humanos, causando diminuição ou perda total da função de seu produto (GINN et al., 2000; JAFFE et al., 2000; NASIR et al., 2001). Mutações do gene *TP53* foram relatadas em diversos tumores caninos e linhagens celulares derivadas como, por exemplo, rabdomiossarcomas, osteossarcomas, condrossarcomas e mixossarcomas (SETOGUSHI et al., 2001). A detecção imunoistoquímica da proteína baseia-se no fato da variante mutante ser mais estável e possuir duração maior que a P53 normal, o que provoca seu acúmulo, geralmente no núcleo das células (GINN et al., 2000).

Investigou-se a expressão do gene *TP53* tentando correlacionar sua positividade com a graduação histopatológica, a taxa de recidiva e o tempo de sobrevivência em casos de mastocitoma. Apesar de estas mutações serem de grande valor prognóstico para grande parte dos tumores humanos, os trabalhos veterinários em mastocitomas cutâneos caninos não obtiveram resultados semelhantes (GINN et al., 2000; JAFFE et al., 2000; WU; HAYASHI; INOUE, 2006). Entretanto, a função de P53 pode ser anulada por vários mecanismos não-mutacionais como: sua exclusão do núcleo das células; pela formação de complexos com proteínas virais; e através da expressão do oncogene *MDM2* (NASIR et al., 2001; O'BRIEN; GIANNAKAKOU, 2003; WU; HAYASHI; INOUE, 2006).

2.2.5.5.4 Genes Reguladores da Apoptose

Além dos genes que regulam a proliferação celular, sabe-se, atualmente, que os genes que impedem ou estimulam a morte celular programada também têm grande importância na oncogênese. Uma grande variedade de estímulos sejam eles fisiológicos ou patológicos, desencadeiam um processo organizado de morte celular conhecido como apoptose. A apoptose caracteriza-se pela organização e ativação de genes e enzimas específicas levando ao encolhimento da célula, fragmentação do DNA e formação de corpos apoptóticos. Apesar do mecanismo ainda não ter sido elucidado completamente, sabe-se

que a cascata de enzimas caspases é responsável pelos principais acontecimentos, catabolizando o citoesqueleto celular e ativando endonucleases capazes de fragmentar o DNA nuclear (BURLACU, 2003; KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005; ADAMS; CORY, 2007; MADDIKA et al., 2007).

A iniciação do processo apoptótico pode ser feita por uma variedade de estímulos, tanto intrínsecos, como fatores de estresse que levam à liberação de citocromo C mitocondrial, como extrínsecos, que atuam via estimulação de receptores de TNF. O grupo de proteínas BCL2 é considerado o responsável pela decisão entre a vida ou a morte da célula. Desta grande família destacam-se as proteínas: BCL2 (Bcl-2) e BCL2L1 (Bcl-xL), com efeitos anti-apoptose; BAX e BAK1 (Bak), que estimulam a morte celular programada; e as "BH3-only", incluindo BIK, BAD, BID, BCL2L11 (Bim), BMF, HRK, PMAIP1 (Noxa) e BBC3 (Puma), que atuam como sensores de estresse celular, antagonizando BCL2 e facilitando a ação de BAX e BAK1 no sentido da apoptose (BURLACU, 2003; KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005; ADAMS; CORY, 2007). Tais proteínas foram identificadas nos Linfomas de células B do tipo folicular - de onde deriva a sigla BCL, "*B-cell Lymphoma*". Em 85% dos casos desta neoplasia, observou-se a hiperexpressão de BCL2, que protege os linfócitos da apoptose, permitindo sua sobrevivência por longos períodos (PEZZELLA et al., 1992; BURLACU, 2003; KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005).

BCL2 localiza-se na membrana externa mitocondrial e é considerada a grande responsável por regular a saída de citocromo C para o citoplasma, fato que inicia a morte celular programada, por ativar a cascata de caspases. Sua principal função é estabilizar a membrana mitocondrial e inibir BAX. Esta última é uma proteína pró-apoptótica formadora de canais pelos quais extravasa o citocromo C. Este fenômeno é regulado por dimerização competitiva entre os membros da família BCL2, onde os homodímeros de BCL2 previnem, e os de BAX favorecem a apoptose. O extravasamento de citocromo C para o citoplasma ativa o fator APAF1 e, em seguida a sequência de caspases 9, 3 e 7, responsáveis pela execução do processo de morte celular. P53 também está envolvida no processo por estimular a ação de BAX, exercendo, então, efeito pró-apoptótico (BURLACU, 2003; GUROVA; GUDKOV, 2003; ADAMS; CORY, 2007; MADDIKA et al., 2007).

Os defeitos no mecanismo apoptótico prolongam a vida de células com mutações no DNA e anomalias na regulação do ciclo celular, favorecem a progressão tumoral e promovem metástases por permitir a sobrevivência de células tumorais na circulação e microambientes

de outros tecidos, além de dificultar a terapia anticâncer por conferir resistência celular a diversos métodos de tratamento. Apesar disso, tem sido demonstrado que tumores com aumento da expressão de *BCL2* progridem de forma lenta, ao contrário de tumores com mutações em *TP53*, onde ambas as alterações têm efeito anti-apoptótico. Isto sugere papéis diferentes na progressão tumoral para *BCL2* e *TP53*: a hiperexpressão de *BCL2* diminuiria a velocidade de progressão tumoral e a instabilidade, ou variabilidade, genômica, apesar de não impedi-las, conferindo prognóstico favorável; já a mutação de *TP53* favoreceria a velocidade de progressão tumoral por permitir a instabilidade genômica e, conseqüentemente, a variabilidade celular no tumor, selecionando características malignas (GUROVA; GUDKOV, 2003).

Hartmann et al. (2003) demonstram, através de imunoistoquímica e RT-PCR, a hiperexpressão de *BCL2*, mas não de *BCL2L1*, em pacientes humanos com mastocitose cutânea. Por outro lado, observou-se a hiperexpressão deste último em pacientes com mastocitose sistêmica, enquanto que a de *BCL2* foi pequena ou ausente. Adicionalmente, culturas de mastócitos humanos, depois de estimuladas com SCF ("stem cell factor", que sensibiliza KIT), aumentaram seus níveis de *BCL2*, sugerindo relação entre as hiperexpressões destas duas proteínas, já que a mutação de *KIT* é comum na mastocitose. A diminuição na expressão de *BAX* em neoplasias humanas foi correlacionada, por exemplo, com a redução da sobrevida e a mortalidade por carcinomas de vesícula urinária (GONZALES-CAMPORA et al., 2007), mas não em carcinomas de células escamosas bucais (SAMPAIO-GÓES et al., 2005). A expressão de *BCL2* foi avaliada em tumores mamários caninos por Yang et al. (2006), que não encontraram correlação entre a mesma e a malignidade.

Trabalhos científicos relacionados à expressão dos genes da família *BCL2*, em oncologia veterinária, são ainda muito escassos e, ainda, não foram encontrados trabalhos referentes à expressão destes genes como indicadores prognósticos para mastocitomas cutâneos caninos. A compreensão destes mecanismos, através da caracterização das expressões e possíveis mutações dos genes envolvidos na apoptose, se faz necessária, pois torna mais racionais os tratamentos radio e quimioterápicos disponíveis atualmente, já que, na sua grande maioria, envolvem a morte das células-alvo por apoptose.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ORIGEM DO MATERIAL

Foram utilizadas 24 peças cirúrgicas colhidas e analisadas originalmente durante o trabalho de mestrado do doutorando Ricardo De Francisco Strefezzi (Tabela 1), assim como peças de novos casos de mastocitoma cutâneo, de 1998 a setembro de 2005, mas não empregados naquele primeiro estudo. Os casos foram atendidos no ambulatório cirúrgico do Hospital Veterinário da Universidade de São Paulo (HOVET-USP), Departamento de Cirurgia (VCI) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP), e nos Hospitais Veterinários da Universidade Bandeirante de São Paulo (UNIBAN) e Universidade Metodista de São Paulo (UMESP). As lesões foram confirmadas histologicamente como mastocitomas cutâneos caninos.

Tabela 1 – Distribuição dos casos de mastocitomas originalmente analisados durante o Mestrado de R. De F. Strefezzi, em função dos números de caso e registro, raça, sexo, idade dos animais e localização topográfica da neoplasia - São Paulo – 1998-2000

Registro Hospitalar	Número do caso*	Raça	Sexo	Idade (em anos)	Localização
41770	7	Boxer	M	9	I
52875-1	20	Boxer	F	9	A
52875-3	1	Boxer	F	9	A
79801	24	Fila	M	9	T
85729	12	SRD	M	13	I
87119-3	4	Schnauzer	M	8	T
90233-1	23	Boxer	F	8	E
90233-2	19	Boxer	F	8	E
93131	16	Doberman	M	9	E
93131-2	21	Doberman	M	9	E
93131-3	14	Doberman	M	9	E
93131-4	11	Doberman	M	9	E
93715	3	Schnauzer	F	9	I
93906-1	22	Boxer	F	9	T
93906-2	10	Boxer	F	9	T
94516	18	S.R.D.	M	n.d.	I
94868-2	9	Poodle	F	4	T
94868-3	6	Poodle	F	4	E
97565-1	5	Boxer	F	7	E
98104-1	15	Pinscher	F	7	E
100118-1	17	Dachshund	M	10	E
100118-2	13	Dachshund	M	10	E
100118-3	8	Dachshund	M	10	E
100118-4	2	Dachshund	M	10	E

I = inguinal/perineal; T = torácica; E = extremidade/membro; A = abdominal; M = macho; F = fêmea; S.R.D. = sem raça definida; n.d. = não determinada; * cada lesão foi analisada como um caso independente.

3.2 INFORMAÇÕES CLÍNICAS E EVOLUÇÃO DOS CASOS

Os casos retrospectivos tiveram suas evoluções avaliadas através da análise de prontuários hospitalares e entrevistas com os proprietários dos animais e médicos veterinários responsáveis. A evolução do quadro clínico dos novos pacientes, incluindo recidiva, tempo de sobrevida e óbito (natural ou induzido), foi acompanhada através de exames clínicos nas consultas de retorno aos Hospitais Veterinários.

Durante o exame clínico-físico foram consideradas as seguintes informações sobre as lesões:

- dimensões em centímetros: largura x comprimento x altura.
- Localização: cabeça/pescoço, torácica, abdominal, inguinal/perineal ou extremidades/membros.
- Consistência: macia, firme, flutuante ou mista.
- Características da superfície: lisa, verrucosa ou irregular.
- Aderência a planos profundos: sim, parcial; sim, total; ou não.
- Ocorrência de alopecia.
- Ocorrência de hiperpigmentação.
- Ocorrência de eritema.
- Ocorrência de sensibilidade.
- Ocorrência de ulceração.
- Tipo de base de inserção: pedunculada ou sésil.
- Temperatura local: aumentada, diminuída ou normal.

3.3 PROCESSAMENTO CITOPATOLÓGICO

O material destinado ao exame citopatológico foi colhido através de punção aspirativa por agulha fina (PAAF) utilizando-se agulhas de tamanho 13 x 4,5 (de insulina), 20

x 5,5 ou, ainda, através de raspado da superfície de corte de peças cirúrgicas. Duas lâminas foram fixadas ao ar e coradas por corante hematológico rápido, tipo panótico⁴.

A coloração de panótico foi realizada com dez banhos em cada um dos três reagentes, seguida de lavagem em água corrente para remoção do excesso de corantes, secagem ao ar e montagem com resina sintética e lamínula.

Outras oito lâminas foram obtidas, por meio de raspado da superfície de corte da peça cirúrgica, e fixadas em álcool absoluto por 24 horas. Parte das lâminas foi corada pelo método da Hematoxilina & Eosina para análise morfométrica nuclear, da seguinte maneira:

- hematoxilina - 6 minutos;
- álcool ácido (HCl a 1% em álcool 70%) - 1 passagem rápida;
- lavagem em água corrente por 15 minutos;
- eosina - 30 segundos;
- desidratação em álcool;
- diafanização em xilol;
- montagem com resina sintética Permount® e lamínula.

3.4 PROCESSAMENTO HISTOPATOLÓGICO

Após a colheita de material citopatológico, a peça cirúrgica foi fixada em solução de formaldeído a 10% por 48 horas. Dela foram retirados fragmentos e estes encaminhados ao Laboratório de Histopatologia do Departamento de Patologia da FMVZ-USP, onde sofreram processamento histológico de acordo com as técnicas rotineiras de inclusão em parafina. Cortes de aproximadamente 5 µm de espessura foram obtidos e corados pela técnica da Hematoxilina e Eosina (PROPHET et al., 1992). A coloração especial de Azul de Toluidina (PROPHET et al., 1992) e/ou a marcação positiva para KIT foram realizadas para a confirmação do diagnóstico de mastocitoma.

---

⁴ HEMATOCOR®, Biolog® – Biológica Comercial Ltda., São Paulo – SP - Brasil.

3.5 PROCEDIMENTOS IMUNOISTOQUÍMICOS

O processamento imunoistoquímico foi realizado pelo Laboratório de Patologia Celular e Molecular do Hospital Sirio-Libanês, baseando-se no método descrito por Hsu, Raine e Fanger (1981).

Os cortes histológicos de aproximadamente 4 µm, aderidos a lâminas silanizadas, foram desparafinados em estufa por 40 minutos a 75° C, seguido de 4 banhos de xilol, por 5 minutos cada. A reidratação foi realizada com 3 banhos em álcool absoluto, 4 mergulhos em cada banho; banhos em álcool graduado (95%, 80% e 50%), com 4 mergulhos em cada banho; e, finalmente, dois banhos em água destilada.

A recuperação de antígenos foi realizada por aquecimento dos cortes histológicos em solução tampão, por 30 minutos, a 95°C, em panela de vapor / "steamer"⁵. Para os anticorpos anti-PCNA, KIT e BAX foi utilizado tampão citrato com pH 6.0. Já para o anti-Ki67 o tampão foi EDTA, com pH 9.0.

Após resfriamento por 20 minutos no próprio tampão, as amostras foram lavadas em água corrente por 5 minutos e, em seguida, tratadas para bloqueio de peroxidase endógena, por 10 minutos, em solução de peróxido de hidrogênio a 3%, seguindo-se lavagem das lâminas em água corrente abundante. Os cortes histológicos foram, então, tratados com solução tampão Tris-HCl pH 7.6, e submetidas às incubações com anticorpos primários para Ki-67⁶ (1:50) e PCNA⁷ (1:100) por 12 horas ("over night"), e KIT⁸ (1:50) e BAX⁹ (1:100), por 30 minutos a 8°C. Após lavagem com tampão Tris-HCl pH 7.6, as mesmas foram incubadas com anticorpo secundário biotinilado¹⁰ por 20 minutos, seguido de nova lavagem em solução tampão e incubação com complexo estreptavidina-peroxidase¹¹ por 20 minutos e lavagem com tampão Tris-HCl pH 7.6.

A revelação foi realizada através da incubação de cada lâmina em 600 µl de solução contendo diaminobenzidina (12,5 mg de diaminobenzidina em 12,5 ml de tampão PBS e 200

---

⁵ Arno® Exotic®

⁶ Monoclonal, murino, anti-Ki67 humana, clone MIB-1, Dako Cytomation, Inc. – Carpinteria, CA, EUA.

⁷ Monoclonal, murino, anti-PCNA de rato, clone PC-10, Dako Cytomation, Inc. – Carpinteria, CA, EUA.

⁸ Policlonal, coelho, anti-CD117/c-Kit humana, Dako Cytomation, Inc. – Carpinteria, CA, EUA.

⁹ Policlonal, coelho, anti-Bax murino, clone P-19, Santa Cruz Biotechnology, Inc. – Santa Cruz, CA, EUA.

¹⁰ Biotinylated Link Universal, Kit LSAB® + System-HRP, Ref. K0690, Dako Cytomation, Inc. – Carpinteria, CA, EUA.

¹¹ Streptavidin-HRP, Kit LSAB® + System-HRP, Ref. 0690, Dako Cytomation, Inc. – Carpinteria, CA, EUA.

µl de peróxido de hidrogênio a 3%) por 10 minutos, seguida de lavagens com solução Tris-HCl pH 7.6 e água corrente.

A contracoloração foi realizada com Hematoxilina de Harris, por 2 minutos, seguida de lavagem em água corrente, passagem em água destilada com hidróxido de amônia a 0,2%, desidratação em banhos de álcool graduado (50%, 80% e 95%, 4 mergulhos em cada, e 3 banhos em álcool absoluto, com 4 mergulhos em cada), diafanização (4 banhos de Xilol) e montagem em resina sintética e laminula (HSU; RAINE; FANGER, 1981; SIMOES; SCHONING; BUTINE, 1994; GINN et al., 2000; JAFFE et al., 2000; HERING et al., 2001; SETOGUSHI et al., 2001; SAKAI et al., 2002; SOHN et al., 2003; TAKAHAMA JUNIOR et al., 2003).

Os controles positivos utilizados foram: linfonodos caninos, para Ki-67, PCNA e BAX; tumor estromal gástrico humano (GIST), para KIT.

3.6 GRADUAÇÃO HISTOPATOLÓGICA

Os mastocitomas foram classificados em graus I a III, de acordo com o nível de diferenciação celular (Figura 1). Os critérios de graduação adotados foram aqueles estabelecidos por Patnaik, Ehler e MacEwen (1984), e sumarizados no quadro 1. Para tanto, as neoplasias foram avaliadas histopatologicamente por 3 observadores de forma independente e sem conhecimento de informações clínicas dos animais, inclusive sobre lesões pertencentes a um mesmo animal. O grau histopatológico considerado como diagnóstico final foi aquele que se repetiu para dois ou mais observadores.

Quadro 1 – Distribuição das principais características microscópicas dos mastocitomas, em função da graduação histopatológica proposta por Patnaik, Ehler e MacEwen (1984)

Característica	GRAU I	GRAU II	GRAU III
Localização	Derme e espaços interfoliculares	Derme e/ou tecido subcutâneo, músculos ou tecidos adjacentes	Derme, Subcutâneo e tecidos adjacentes
Celularidade	Baixa	Moderada a alta	Alta
Distribuição/arranjo	Fileiras ou pequenos grupos	Grupos e estroma fibrovascular delicado	Grupos bem compactos
Pleomorfismo	Células redondas, monomórficas, com citoplasma amplo	Células redondas a ovaladas, células fusiformes dispostas difusamente	Células de tamanho médio, redondas, ovais ou fusiformes
Características citoplasmáticas	Limites citoplasmáticos distintos e contendo grânulos	Maioria com citoplasma distinto e grânulos finos, alguns com grânulos grandes e hipercromáticos	Citoplasma indistinto, com grânulos finos ou sem grânulos
Características Nucleares	Núcleos redondos, cromatina condensada	Núcleos redondos a indentados, cromatina difusa e nucléolos únicos	Núcleos vesiculosos, indentados a redondos, com um ou mais nucléolos proeminentes
Edema e Necrose	Mínimos	Áreas difusas	Comuns
Número de núcleos e células gigantes	Núcleo único e células gigantes raras ou ausentes	Células binucleadas ocasionais; células gigantes dispostas difusamente	Células binucleadas comuns; muitas células gigantes e multinucleadas
Estroma	-	Estroma fibrovascular mais espesso em algumas áreas e com áreas de hialinização	Estroma fibrovascular espesso e fibrocolágeno com áreas de hialinização
Figuras de Mitose	Células em mitose ausentes	Figuras de mitose raras, em número de 0 a 2 por campo de 40 aumentos	Figuras de mitose comuns, em número de 3 a 6 por campo de 40 aumentos

FONTE DOS DADOS BRUTOS: PATNAIK, A.K.; EHLER, W.J.; MacEWEN, E.G. Canine Cutaneous Mast Cell Tumor: Morphologic Grading and Survival Time in 83 Dogs. **Veterinary Pathology**, v.21, p.469-474, 1984.

Figura 1 – Fotomicrografias de mastocitomas representando a graduação histopatológica proposta de Patnaik, Ehler e MacEwen (1984): grau I ou bem-diferenciado [acima à esquerda]; grau II ou moderadamente diferenciado [acima]; e grau III ou pouco diferenciado [ao lado]. H&E, obj. 40x

3.7 Análise Morfométrica Nuclear

O material obtido através do processamento citopatológico, tanto o corado pelo panótico quanto pela H&E, foi analisado em microscópio¹² acoplado a um sistema de câmera digital¹³ e computador equipado com sistema para análise de imagens. O programa de análise de imagens utilizado foi o Image ProPlus®¹⁴. O computador utilizado era dotado de processador Pentium 4® Intel® de 3.0GHz, 1.0 GB de memória RAM e monitor¹⁵ de 19 polegadas.

Segundo Miguel (2000) Para cada caso, 200 núcleos (100 corados pelo panótico, 100 pela H&E), de células apresentando limites nucleares e citoplasmáticos nítidos, foram contornados traçando-se suas margens com o auxílio de um "mouse"¹⁶. O número de 100 células por tumor estudado foi determinado através de distribuição de Poisson, (comunicação pessoal)¹⁷.

Os parâmetros utilizados no presente estudo foram:

- área: equivalente à área do objeto;
- diâmetro médio: equivalente à média das medidas dos diâmetros mensurados a intervalos de 5 graus ao redor do centro do objeto;
- perímetro: equivalente à medida do perímetro do objeto.

3.8 Avaliação da Expressão de KIT

A avaliação da expressão de KIT foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Kiupel et al. (2004), classificando-se os mastocitomas em três padrões: (I) marcação predominante em membrana citoplasmática, com mínima marcação citoplasmática; (II) marcação intensa citoplasmática em focos, ou em pontilhados; e (III) marcação difusa citoplasmática, obscurecendo outras características citoplasmáticas (Figura 2). Cada mastocitoma foi classificado baseando-se na avaliação do padrão mais alto, presente em pelo menos 10% das células neoplásicas.

¹² Microscópio Trinocular Olympus® BX 50, Melville, NY, EUA.

¹³ Evolution MP®, 5.1 Megapixels, Media Cybernetics®, Silver Spring, MD, EUA.

¹⁴ versão 4.5 for Windows, Media Cybernetics®, Silver Spring, MD, USA

¹⁵ Modelo L1950HQ-SN, LG Eletrônicos®

¹⁶ Mouse óptico Logitech®, mod. MX310

¹⁷ MIGUEL, O. **Comunicação Pessoal**. São Paulo: Universidade Bandeirante de São Paulo - UNIBAN, 2000.

Figura 2 – Fotomicrografias de mastocitomas representando os padrões de expressão de c-kit, conforme proposto por Kiupel et al. (2004): padrão KIT-1, ou marcação predominantemente membranosa [acima à esquerda]; padrão KIT-2, marcação citoplasmática em focos ou pontilhados [acima]; e padrão KIT-3, marcação difusa citoplasmática, obscurecendo outras características [ao lado]. LSAB/diaminobenzidina, contracoloração com Hematoxilina de Harris, Obj. 40x

3.9 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE PROLIFERATIVA: PCNA E KI-67

As avaliações dos índices de proliferação celular com Ki-67 e PCNA foram realizadas através da determinação da porcentagem de núcleos positivos em um mínimo de 1000 núcleos por caso, em até 10 campos de alta frequência de marcação ("hot spots") à objetiva de 40 aumentos. Núcleos positivos e negativos foram quantificados manualmente com auxílio do software Image ProPlus®, através da ferramenta "Manual Tag". Foram considerados positivos todos os núcleos com evidências de marcação, mesmo que fraca, conforme realizado por outros (SIMOES; SCHONING; BUTINE, 1994; ABADIE; ARMADEILH; DELVERDIER, 1999; SAKAI et al., 2002; SCASE et al., 2006)(Figura 3).

Figura 3 – Fotomicrografias de mastocitomas representando imunorreatividade nuclear para PCNA [à esquerda] e Ki67 [à direita] (setas). Kit-LSAB®/diaminobenzidina, contracoloração com Hematoxilina de Harris, Obj. 40x

3.10 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE BAX

A expressão de BAX foi mensurada através de dois métodos: (1) escore misto, qualitativo e semi-quantitativo (SOINI et al., 2001; SAMPAIO-GÓES et al., 2005), e (2) escore simples, semi-quantitativo (GONZALEZ-CAMPORA et al., 2007), em 10 campos à objetiva de 40 aumentos. Os campos selecionados para a análise foram os de maior intensidade e/ou porcentagem de células marcadas para cada caso ("hot spots"), distantes das margens do corte histológico de modo a evitar marcações inespecíficas/artefatuais.

O método de escores mistos foi realizado através de determinação qualitativa (intensidade de coloração) e semi-quantitativa (porcentagem de núcleos positivos) à objetiva de 40 aumentos, segundo as seguintes escalas que, somadas, originam os escores abaixo descritos (SOINI et al., 2001; SAMPAIO-GÓES et al., 2005):

- Escala qualitativa: 0 = marcação ausente; 1 = fraca; 2 = moderada; 3 = intensa; 4 = muito intensa.
- Escala semi-quantitativa: 0 = marcação ausente; 1 = <25% de células apresentando citoplasma positivo; 2 = 25-50% de células apresentando citoplasma positivo; 3 = 50-75% de células apresentando citoplasma positivo; 4 = >75% de células apresentando citoplasma positivo
- Escores mistos: 0 = marcação ausente; 1 = imunorreatividade fraca (soma de escalas de 0 a 4); 2 = imunorreatividade intensa (soma de escalas de 5 a 8) (Fig. 4)

O método semi-quantitativo simples (GONZALEZ-CAMPORA et al., 2007) classificou os tumores em negativos para BAX, com menos de 25% das células marcadas, ou positivos, com marcação maior ou igual a 25% das células. Foram consideradas positivas todas as células com marcação citoplasmática, mesmo que de fraca intensidade (Figura 5).

Figura 4 – Fotomicrografias de mastocitomas representando imunorreatividade fraca/padrão Bax-1 [à esquerda]; e intensa/padrão Bax-2 [à direita], classificadas pelo método de escores mistos. LSAB/diaminobenzidina, contracoloração com Hematoxilina de Harris, Obj. 40x

Figura 5 – Fotomicrografias representando mastocitomas negativos para BAX [à esquerda], com <25% de positividade, e positivos [à direita], com ≥25% de positividade, classificados pelo método de escores simples. LSAB/diaminobenzidina, contracoloração com Hematoxilina de Harris, Obj. 40x

3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A relação entre os parâmetros morfométricos nucleares e a sobrevida foi verificada por teste de regressão linear. Em seguida, após estabelecimento de um valor arbitrário de corte para cada parâmetro, os padrões de sobrevida de dois grupos resultantes foram analisados pelo método de Kaplan-Meier seguido de "*logrank test*".

Os resultados obtidos nas marcações para Ki-67, PCNA, KIT, e BAX foram comparados aos graus histopatológicos através do Teste de Kruskal-Wallis, seguida de teste de múltiplas comparações de Dunn.

Verificou-se a associação destes indicadores, assim como da graduação histopatológica, com a mortalidade dos animais em função dos mastocitomas através do teste de Chi-quadrado para tendências ou Teste exato de Fisher, dependendo do número de grupos analisados. Compararam-se os escores de PCNA e Ki-67 entre animais que morreram ou não em função dos tumores pelo Teste de Mann-Whitney.

As correlações entre os indicadores prognósticos e o tempo de sobrevida foram analisadas pelo Teste de Spearman.

Posteriormente, os grupos de cada possível indicador foram analisados individualmente com relação ao tempo de sobrevida através do método de Kaplan-Meier seguido de "*logrank test*".

Os dados foram analisados com auxílio do software GraphPad Prism®¹⁸. O nível de significância foi estabelecido em 5%.

---

¹⁸ versão 4.02 for Windows, Graphpad Software, Inc. - San Diego, CA, USA.

4 RESULTADOS

4.1 Material Obtido

Foram analisados 93 mastocitomas em 74 cães. Destes, 37 eram machos e 37 fêmeas (50%). A raça mais freqüente foi a Boxer (29,7%, 22/74) seguida das raças Poodle (13,5%, 10/74) e Dachshund (5,4%, 4/74). As raças Fila Brasileiro, Labrador, Pastor Alemão, Pinscher e Schnauzer contavam com dois exemplares cada (2,7%, 2/74), e as Cocker Spaniel, Dobermann, Dogue Alemão, Pequinês e Rottweiler com um exemplar cada (1,35%, 1/74). Vinte e três cães eram sem raça definida (31%).

As lesões múltiplas estavam presentes em 14 animais (18,9%, 14/74). A localização mais comum foi extremidade/membros (36,5%, 34/93), seguida de tórax (22,6%, 21/93), região inguinal (17,2%, 16/93), abdômen (15%, 14/93) e cabeça/pescoço (6,5%, 6/93). Em dois casos não foi registrada a localização da lesão (2,2%, 2/93). A idade média dos pacientes foi de 9,2 anos, sendo que apenas um registro de idade não pode ser verificado. Os dados referentes à raça, sexo, idade dos animais e localizações das lesões encontram-se sumarizados na Tabela 1.

Tabela 1 - Distribuição dos casos de mastocitomas documentados em função dos números de caso e prontuário hospitalar, raça, sexo, idade dos animais e localização topográfica da neoplasia - São Paulo – 1998-2007. (continua)

Número	Registro Hospitalar	Raça	Sexo	Idade	Localização
1	52875-3	Boxer	F	9	A
2	100118-4	Dachshund	M	10	E
3	93715	Schnauzer	F	9	I
4	87119-3	Schnauzer	M	8	T
5	97565-1	Boxer	F	7	E
6	94868-3	Poodle	F	4	E
7	41770	Boxer	M	9	I
8	100118-3	Dachshund	M	10	E
9	94868-2	Poodle	F	4	T
10	93906-2	Boxer	F	9	T
11	93131-4	Doberman	M	9	E
12	85729	srd	M	13	I
13	100118-2	Dachshund	M	10	E
14	93131-3	Doberman	M	9	E
15	98104-1	Pinscher	F	7	E

Tabela 1 - Distribuição dos casos de mastocitomas documentados em função dos números de caso e prontuário hospitalar, raça, sexo, idade dos animais e localização topográfica da neoplasia - São Paulo - 1998-2007 (continuação)

Número	Registro Hospitalar	Raça	Sexo	Idade	Localização
16	93131	Doberman	M	9	E
17	100118-1	Dachshund	M	10	E
18	94516	srd	M	n.d.	I
19	90233-2	Boxer	F	8	E
20	52875-1	Boxer	F	9	A
21	93131-2	Doberman	M	9	E
22	93906-1	Boxer	F	9	T
23	90233-1	Boxer	F	8	E
24	79801	Fila	M	9	T
25	94085-1	srd	F	8	E
26	94085-4	srd	F	8	T
27	2415	Boxer	M	7	T
28	2420	srd	F	10	C
29	254	Boxer	M	4	E
30	2681	Rottweiler	M	10	E
31	2595	srd	M	7	I
32	3093	Cocker Spaniel	F	7	T
33	4083	srd	F	9	E
34	PL-1	srd	M	15	I
35	1869-1	Boxer	M	14	I
36	1869-2	Boxer	M	14	I
37	4388	srd	F	10	E
38	5053	Boxer	F	8	T
39	5389	Dachshund	M	12	A
40	5410	Boxer	M	8	I
41	M-199	Pequinês	F	13	E
42	M-1223	boxer	M	2	n.d.
43	M-1610	Pastor Alemão	M	8	E
44	M-1643	Poodle	F	10	A
45	M-1707	srd	F	8	E
46	M-2346	Poodle	M	7	E
47	M-2449	Pastor Alemão	F	10	C
48	M-2838	srd	F	7	E
49	M-2840	srd	M	10	C
50	M-3564	srd	F	16	I
51	M-3729	Boxer	F	9	T
52	M-3918-1	srd	F	13	E
53	M-3918-2	srd	F	13	E
54	M-4465	Poodle	M	11	T
55	M-4605	Poodle	F	6	A
56	M-4642	srd	F	14	A
57	M-4697	srd	F	5	T
58	M-4764	srd	M	13	I
59	M-5144	Pinscher	F	7	T
60	M-5625	Poodle	F	14	E
61	M-5961	Boxer	F	4	E
62	M-6209	Boxer	M	8	I
63	M-6432	Poodle	F	15	T

Tabela 1 - Distribuição dos casos de mastocitomas documentados em função dos números de caso e prontuário hospitalar, raça, sexo, idade dos animais e localização topográfica da neoplasia - São Paulo - 1998-2007 (conclusão)

Número	Registro Hospitalar	Raça	Sexo	Idade	Localização
64	M-6532	Boxer	M	6	T
65	M-6916	Boxer	M	10	E
66	M-6936	Boxer	F	6	E
67	M-7255	Dogue Alemão	M	6	E
68	M-7285	Poodle	M	7	E
69	M-7462	srd	F	8	A
70	M-8272-1	Boxer	F	8	A
71	M-8272-2	Boxer	F	8	I
72	M-8342	srd	M	13	I
73	M-8428	Boxer	M	8	A
74	M-11018	srd	M	7	C
75	M-11111	Labrador	F	9	n.d.
76	M-11941	Poodle	F	9	A
77	M-12618	Labrador	M	3	E
78	5284	Dachshund	F	7	T
79	4336	Fila Brasileiro	M	10	A
80	6490	srd	M	8	E
81	6146-1	Boxer	F	12	I
82	6146-2	Boxer	F	12	I
83	6568	srd	M	12	T
84	6838-1	Boxer	F	14	C
85	6838-2	Boxer	F	14	A
86	6838-3	Boxer	F	14	C
87	6887-2	srd	M	15	A
88	6874-1	Poodle	F	12	E
89	6874	Poodle	F	12	A
90	7272	srd	M	16	T
91	7287	Dachshund	M	12	T
92	7277-1	Boxer	M	5	T
93	7277-3	Boxer	M	5	T

I = inguinal/perineal; T = torácica; E = extremidade/membro; A = abdominal; M = macho; F = fêmea; srd = sem raça definida; n.d. = não determinada.

4.2 EVOLUÇÃO CLÍNICA DOS CASOS

A obtenção dos dados sobre o curso clínico de cada caso, realizada através da revisão de prontuários hospitalares dos animais estudados, foi finalizada em 30 de novembro de 2006. Os resultados sobre tal acompanhamento encontram-se sumarizados na tabela 2.

Tabela 2 – Distribuição dos casos de mastocitomas em função de suas Evoluções Clínicas - São Paulo – 1998-2006. (continua)

Caso	Registro Hospitalar	Primeira consulta	Cirurgia	Último contato	Recidiva	Metástase	Pós-cirúrgico (dias)	Status
1	52875-3	30/12/1998	29/1/1999	2/2/1999	NÃO	NÃO	3	OT
2	100118-4	13/7/1999	3/11/1999	15/6/2000	SIM	SIM	222	OT
3	93715	5/1/1999	21/1/1999	15/7/2005	NÃO	NÃO	2334	o
4	87119-3	1/10/1996	7/6/1999	14/6/1999	SD	SD	7	SD
5	97565-1	30/4/1999	27/5/1999	20/8/2004	NÃO	NÃO	1883	o
6	94868-3	5/2/1999	6/5/1999	6/10/2006	NÃO	NÃO	2670	vivo
7	41770	4/1/2000	19/1/2000	21/12/2001	NÃO	NÃO	692	o
8	100118-3	13/7/1999	3/11/1999	15/6/2000	SIM	SIM	222	OT
9	94868-2	5/2/1999	6/5/1999	6/10/2006	SIM	NÃO	2670	vivo
10	93906-2	8/1/1999	3/2/1999	22/2/2000	NÃO	NÃO	379	o
11	93131-4	24/2/1999	1/3/1999	12/5/1999	NÃO	NÃO	71	OT
12	85729	27/1/1999	12/2/1999	9/9/1999	SIM	NÃO	207	OT
13	100118-2	13/7/1999	3/11/1999	15/6/2000	SIM	SIM	222	OT
14	93131-3	24/2/1999	1/3/1999	12/5/1999	NÃO	NÃO	71	OT
15	98104-1	17/5/1999	15/6/1999	16/3/2002	NÃO	NÃO	991	o
16	93131	14/12/1998	20/1/1999	12/5/1999	SIM	NÃO	112	OT
17	100118-1	13/7/1999	3/11/1999	15/6/2000	SIM	SIM	222	OT
18	94516	27/1/1999	19/2/1999	19/2/2004	NÃO	NÃO	1800	o
19	90233-2	17/9/1998	24/5/1999	2/2/2000	NÃO	NÃO	248	OT
20	52875-1	30/12/1998	29/1/1999	2/2/1999	NÃO	NÃO	3	OT
21	93131-2	24/2/1999	1/3/1999	12/5/1999	NÃO	NÃO	71	OT
22	93906-1	8/1/1999	3/2/1999	22/2/2000	NÃO	NÃO	379	o
23	90233-1	17/9/1998	24/5/1999	2/2/2000	SIM	SIM	248	OT
24	79801	1/2/1999	12/2/1999	15/2/2003	NÃO	NÃO	1443	e
25	94085-1	6/10/2000	6/10/2000	13/11/2006	NÃO	NÃO	2197	o
26	94085-4	6/10/2000	6/10/2000	13/11/2006	NÃO	NÃO	2197	o
27	2415	8/3/2002	10/4/2002	10/4/2002	NÃO	SIM	0	ET
28	2420	11/3/2002	14/5/2002	18/2/2003	SIM	SIM	274	ET
29	254	24/7/2002	25/10/2002	30/11/2006	SIM	NÃO	1475	vivo
30	2681	6/5/2002	30/10/2002	15/7/2005	NÃO	NÃO	975	o
31	2595	12/4/2002	5/11/2002	22/11/2002	SIM	SIM	17	ET
32	3093	31/7/2002	11/4/2003	2/7/2003	SD	SD	81	SD
33	4083	24/2/2003	1/4/2003	27/10/2006	NÃO	NÃO	1286	vivo
34	PL-1	13/3/2003	14/3/2003	15/3/2003	NÃO	NÃO	1	ET
35	1869-1	21/3/2003	19/5/2003	20/10/2006	NÃO	NÃO	1231	vivo
36	1869-2	21/3/2003	19/5/2003	20/10/2006	NÃO	NÃO	1231	vivo
37	4388	1/12/2003	1/12/2003	15/8/2004	NÃO	NÃO	254	o
38	5053	22/1/2004	4/3/2004	22/6/2004	SD	SD	108	SD
39	5389	17/5/2004	30/6/2004	1/8/2006	SIM	SD	751	ET
40	5410	17/6/2004	1/7/2004	15/4/2005	NÃO	NÃO	284	o
41	M-199	31/10/2000	13/11/2001	4/7/2002	NÃO	NÃO	231	SD
42	M-1223	1/12/2000	21/9/2001	26/5/2006	NÃO	NÃO	1685	vivo
43	M-1610	19/2/2001	5/3/2001	3/9/2001	SIM	NÃO	178	ET
44	M-1643	22/10/2003	12/12/2003	28/9/2004	NÃO	NÃO	286	SD
45	M-1707	12/3/2001	2/5/2001	5/6/2003	NÃO	SD	753	ET
46	M-2346	19/1/2001	11/7/2001	19/10/2006	NÃO	NÃO	1898	vivo
47	M-2449	3/7/2001	19/7/2001	15/10/2004	NÃO	NÃO	1166	o
48	M-2838	27/11/2003	8/12/2003	23/10/2006	NÃO	NÃO	1035	vivo
49	M-2840	15/8/2001	29/8/2001	15/11/2003	NÃO	NÃO	796	o
50	M-3564	9/11/2001	20/11/2001	21/1/2002	SIM	NÃO	61	OT
51	M-3729	3/12/2001	11/12/2001	11/12/2001	SD	SD	0	SD
52	M-3918-1	19/12/2001	31/1/2002	17/3/2003	SIM	SIM	407	OT

Tabela 2 – Distribuição dos casos de mastocitomas em função de suas Evoluções Clínicas - São Paulo – 1998-2006 (conclusão)

Caso	Registro Hospitalar	Primeira consulta	Cirurgia	Último contato	Recidiva	Metástase	Pós-cirúrgico (dias)	Status
53	M-3918-2	19/12/2001	16/10/2002	17/3/2003	SIM	SIM	151	OT
54	M-4465	19/2/2002	20/5/2002	8/1/2003	SIM	SIM	228	ET
55	M-4605	5/8/2002	9/9/2002	10/12/2002	NÃO	NÃO	91	SD
56	M-4642	5/3/2002	19/3/2002	15/5/2004	NÃO	SD	776	o
57	M-4697	11/3/2002	20/3/2002	20/5/2006	NÃO	NÃO	1500	o
58	M-4764	19/3/2002	16/4/2002	24/11/2005	NÃO	NÃO	1298	o
59	M-5144	15/4/2002	3/6/2002	10/10/2002	SIM	SIM	127	ET
60	M-5625	20/5/2002	29/5/2002	25/11/2004	SIM	SIM	896	ET
61	M-5961	21/6/2002	3/7/2002	15/12/2005	NÃO	NÃO	1242	o
62	M-6209	15/7/2002	4/9/2002	15/12/2004	NÃO	NÃO	821	o
63	M-6432	2/8/2002	3/12/2003	5/1/2005	NÃO	NÃO	392	o
64	M-6532	9/8/2002	15/8/2002	27/8/2002	SD	SD	12	SD
65	M-6916	5/9/2002	22/10/2002	3/5/2004	NÃO	NÃO	551	o
66	M-6936	10/9/2002	20/9/2002	20/10/2006	NÃO	NÃO	1470	vivo
67	M-7255	30/7/2003	21/8/2003	21/12/2005	NÃO	NÃO	840	o
68	M-7285	2/10/2002	10/10/2002	20/10/2006	NÃO	NÃO	1450	vivo
69	M-7462	19/10/2002	6/11/2002	15/2/2004	NÃO	NÃO	459	o
70	M-8272-1	13/1/2003	21/2/2003	7/3/2003	SD	SD	16	SD
71	M-8272-2	13/1/2003	21/2/2003	7/3/2003	SD	SD	16	SD
72	M-8342	16/1/2003	4/2/2003	15/12/2003	NÃO	NÃO	311	o
73	M-8428	23/1/2003	18/2/2003	1/4/2005	SD	SD	763	vivo
74	M-11018	22/9/2003	7/10/2003	15/5/2004	SIM	NÃO	218	OT
75	M-11111	n.d.	n.d.	n.d.	SD	SD	n.d.	SD
76	M-11941	7/1/2004	21/1/2004	6/3/2004	NÃO	NÃO	45	o
77	M-12618	19/3/2004	29/3/2004	19/10/2006	NÃO	NÃO	920	vivo
78	5284	7/4/2004	9/4/2004	9/6/2004	NÃO	NÃO	60	OT
79	4336	14/4/2003	14/4/2003	1/4/2006	NÃO	NÃO	1067	o
80	6490	3/6/2005	7/7/2005	19/10/2006	NÃO	NÃO	462	vivo
81	6146-1	18/5/2005	15/6/2005	15/6/2005	NÃO	NÃO	0	ET
82	6146-2	18/5/2005	15/6/2005	15/6/2005	NÃO	NÃO	0	ET
83	6568	4/7/2005	18/8/2005	29/8/2005	SD	SD	11	SD
84	6838-1	28/10/2005	10/11/2005	26/12/2005	NÃO	NÃO	46	ET
85	6838-2	28/10/2005	10/11/2005	26/12/2005	NÃO	NÃO	46	ET
86	6838-3	28/10/2005	10/11/2005	26/12/2005	NÃO	NÃO	46	ET
87	6887-2	21/11/2005	1/12/2005	30/11/2006	NÃO	NÃO	359	vivo
88	6874-1	16/11/2005	29/11/2005	13/10/2006	NÃO	NÃO	314	o
89	6874	16/11/2005	29/11/2005	13/10/2006	NÃO	NÃO	314	o
90	7272	25/4/2006	15/5/2006	15/8/2006	SIM	SIM	90	OT
91	7287	25/4/2006	22/5/2006	3/10/2006	SIM	SD	131	vivo
92	7277-1	24/3/2004	8/5/2006	15/5/2006	SD	SD	7	SD
93	7277-3	24/3/2004	8/5/2006	15/5/2006	SD	SD	7	SD

OT = Óbito em função do tumor; o = óbito não relacionado ao tumor; ET = eutanásia em função do tumor; n.d. = não-determinado; SD = situação desconhecida

4.3 ANÁLISE CITOMORFOMÉTRICA

Para a análise citomorfométrica foram selecionados 25 casos de mastocitomas. Os critérios para seleção foram: disponibilidade de amostras cito e histopatológicas, destinadas à análise morfológica e confirmação dos diagnósticos de mastocitoma, respectivamente; e histórico clínico completo de pelo menos 365 dias pós-cirúrgico.

Dentre os 25 casos considerados completos (n^{os} 3, 5-7, 12, 15-18, 20, 22-25, 30, 33-35, 37, 39, 78-80, 84 e 90), dois deles apresentavam material citológico disponível apenas para uma coloração, totalizando 24 casos disponíveis para H&E e 24 para panótico.

A duração dos acompanhamentos clínicos variou de 379 a 2670 dias entre os animais censurados pela análise de Kaplan-Meier (animais vivos ao final do estudo, óbitos sem relação com o tumor e histórico clínico interrompido). A sobrevida pós-cirúrgica entre os animais que morreram ou foram submetidos à eutanásia em função dos mastocitomas variou de 3 a 751 dias, com média de 181 dias.

Os testes de regressão linear demonstraram relação entre o tamanho dos núcleos de mastócitos neoplásicos, incluindo os parâmetros área, diâmetro-médio e perímetro nucleares, mensurados em citopatologia tanto para as colorações de panótico quanto H&E, e o tempo de sobrevida dos animais (Figuras 6 a 8).

Figura 6 – Gráficos de Regressão Linear representando a relação entre a área nuclear, mensurada nas colorações de H&E e panótico, e o tempo de sobrevida dos animais ($p=0,0005$, $r^2=0,4304$; $p=0,0074$, $r^2=0,2836$); pontos = médias dos casos

Figura 7 – Gráficos de Regressão Linear representando a relação entre o diâmetro-médio nuclear, mensurada nas colorações de H&E e panótico, e o tempo de sobrevida dos animais ($p=0,0003$, $r^2=0,4495$; $p=0,0038$, $r^2=0,3222$); pontos = médias dos casos

Figura 8 – Gráficos de Regressão Linear representando a relação entre o perímetro nuclear, mensurada nas colorações de H&E e panótico, e o tempo de sobrevida dos animais ($p=0,0003$, $r^2=0,4486$; $p=0,0073$, $r^2=0,2841$); pontos = médias dos casos

4.3.1 Divisão em graus pela citomorfometria

Definindo-se um valor de corte para área ($52 \mu\text{m}^2$), diâmetro-médio ($8,06 \mu\text{m}$) e perímetro nuclear ($26,25 \mu\text{m}$) medidos em H&E, separamos os casos em mastocitomas de alto-grau (com médias maiores ou iguais ao o valor de corte) e de baixo-grau (com médias menores), para que fossem comparadas suas curvas de sobrevida (Figura 9). Tais valores foram escolhidos arbitrariamente entre a média e a mediana dos casos analisados, sem considerar a evolução clínica, de modo a evitarmos tendências/direcionamento na composição dos grupos. Os valores médios dos parâmetros estudados, para a coloração H&E, encontram-se listados na tabela 3.

Figura 9 – Fotomicrografias representando mastocitomas de baixo grau [à esquerda] e alto grau [à direita] segundo a análise morfométrica nuclear em lâminas de citopatologia. H&E, Obj. 100x

Tabela 3 – Distribuição das médias, desvios padrões, medianas, valores mínimos e máximos dos parâmetros morfométricos estudados na coloração H&E, em função da graduação citomorfométrica - São Paulo - 1999-2006

	Área (μm^2)	Diâmetro-médio (μm)	Perímetro (μm)
Baixo grau (n=13)			
Média $\pm$ DP	44.97 $\pm$ 6.60	7.48 $\pm$ 0.59	24.60 $\pm$ 1.81
Mínimo	28.67	5.94	19.92
Mediana	48.14	7.72	25.33
Máximo	51.59	8.05	26.20
Alto grau (n=11)			
Média $\pm$ DP	61.72 $\pm$ 12.06	8.72 $\pm$ 0.79	28.51 $\pm$ 2.57
Mínimo	52.29	8.06	26.29
Mediana	56.78	8.43	27.39
Máximo	91.64	10.65	34.86

n = número de casos.

Para a coloração de H&E obtivemos diferenças estatisticamente significantes entre os grupos ($p=0,0003$ para área, diâmetro-médio e perímetro nuclear). Dentre os casos considerados de baixo-grau levando-se em conta a área, o diâmetro-médio, ou o perímetro nuclear, 84% dos animais sobreviveram mais de 2670 dias, enquanto que apenas 14% dos de alto-grau sobreviveram por período maior que 1231 dias (Figura 10).

Figura 10 - Gráficos de Curva de Sobrevida dos casos estudados em função da área, diâmetro-médio e perímetro nuclear de mastócitos neoplásicos com valores maiores (alto grau) ou menores (baixo grau) que $52\mu\text{m}^2$, $8,06\mu\text{m}$, e $26,25\mu\text{m}$, respectivamente, na coloração H&E ($p=0,0003$, logrank test). Pontos = dados censurados pela análise de Kaplan-Meier

Da mesma maneira, após a definição de valores de corte para a coloração panótico, sendo a área igual a $61\mu\text{m}^2$, diâmetro-médio igual a $8,75\mu\text{m}$ e perímetro nuclear $28,6\mu\text{m}$, procedemos à divisão em mastocitomas de baixo e alto graus. (Figura 11). Os valores médios dos parâmetros estudados, para a coloração panótico, encontram-se listados na tabela 4.

Figura 11 – Fotomicrografias representando mastocitomas de baixo grau [à esquerda] e alto grau [à direita] segundo a análise morfométrica nuclear em lâminas de citopatologia. Panótico, Obj. 100x

Tabela 4 – Distribuição das médias, desvios padrões, medianas, valores mínimos e máximos dos parâmetros morfométricos estudados na coloração panótico, em função da graduação citomorfométrica - São Paulo - 1999-2006

	Área (μm^2)	Diâmetro-médio (μm)	Perímetro (μm)
Baixo grau (n=13)			
Média $\pm$ DP	55.59 $\pm$ 3.04	8.41 $\pm$ 0.20	27.50 $\pm$ 0.72
Mínimo	49.20	8.00	26.06
Mediana	56.67	8.44	27.54
Máximo	59.08	8.53	28.57
Alto grau (n=11)			
Média $\pm$ DP	72.50 $\pm$ 12.42	9.47 $\pm$ 0.74	30.84 $\pm$ 2.43
Mínimo	61.16	8.82	28.62
Mediana	69.66	9.34	30.25
Máximo	100.96	11.14	36.19

n = número de casos.

Através da análise de sobrevida pelo método de Kaplan-Meier, as diferenças entre os grupos de alto e baixo-graus também foram estatisticamente significantes para área, diâmetro-médio e perímetro nucleares ($p=0,0002$, $p=0,0002$ e $p=0,0009$, respectivamente). Dentre os casos considerados de baixo-grau, 84% dos animais sobreviveram por mais de 2334 dias, enquanto que apenas 14% dos de alto-grau sobreviveram por períodos maiores que 1286 dias (Figura 12).

Figura 12 - Gráficos de Curva de Sobrevida dos casos estudados em função da área, diâmetro-médio e perímetro nucleares de mastócitos neoplásicos com valores maiores (alto grau) ou menores (baixo grau) que $61\mu\text{m}^2$, $8,75\mu\text{m}$ e $28,6\mu\text{m}$, respectivamente, na coloração panótico ($p=0,0002$, $p=0,0002$ e $p=0,0009$, respectivamente, logrank test). Pontos = dados censurados pela análise de Kaplan-Meier

Dos 24 animais acompanhados clinicamente, 11 morreram em função do tumor (11/24, 45,8%), sendo que a mortalidade para animais com mastocitomas de baixo grau foi de 15,4% (2/13) contra 81,8% (9/11) para os de alto grau. Houve diferenças estatisticamente significantes entre os grupos ($p=0,0031$) (Tabela 5).

Tabela 5 – Distribuição das taxas de mortalidade, relacionadas ou não aos mastocitomas, em função dos grupos segundo os parâmetros citomorfométricos nucleares à coloração de H&E e panótico. Porcentagens em relação aos totais de casos cada grupo - São Paulo - 1999-2006

	Morte relacionada ao tumor	Morte não-relacionada ao tumor	Vivos ao final do estudo	Total
Baixo grau	2 (15,4%)	9 (69,2%)	2 (15,4%)	13 (100,0%)
Alto grau	9 (81,8%)	0 (0,0%)	2 (18,2%)	11 (100,0%)
Total	11 (45,8%)	9 (37,5%)	4 (16,7%)	24 (100,0%)

* Teste exato de Fisher, $p=0,0031$

4.4 GRADUAÇÃO HISTOPATOLÓGICA E MARCADORES IMUNOISTOQUÍMICOS

Para melhor comparação entre os resultados, as análises da graduação histopatológica e dos marcadores imunoistoquímicos foram realizadas com os mesmos tumores e casos. Foram selecionados 28 mastocitomas presentes em 24 animais/casos (n° s: 1, 5-7, 9, 12, 15, 16, 19-24, 33, 39, 42, 46, 52, 54, 56, 57, 61, 65, 67, 68, 77 e 91). Os tumores foram selecionados de modo a representar os três graus histopatológicos, com base em qualidade do material histopatológico e presença de histórico clínico completo.

Para análise das taxas de mortalidade e de tempo de sobrevida, o grau histopatológico considerado para o caso foi o maior obtido entre as lesões, resultando na seguinte distribuição: 20,8% de casos de grau I (5/24), 54,2% de grau II (13/24) e 25,0% de (6/24) grau III.

Durante o período de acompanhamento clínico total, 70,8% (17/24) animais morreram, sendo que 41,2% dentre os óbitos (7/24) foram relacionados ao tumor. Nenhum animal com mastocitoma de grau I morreu em função da neoplasia, enquanto que 15,4% dos de grau II (2/13) e 83,4% dos de grau III (5/6)) tiveram seus óbitos relacionados à doença ($\chi^2=9,792$; $p=0,0018$) (Tabela 6).

Tabela 6 – Distribuição das taxas de mortalidade, relacionadas ou não aos mastocitomas, em função da graduação histopatológica proposta por Patnaik, Ehler e MacEwen (1984). Porcentagens em relação aos totais de casos para cada grau histopatológico - São Paulo - 1999-2006

	Morte relacionada ao tumor	Morte não-relacionada ao tumor	Vivos ao final do estudo	Total
Grau I	0 (0,0%)	4 (80,0%)	1 (20,0%)	5 (100,0%)
Grau II	2 (15,4%)	6 (46,2%)	5 (38,4%)	13 (100,0%)
Grau III	5 (83,4%)	0 (0,0%)	1 (16,6%)	6 (100,0%)
Total	7 (29,2%)	10 (41,6%)	7 (29,2%)	24 (100,0%)

*Teste de Chi-quadrado para tendências; $\chi^2=9,792$; $p=0,0018$; n = número de animais.

O tempo de sobrevida pós-cirúrgica dos animais analisados variou de 3 a 2670 dias, com média de 928 dias. Entre os animais que morreram em função dos mastocitomas, o tempo médio de acompanhamento pós-cirúrgico foi 279 dias. Houve correlação negativa entre o grau histopatológico e o tempo de sobrevida dos animais ($r=-0,6236$ e $p=0,0011$, Teste de Spearman). A análise de sobrevida em função dos graus histopatológicos revelou diferenças extremamente significantes entre os grupos ($p<0,0001$). Dentre os casos considerados de grau I, 100% dos animais sobreviveram por mais de 2670 dias, enquanto que 84% dos de grau II sobreviveram por períodos maiores que 1868 dias e nenhum dos de grau III sobreviveu por mais de 751 dias, com mediana de sobrevida de 207 dias (Figura 13).

Figura 13 - Gráfico de Curva de Sobrevida dos casos estudados em função da graduação histopatológica baseada na proposta de Patnaik, Ehler e MacEwen (1984) ($p<0,0001$, logrank test). Pontos = dados censurados pela análise de Kaplan-Meier

4.4.1 Expressão de KIT

Verificou-se expressão dos padrões KIT-1 em seis tumores (6/28, 21,4%), sendo três de grau histopatológico I (50%) e três de grau II (50%); KIT-2 em 16 tumores (16/28, 57,1%), sendo três tumores de grau I (18,8%), 7 de grau II (43,7%) e 6 de grau III (37,5%); e KIT-3 em 6 tumores (6/28, 21,4%), sendo 5 de grau II (83,3%) e um de grau III (16,7%) (Tab. 7). Através de Análise de Variância pelo Teste de Kruskal-Wallis, seguido de pós-teste de Dunn entre os grupos, não foram detectadas diferenças estatisticamente significantes entre os graus histopatológicos em relação aos padrões de expressão de KIT ($p=0,1167$ e $p>0,05$).

Tabela 7 – Distribuição dos mastocitomas analisados para a expressão de KIT em função da graduação histopatológica - São Paulo - 1999-2006

	Grau I	Grau II	Grau III	Total
Padrão KIT-1	3	3	0	6
Padrão KIT-2	3	7	6	16
Padrão KIT-3	0	5	1	6
Total	6	15	7	28

Seis animais com padrão KIT-2 (6/7, 85,7%) e um com padrão KIT-3 (1/7, 14,3%) vieram a óbito ou foram submetidos à eutanásia em função da doença (Tabela 8). A análise estatística com teste de Chi-quadrado para tendências não detectou associação entre o padrão de marcação para KIT e a mortalidade relacionada ao tumor ($\chi^2=0,4840$; $p=0,4866$). Quando os padrões KIT-2 e KIT-3 foram considerados um único grupo, também não houve diferenças estatisticamente significantes entre os grupos ($p=0,2721$) (Tabela 9). Quando os três grupos foram analisados de forma independente quanto à sobrevida, a análise de Kaplan-Meier, seguida de "logrank test" não revelou diferenças estatisticamente significantes ($p=0,2076$), o mesmo acontecendo quando comparamos o padrão KIT-1 com os padrões 2 e 3 agrupados ($p=0,1337$) (Figura 14).

Tabela 8 – Distribuição das taxas de mortalidade, relacionadas ou não aos mastocitomas, em função dos padrões de marcação imunoistoquímica para KIT (segundo KIUPEL et al., 2004). Porcentagens em relação aos totais de casos para cada padrão de marcação - São Paulo - 1999-2006

	Morte relacionada ao tumor	Morte não-relacionada ao tumor	Vivos ao final do estudo	Total
KIT-1	0 (0,0%)	2 (40,0%)	3 (60,0%)	5 (100,0%)
KIT-2	6 (42,8%)	6 (42,8%)	2 (14,4%)	14 (100,0%)
KIT-3	1 (20,0%)	2 (40,0%)	3 (40,0%)	5 (100,0%)
Total	7 (29,2%)	10 (41,6%)	7 (29,2%)	24 (100,0%)

*Teste de Chi-quadrado para tendências; $\chi^2=0,4840$; $p=0,4866$

Tabela 9 – Distribuição das taxas de mortalidade, relacionadas ou não aos mastocitomas, em função do padrão de marcação imunoistoquímica para KIT (segundo KIUPEL et al., 2004), com agrupamento dos padrões KIT-2 e KIT-3. Porcentagens em relação aos totais de casos para cada padrão de marcação - São Paulo - 1999-2006

	Morte relacionada ao tumor	Morte não-relacionada ao tumor	Vivos ao final do estudo	Total
KIT-1	0 (0,0%)	2 (40,0%)	3 (60,0%)	5 (100,0%)
KIT-2/3	7 (36,8%)	8 (42,1%)	4 (21,1%)	19 (100,0%)
Total	7 (29,2%)	10 (41,6%)	7 (29,2%)	24 (100,0%)

* Teste exato de Fisher, $p=0,2721$

Figura 14 - Gráficos de Curva de Sobrevida dos casos estudados em função da marcação imunoistoquímica para KIT (KIT-1 x KIT-2 x KIT-3) ou agrupando-se os padrões 2 e 3 ($p=0,2076$ e $p=0,1337$, respectivamente, logrank test). Pontos = dados censurados pela análise de Kaplan-Meier

4.4.2 Expressão de BAX

Quando utilizado o método de escores mistos para classificação da expressão de BAX, verificou-se expressão do padrão Bax-1 (marcação fraca) em 60,7% dos tumores (17/28), sendo 35,3% de grau histopatológico I (6/17), 47,1% de grau II (8/17) e 17,6% de grau III (3/17); e Bax-2 (marcação intensa) em 39,3% dos tumores (11/28), sendo 63,7% de grau II (7/11) e 36,3% de grau III (4/11). Quando utilizado o método de escores simples, as distribuições de classificação mudaram para: BAX-1 (<25% das células) em 60,7% dos tumores (11/28), sendo 9,1% de grau I (1/11), 63,7% de grau II (7/11) e 27,2% de grau III (3/11); e BAX-2 ($\geq$ 25% das células) em 60,7% dos tumores (17/28), sendo 29,4% de grau I (5/17), 47,1% de grau II (8/17) e 23,5% de grau III (4/17) (Tab. 10). Não foram identificadas diferenças estatisticamente significantes entre os graus histopatológicos em relação aos escores de bax, quando analisados pelos métodos misto ou simples, através de Teste de Kruskal-Wallis ($p=0,3216$ e $p=0,4477$, respectivamente), seguido de pós-teste de Dunn entre os grupos ($p>0,05$).

Tabela 10 – Distribuição dos mastocitomas analisados para expressão de BAX segundo Escore Misto (qualitativo e semi-quantitativo) e Escore Simples (semi-quantitativo) em função da graduação histopatológica - São Paulo - 1999-2006

		Grau I	Grau II	Grau III	Total
Escore	Bax-1	6	8	3	17
Misto	Bax-2	0	7	4	11
Escore	BAX-1	1	7	3	11
Simples	BAX-2	5	8	4	17
Total		6	15	7	28

Dos animais que morreram em função dos mastocitomas, três animais apresentavam tumores com padrão Bax-1 (3/7, 42,8%) e 4 com padrão Bax-2 (4/7, 44,4%), quando utilizados os escores mistos. Para os escores simples a distribuição foi a mesma: BAX-1 em 3 casos e BAX-2 em 4 casos (Tabela 11), sem diferenças estatisticamente significantes para a mortalidade em função dos mastocitomas entre os grupos ($p=0,3564$ e $p=1,000$, respectivamente).

Quando os dois grupos foram analisados de forma independente quanto à sobrevida, a análise de Kaplan-Meier, seguida de "logrank test" não revelou diferenças estatisticamente significantes, em ambos os tipos de escores/análises ($p=0,2973$ e $p=0,7177$, respectivamente)(Figura 15).

Tabela 11 – Distribuição das taxas de mortalidade, relacionadas ou não aos mastocitomas, em função do padrão de marcação imunoistoquímica para BAX segundo os escores Misto (qualitativo e semi-quantitativo) e Simples (semi-quantitativo). Porcentagens em relação aos totais de cada padrão de marcação - São Paulo - 1999-2006

		Morte relacionada ao tumor	Morte não-relacionada ao tumor	Vivos ao final do estudo	Total
Escore	Bax-1	3 (20,0%)	6 (40,0%)	6 (40,0%)	15 (100,0%)
Misto*	Bax-2	4 (44,4%)	4 (44,4%)	1 (11,2%)	9 (100,0%)
Escore	BAX-1	3 (30,0%)	2 (20,0%)	5 (50,0%)	10 (100,0%)
Simples ^s	BAX-2	4 (28,6%)	8 (57,1%)	2 (14,3%)	14 (100,0%)
	Total	7 (29,2%)	10 (41,6%)	2 (29,2%)	24 (100,0%)

* Teste exato de Fisher, $p=0,3564$; ^s Teste exato de Fisher, $p=0,5928$

Figura 15 - Gráficos de Curva de Sobrevida dos casos estudados em função da marcação imunoistoquímica para BAX, divididos segundo os tipos de Escores, Misto ou Simples ($p=0,2973$ e $p=0,7177$, respectivamente, logrank test). Pontos = dados censurados pela análise de Kaplan-Meier

4.4.3 Marcadores de Proliferação Celular: PCNA e Ki-67

4.4.3.1 PCNA

Estavam disponíveis para análise de marcadores de proliferação 27 mastocitomas presentes em 23 animais/casos (n^{os}: 1, 5-7, 9, 12, 15, 16, 19-24, 33, 39, 46, 52, 54, 56, 57, 61, 65, 67, 68, 77 e 91).

Para análise de mortalidade e de tempo de sobrevida, os valores de PCNA e Ki-67 considerados foram os maiores obtidos entre as lesões.

A porcentagem média de núcleos positivos para PCNA (escores de PCNA) foi de $22,4 \pm 19,4\%$, sendo $28,2 \pm 23,2\%$ (n=7) entre os que morreram em função do tumor e $19,8 \pm 17,8\%$ (n=16) entre os que não tiveram seus óbitos relacionados com a neoplasia. Não houve diferenças estatisticamente significantes entre os dois grupos (p=0,4830, Teste de Mann-Whitney). Apesar disso, foi encontrada correlação negativa entre os escores de PCNA e a sobrevida (r=-0,4230 e p=0,0443, Teste de Spearman), mas sem linearidade nesta relação (r²=0,1406, p=0,0779, regressão linear) (Figura 16).

Quando comparados os escores de PCNA entre os graus histopatológicos, não foi encontrada diferença estatisticamente significativa (p=0,0607, Teste de Kruskal-Wallis; p>0,05, pós-teste de Dunn entre grupos).

4.4.3.1.1 Divisão em grupos pelos escores de PCNA

Os casos foram divididos em dois grupos, definidos a partir da escolha de um valor arbitrário de corte entre a média e a mediana de todos os escores de PCNA: PCNA<22, com menos de 22% de células positivas; e PCNA≥22, com positividade maior ou igual a 22% (Tabela 12). A análise de sobrevida dos grupos não revelou diferenças estatisticamente significantes (p=0,3498) (Figura 16).

Tabela 12 – Distribuição das médias, desvios padrões, medianas, valores mínimos e máximos dos grupos de mastocitomas em função das porcentagens de células positivas para PCNA - São Paulo - 1999-2006

	PCNA<22	PCNA≥22
n	12	11
Média ± DP	7,9± 6,4	38,1 ± 0,2
Mínimo	1,9	23,2
Mediana	5,5	32,8
Máximo	21,9	67,3

Figura 16 - Gráficos de Regressão Linear, representando a relação entre a porcentagem de células positivas para PCNA e a sobrevida ($r^2=0,1406$, $p=0,0779$, pontos = médias dos casos); e de Curva de Sobrevida dos casos estudados em função escores de PCNA, PCNA<22 ou PCNA≥22 ($p=0,3498$, logrank test; pontos = dados censurados pela análise de Kaplan-Meier)

4.4.3.2 Ki-67

A porcentagem média de núcleos positivos para Ki-67 (escores de Ki67) foi de $6,6 \pm 6,3\%$, sendo $9,4 \pm 6,0\%$ ($n=7$) entre os que morreram em função do tumor e $5,4 \pm 6,2\%$ ($n=16$) entre os que não tiveram seus óbitos relacionados com a neoplasia. Não houve diferenças estatisticamente significantes entre os dois grupos ($p=0,0713$, Teste de Mann-Whitney). Apesar disso, foi encontrada correlação negativa entre os escores de Ki67 e a sobrevida ($r=-0,6357$ e $p=0,0011$, Teste de Spearman) e relação linear entre as duas variáveis ($r^2=0,3019$, $p=0,0066$, regressão linear). O mesmo aconteceu quando comparados

aos escores de PCNA, com correlação entre as duas variáveis ($r = 0,6949$, $p < 0,0001$, Teste de Spearman) e linearidade na relação ($r^2 = 0,4685$, $p < 0,0001$) (Figura 17).

A comparação dos escores de Ki67 quando divididos com base nos graus histopatológicos revelou diferenças estatisticamente significantes ($p = 0,0168$, Teste de Kruskal-Wallis; $p < 0,05$, pós-teste de Dunn entre graus I e III).

4.4.3.2.1 Divisão em grupos pelos escores de Ki-67

De modo semelhante ao realizado para PCNA, os casos foram divididos em dois grupos: $Ki67 < 6,5$, com menos de 6,5% de células positivas; e $Ki67 \geq 6,5$, com positividade maior ou igual a 6,5% (Tab. 13).

Para os animais com escores $Ki67 < 6,5$, a taxa de mortalidade em função dos mastocitomas foi de 14,3% (2/14) contra 55,6% (5/9) para os casos de escore $Ki67 \geq 6,5$ ($p = 0,0657$) (Tab. 14).

Tabela 13 – Distribuição das médias, desvios padrões, medianas, valores mínimos e máximos dos grupos de mastocitomas em função das porcentagens de células positivas para Ki67 - São Paulo - 1999-2006

	Ki67<6,5	Ki67≥6,5
n	14	9
Média ± DP	2,3 ± 1,5	13,3 ± 4,8
Mínimo	0,0	7,0
Mediana	2,2	13,0
Máximo	6,1	21,8

Tabela 14 – Distribuição das taxas de mortalidade, relacionadas ou não aos mastocitomas, em função dos escores de Ki67. Porcentagens em relação aos totais de casos cada padrão de marcação - São Paulo - 1999-2006

	Morte relacionada ao tumor	Morte não-relacionada ao tumor	Vivos ao final do estudo	Total
Ki67<6,5	2 (14,3%)	8 (57,1%)	4 (28,6%)	14 (100,0%)
Ki67≥6,5	5 (55,6%)	2 (22,2%)	2 (22,2%)	9 (100,0%)
Total	7 (30,4%)	10 (43,5%)	6 (26,1%)	23 (100,0%)

* Teste exato de Fisher, $p = 0,0657$

Figura 17 - Gráficos de Regressão Linear representando a relação entre a porcentagem de células positivas para Ki-67 e a sobrevida ($r^2=0,3019$, $p=0,0066$, pontos = médias dos casos); e a relação entre as porcentagens de células positivas para PCNA e Ki-67 ($r^2= 0,4685$, $p<0,0001$), pontos = médias dos casos)

A sobrevida de animais do grupo $Ki67<6,5$ foi significativamente maior que a do grupos $Ki67\geq 6,5$ ($p= 0,0089$). Porém, o índice não foi capaz de distinguir entre mastocitomas de grau II mais ou menos agressivos ($p=0,5436$) (Figura 18).

Figura 18 - Gráficos de Curva de Sobrevida dos casos estudados em função escores de Ki67, $Ki67<6,5$ ou $Ki67>6,5$ para a totalidade dos animais ($p=0,0089$, logrank test) e dos casos de mastocitomas de grau II ($p=0,5436$, logrank test; pontos = dados censurados pela análise de Kaplan-Meier)

5 DISCUSSÃO

5.1 MATERIAL OBTIDO E ACOMPANHAMENTO CLÍNICO

O material utilizado no presente estudo teve sua origem nas casuísticas de diferentes Hospitais Veterinários: da Universidade de São Paulo (USP), Universidade Bandeirante de São Paulo (UNIBAN) e Universidade Metodista de São Paulo (UMESP). Parte das informações foi obtida por estudo retrospectivo, através de material de arquivo, e outra parte por análise foi obtida de forma prospectiva, com acompanhamento clínico dos animais em retornos posteriores ao procedimento cirúrgico.

Para que a opção de tratamento fosse pela intervenção cirúrgica e, desse modo, os casos incluídos neste trabalho, os pacientes tinham que apresentar poucas lesões, relativamente próximas umas às outras, critério seguido pelos cirurgiões. Ainda, o proprietário precisava consentir com tal procedimento e, por este motivo, alguns casos, para os quais foi dado o diagnóstico inicial de mastocitoma através da punção aspirativa, não puderam ser incluídos no estudo. Nossa casuística, então, não deve ser tomada como base para informações epidemiológicas, pois não abrange a totalidade de casos atendidos. As informações clínicas aqui apresentadas não serão discutidas do ponto de vista estatístico, mas sim com o intuito de reforçar, ou não, algumas impressões clínicas do médico veterinário.

A principal dificuldade encontrada durante o acompanhamento foi na obtenção de informações sobre o curso clínico dos animais, principalmente no que se refere à pesquisa telefônica. Em casos mais antigos, as informações de proprietários eram menos precisas, apesar da cordialidade em fornecer informações na grande maioria dos casos. Além disso, houve dificuldade quanto à mudança de endereços e, principalmente, troca de prefixos telefônicos ao longo do período de pesquisa. Esta última demandou, em alguns casos, vários dias, ou tentativas, de pesquisa para localização de animais e/ou proprietários. Porém, quando associadas aos dados registrados em prontuário hospitalar, puderam oferecer dados confiáveis para a maioria dos animais pesquisados.

Durante a pesquisa de informações clínicas em prontuários, pudemos vivenciar e relembrar a importância do preenchimento criterioso e cuidadoso das fichas de atendimento e acompanhamento clínico. Estas, por vezes, também eram incompletas e desorganizadas, mesmo em se tratando de Hospitais-escola, prejudicando não só a própria prática clínica/cirúrgica, como também a realização de pesquisas científicas, principalmente as retrospectivas. Devido a registros incompletos, houve dificuldade, por exemplo, na identificação de recidivas local ou regional, e presença de metástases.

Considerando a idade média de surgimento desta neoplasia em cães, em torno de 8,5 anos, e de uma expectativa de vida da espécie em torno de 14 anos, decidimos interromper os acompanhamentos clínicos em 30 de novembro de 2006, já que o número de casos com curso clínico completo era suficiente para as análises pretendidas, chegando a alcançar mais de seis anos de acompanhamento para alguns animais.

Ao todo foram obtidos 93 tumores em 74 cães. Destes, 58 apresentavam histórico clínico com informações adequadas à pesquisa. Dos casos com histórico clínico satisfatório, pesquisou-se, então, a qualidade dos materiais/tumores existentes. Neste sentido, encontramos problemas quanto à quantidade, fixação do material e qualidade da parafinização. Esta última foi notada principalmente em casos mais antigos, nos quais o ressecamento dos blocos histológicos dificultava a obtenção de cortes finos e, principalmente, a aplicação das técnicas imunoistoquímicas com qualidade suficiente.

Nossos resultados corroboram dados anteriores que consideram as raças mais comumente afetadas as que possuem os Bulldogs como ancestrais, sendo que 29,7% dos animais neste estudo eram Boxers. Semelhantemente ao verificado por outros pesquisadores, não foi observada predisposição sexual para a neoplasia (HOTTENDORF; NIELSEN, 1967; BOSTOCK, 1973; HESS, 1977; PATNAIK; EHLER; MACEWEN, 1984; MACY, 1985; O'KEEFE, 1990; YAGER; SCOTT, 1993; ABADIE; ARMADEILH; DELVERDIER, 1999; GINN et al., 2000; JAFFE et al., 2000; STREFEZZI; XAVIER; CATÃO-DIAS, 2003).

Com relação à idade dos animais no momento do diagnóstico, houve variação entre 2 e 16 anos, com média de 9,2 anos, semelhantemente à relatada por outros (HOTTENDORF; NIELSEN, 1967; BOSTOCK, 1973; HESS, 1977; PATNAIK; EHLER; MACEWEN, 1984; MACY, 1985; O'KEEFE, 1990; YAGER; SCOTT, 1993; ABADIE; ARMADEILH; DELVERDIER, 1999; GINN et al., 2000; JAFFE et al., 2000; MISDORP, 2004).

Lesões múltiplas foram encontradas em 14 cães (18,9%), incidência maior que os 3 a 14% descritos em literatura (HESS, 1977; MACY, 1985; O'KEEFE, 1990; SIMOES et al, 1994). A localização mais comum foi em extremidades/membros, com 36,5% do total, mas, somando-se os tumores em tronco e períneo estes se tornam maioria (54,8%). No presente trabalho, 6,5% dos mastocitomas localizavam-se em região de cabeça/pescoço, contrapondo-se aos relatos em literatura onde 10 a 14,5% das lesões apresentavam esta localização (HESS, 1977; MACY, 1985; O'KEEFE, 1990; SIMOES et al, 1994; ABADIE; ARMADEILH; DELVERDIER, 1999; GINN et al., 2000), ou observados por nós em pesquisa anterior, quando não encontramos tumores nesta localização (STREFEZZI, 2001).

5.2 INDICADORES PROGNÓSTICOS

Ainda hoje, apesar de vários métodos terem sido testados como indicadores prognósticos para os mastocitomas cutâneos caninos, nenhum é mais amplamente utilizado que a tradicional graduação histológica (MACY, 1985; STREFEZZI; XAVIER; CATÃO-DIAS, 2003; MISDORP, 2004; MAIOLINO et al., 2005; KIUPEL et al., 2005). A mesma encontra-se embasada em características morfológicas de anaplasia. Diversos parâmetros, geralmente subjetivos, devem ser considerados para a graduação das lesões, conforme proposto pelo trabalho de Patnaik, Ehler e MacEwen (1984), conduzindo a variações inter e intraobservadores, tanto para os mastocitomas quanto para outras neoplasias (KOSS, 1992; MARCHEVSKY; ERLER, 1994; STREFEZZI; XAVIER; CATÃO-DIAS, 2003; KIUPEL et al., 2004; NORTHRUP et al., 2005). Por levar em conta características histológicas, o que requer biópsia incisional ou excisional para posterior processamento do material, a graduação histológica adiciona tempo e custos relativamente altos ao diagnóstico.

A graduação histológica das lesões ainda encontra desafios na avaliação de situações limítrofes entre os diferentes graus. Com relação aos mastocitomas, observa-se que parte dos tumores de grau II comporta-se como mastocitomas de grau I, enquanto que outros como de grau III. Isto significa que alguns tumores têm seus potenciais de agressividade subestimados, enquanto que outros recebem tratamentos potencialmente tóxicos de maneira desnecessária. Northrup et al. (2005) sugeriram que uma nova classificação, em

mastocitomas de alto ou baixo-grau seria mais consistente e de maior significado prognóstico.

5.2.1 Citomorfometria computadorizada

O exame citopatológico é um método prático, rápido, e de baixos custos para o diagnóstico de processos neoplásicos, principalmente no que se refere às neoplasias cutâneas de células redondas (DUNCAN; PRASSE, 1979; COWELL, 2003; SHELLEY, 2003). Células pobres em grânulos, como nos mastocitomas menos diferenciados, são mais facilmente reconhecidas na citopatologia que na histopatologia, por causa da maior resolução dos grânulos citoplasmáticos (DUNCAN; PRASSE, 1979; MISDORP, 2004). Portanto, a avaliação citopatológica tem sido considerada importante ao diagnóstico (MACY, 1985; MISDORP, 2004). A colheita de material, fixação e coloração das lâminas obtidas não demoram mais do que 30 minutos, dependendo do corante utilizado, obtendo-se o diagnóstico em poucas horas (TYLER et al., 1999; COWELL, 2003; SHELLEY, 2003). Além disso, as células sofrem menor influência durante a fixação e processamento do material, o que resulta em menor deformação de sua morfologia (DARDICK et al., 1984).

A morfometria computadorizada pode adicionar ao exame citopatológico valores numéricos capazes de aumentar sua objetividade, tornando o método reprodutível e potencializando seu valor diagnóstico (DARDICK; PAYNE, 1992; HAMILTON; ALLEN, 1995; ELDAR et al., 1999; IKEGUSHI et al., 1999). Em pouco tempo as imagens são digitalizadas e, posteriormente, contornam-se os núcleos com auxílio de um "mouse", o que não torna esta uma tarefa demorada, nem excessivamente trabalhosa. Entre suas desvantagens estão a necessidade de equipamentos de custo relativamente elevado, como microscópio acoplado a uma câmera, e um computador dotado de software para análise morfométrica. Porém, métodos mais simples como o uso de objetivas com escalas gravadas, ou ainda a comparação de dimensões das células neoplásicas com referências, como por exemplo, às hemácias, podem ser adaptados para torná-lo mais factível. Aproximadamente em duas horas, entre a colheita da amostra citológica e a análise morfométrica finalizada, foi possível obter um diagnóstico citomorfométrico confiável, enquanto que, pelo método

histopatológico seguido da graduação tradicional, o procedimento completo tomaria algo em torno de 48 horas. Além disso, este último seria mais custoso devido às necessidades de biópsia/intervenção cirúrgica com anestesia/sedação, e laboratório de histologia com diversos equipamentos para processamento das lâminas.

No presente trabalho, os dados citomorfométricos indicaram correlação entre as dimensões nucleares e a sobrevida de animais tratados cirurgicamente. Os tempos de sobrevida são significativamente menores quanto maiores a área ($p=0,0005$, H&E; $p=0,0074$, panótico), o diâmetro-médio ($p=0,0003$, H&E; $p=0,0038$, panótico) e o perímetro dos núcleos ($p=0,0003$, H&E; $p=0,0073$, panótico) (Figuras 6 a 8). Estes resultados corroboram dados preliminares de nosso grupo (STREFEZZI; XAVIER; CATÃO-DIAS, 2003), posteriormente confirmados por Maiolino et al. (2005) que, por sua vez, testaram a relação da análise morfométrica em cortes histológicos com a graduação de Patnaik, Ehler e MacEwen (1984). Ainda, os atuais resultados conferem aos parâmetros citomorfométricos independência na previsão da sobrevida em relação ao método histológico. Apesar do pequeno número de casos analisados, nossos pacientes foram acompanhados clinicamente por longo tempo, com um período mínimo de observação de 365 dias (média de 856, máximo de 2670 dias), o que, acreditamos, torna as análises de sobrevida consistentes.

Com a finalidade de determinar o valor prognóstico da citomorfometria nuclear de mastocitomas cutâneos quanto à sobrevida dos animais, procedemos, então, a divisão dos casos analisados em dois grupos: baixo e alto-grau. Os valores de corte foram estabelecidos arbitrariamente, escolhendo-se um valor entre a média e mediana do total de casos. Tal procedimento permitiu observar que o tempo de sobrevida de animais com mastocitomas classificados como alto-grau foram menores que os dos de baixo-grau. Foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre as curvas de sobrevida, em ambos os métodos de coloração, quando comparadas as áreas, diâmetros-médios ou perímetros nucleares de cada grupo ($p=0,0003$, para HE; $p=0,0002$, $p=0,0002$ e $p=0,0009$, respectivamente, para panótico) (Figuras 10 e 12). A mensuração citomorfométrica também foi capaz de indicar sobre a mortalidade em função da neoplasia: 15,4%, para mastocitomas de baixo grau, contra 81,8% para os de alto grau ($p=0,0031$) (Tabela 5).

5.2.2 Indicadores Imunoistoquímicos

De modo a facilitar a comparação entre a graduação histopatológica e os marcadores imunoistoquímicos, foram utilizados os mesmos casos para todas as análises, com exceção de um (caso 42), para o qual não obtivemos sucesso nas técnicas imunoistoquímicas para PCNA e Ki-67.

5.2.2.1 Expressão de KIT

As alterações na expressão do gene *KIT* em mastócitos caninos têm sido objeto de vários estudos nos últimos anos (LONDON et al., 1996; LONDON et al., 1999; MA et al., 1999; REGUERA et al., 2000; ZEMKE; YAMINI; YUZBASIYAN-GURKAN, 2002; KIUPEL et al., 2004; RIVA et al., 2005; WEBSTER et al., 2007). Mutações têm sido responsabilizadas por causar ativação constitutiva do receptor, levando à proliferação descontrolada das células, e pelo potencial agressivo dos tumores (MA et al., 1999; LONDON et al., 1999; ZEMKE; YAMINI; YUZBASIYAN-GURKAN, 2002). Reguera et al. (2000) identificaram o aumento da expressão de KIT quanto menor a diferenciação tumoral. Alguns anos depois, Kiupel et al. (2004) propuseram nova classificação dos mastocitomas cutâneos caninos segundo o padrão de marcação imunoistoquímica para KIT, sendo os padrões KIT-2 e KIT-3 relacionados a menores períodos de sobrevida.

Nossos resultados se contrapõem aos obtidos por Kiupel et al. (2004). Não houve relação entre os graus histopatológicos de Patnaik, Ehler e MacEwen (1984) e os padrões morfológicos de marcação imunoistoquímica para KIT ($p=0,1167$), apesar de não encontrarmos mastocitomas de grau I com padrão KIT-3 e grau III com padrão KIT-1 (Tabela 7). Os padrões KIT-2 e KIT-3, relacionados a comportamentos mais agressivos, não foram indicadores para morte em função do tumor quando analisados individualmente ($p=0,4840$), nem quando agrupados ($p=0,2721$), o mesmo ocorrendo com as análises de sobrevida ($p=0,2076$ e $p=0,1337$, respectivamente) (Tabelas 8 e 9).

Um fator que poderia justificar a incapacidade em reproduzirmos os resultados obtidos por Kiupel et al. (2004), mais tarde confirmados pelo mesmo grupo de

pesquisadores (WEBSTER et al., 2007), seria o tamanho de nossa amostragem. Contudo, apesar do menor número de casos por nós analisados (n=24), a distribuição dos graus histopatológicos (21% de grau I, 54% de grau II e 25% de grau III) se aproxima mais da relatada por Patnaik, Ehler e MacEwen (1984): 36% de grau I, 43% de grau II e 20% de grau III. Além disso, no presente estudo, os grupos KIT-2, KIT-3 e KIT-2/3 também não atingiram a mediana de sobrevida (Figura 14).

Na classificação proposta por Kiupel et al. (2004) foram utilizados 100 casos de mastocitomas, sendo a grande maioria deles (89%) dos graus histopatológicos I e II (17 e 72 animais, respectivamente). Além disso, em nenhum dos padrões de KIT atingiu-se a mediana de sobrevida pela análise de Kaplan-Meier, ou seja, menos de 50% dos animais morreram em função da doença, podendo tratar-se de uma amostra que continha, predominantemente, mastocitomas menos agressivos, ou, alternativamente, ser este um método que não consegue separar os mastocitomas de grau II mais malignos. Aproximadamente 60% dos animais com padrão KIT-3 atingiram tempos de sobrevida de 20 meses (600 dias) ou mais, alguns sendo acompanhados por mais de 40 meses (1200 dias) (KIUPEL et al., 2004).

Outra possibilidade seria com relação à classificação em padrões KIT-1, KIT-2 e KIT-3. Segundo a proposta original, os mastocitomas devem ser graduados pelo maior padrão presente em pelo menos 10% das células. Esta avaliação, realizada de forma semi-quantitativa, pode levar a variações interobservador que influenciariam, desta maneira, os resultados obtidos.

5.2.2.2 Expressão de BAX

A apoptose, um mecanismo de “morte celular organizada”, caracteriza-se pela ativação de genes e enzimas específicas levando à fragmentação do DNA e formação de corpos apoptóticos. Sabe-se que a cascata de enzimas caspases é responsável pelos principais acontecimentos, sendo ativadas após liberação no citoplasma da citocromo C mitocondrial, fenômeno resultante de efeitos predominantes de BAX sobre BCL2, que dão

origem a poros na membrana desta organela (BURLACU, 2003; KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005; ADAMS; CORY, 2007; MADDIKA et al., 2007).

BAX é uma proteína cuja perda de expressão impede o desenvolvimento de vários tecidos por diminuir a remoção de células por apoptose durante sua formação, particularmente em neurônios. Sua localização é citoplasmática na maior parte do tempo, ou fracamente associada à membrana mitocondrial, provavelmente associada e inibida por BCL2. Quando fosforilada, se desliga de BCL2, forma oligômeros na membrana mitocondrial e permeabiliza a membrana da organela à citocromo C (ADAMS; CORY, 2007).

Defeitos na apoptose são responsáveis por prolongar a vida de células com mutações no DNA, além de favorecerem o surgimento de novas anomalias genéticas e dificultar a terapia anticâncer por conferir resistência celular a diversos métodos de tratamento. A diminuição na expressão de BAX em neoplasias humanas foi correlacionada, por exemplo, com a redução da sobrevida e a mortalidade por carcinomas de vesícula urinária (GONZALES-CAMPORA et al., 2007), mas não em carcinomas de células escamosas bucais (SAMPAIO-GÓES et al., 2005). Ainda, o aumento da expressão de BAX, foi relacionado a prognósticos sombrios em carcinomas de células escamosas esofágicos humanos (KURIBAYASHI et al., 2001).

A avaliação da expressão de BAX através da detecção imunoistoquímica, ainda inédita para os mastocitomas cutâneos caninos, foi realizada utilizando-se anticorpo monoclonal de coelho contra porção N-terminal de Bax de camundongo (clone P-19, sc-526, Santa Cruz Biotechnology, Inc.). Como as marcações variaram em intensidade e porcentagem de células positivas, optamos por utilizar dois tipos de análise: qualitativa e semi-quantitativa, e somente semi-quantitativa, aqui denominadas: Escore Misto e Escore Simples, respectivamente (SOINI et al., 2001; SAMPAIO-GÓES et al., 2005; GONZALEZ-CAMPORA et al., 2007). Não foram identificadas associações, em ambos os tipos de escores, entre a expressão de BAX e os graus histopatológicos ($p=0,3216$ e $p=0,4477$, respectivamente), assim como com a mortalidade em função dos mastocitomas ($p=0,3564$ e $p=1,000$, respectivamente) (Tabela 11). O mesmo se repetiu para as análises de sobrevida de Kaplan-Meier ($p=0,2973$ e $p=0,7177$, respectivamente) (Figura 15).

Os resultados aqui apresentados sugerem, preliminarmente, que variações na detecção imunoistoquímica de BAX não estão relacionadas com maior agressividade dos mastocitomas caninos. Acreditamos serem necessários, ainda, estudos com casuística

maior, além do que com outros grupos de animais para conclusões finais sobre a importância desta proteína. Faz-se necessária, também, a investigação da expressão de proteínas relacionadas a BAX, como a BCL2 que, uma vez hiperexpressa, anula os efeitos pró-apoptóticos por heterodimerização; alterações em outros níveis da cascata apoptótica; ou pequenas alterações moleculares em BAX que, mesmo hiperexpressa, poderia não exercer seus efeitos adequadamente, conforme observado por outros (MEIJERINK et al., 1998; ADAMS; CORY, 2007). O papel da apoptose ainda permanece um paradoxo em relação à progressão tumoral e merece investigação mais detalhada (BURLACU, 2003; GUROVA; GUDKOV, 2003; ANTIGNANI; YOULE, 2006; ADAMS; CORY, 2007; MADDIKA et al., 2007).

5.2.2.3 Marcadores de Proliferação: PCNA e Ki-67

Simoes, Schoning e Butine (1994) compararam o valor da graduação histopatológica proposta por Patnaik, Ehler e MacEwen (1984) e a fração marcada pelo PCNA como indicadores prognósticos. Para estes autores, a fração marcada por PCNA, em 5 campos de 40 aumentos, foi um bom indicador prognóstico quanto à sobrevida e recidiva. Já para Abadie, Armadeilh e Delverdier (1999) e Scase et al. (2006), o índice de PCNA foi maior nos animais que vieram a óbito em função do mastocitoma do que nos que sobreviveram mas, apesar disso, não foi demonstrada diferença estatisticamente significativa quando os casos foram agrupados com base nos graus histopatológicos, nem em relação ao tempo de sobrevida.

Apesar de estar correlacionado com a marcação para Ki-67 (Figura 17), acredita-se que a longa meia-vida de PCNA leve à superestimação da atividade proliferativa no tumor, sendo então necessários "cut-offs" para sua avaliação (ABADIE; ARMADEILH; DELVERDIER, 1999; MELO; ALVES, 1999; MADEWELL, 2001; SCASE et al., 2006). Certamente, tais limites/"cut-offs" adicionariam subjetividade e, conseqüentemente, maiores variações intra a interobservador na contagem de células positivas para PCNA. Por este motivo, optamos por considerar positivas quaisquer marcações, mesmo que tênues, assim como é realizado para o Ki-67.

Os resultados do presente estudo, em relação ao PCNA para mastocitomas, não são animadores, já que não detectamos diferenças estatisticamente significantes entre os animais que morreram ou não em função dos mastocitomas ($p=0,4830$), apesar de este marcador manter correlação com o tempo de sobrevida ($r=-0,4230$, $p=0,0443$). Também não foram encontradas relações significantes entre PCNA e graduação histopatológica e, quando estabelecidos valores de corte para divisão em dois grupos, as curvas de sobrevida não foram estatisticamente diferentes ($p=0,3498$) (Figura 16), corroborando resultados relatados por outros (ABADIE; ARMADEILH; DELVERDIER, 1999; SCASE et al., 2006).

Já para Ki-67, apesar de não detectadas diferenças entre animais que morreram ou não em função da doença, encontramos correlação entre os escores e sobrevida, com relação linear (Figura 17), e diferenças estatisticamente significantes entre os graus I e III ($p=0,0168$ e $p<0,05$). O agrupamento em escores maiores ou menores que 6,5% ($Ki67>6,5$ e $Ki67<6,5$), valor escolhido entre a média e a mediana do total de casos, resultou em indicadores confiáveis para mortalidade em função da doença (Tabela 14), assim como para a sobrevida pós-cirúrgica (Figura 18). Estes resultados corroboram os obtidos por outros em relação às análises com Ki-67 (ABADIE; ARMADEILH; DELVERDIER, 1999; SAKAI et al., 2002; SCASE et al., 2006).

Scase et al. (2006) afirmaram que a avaliação de Ki-67 pode ser útil, principalmente, na subdivisão de mastocitomas de grau II quanto à agressividade. Contudo, não encontramos diferenças significantes nas porcentagens de Ki-67 quando analisamos somente tumores deste grau para a sobrevida (Figura 18). Estas diferenças podem estar relacionadas com o número de animais analisados, sendo que em nosso trabalho estudamos 14 casos, enquanto Scase et al. (2006) analisaram 86. É possível que, se analisássemos uma amostra maior, talvez pudéssemos identificar dois grupos distintos entre os tumores de grau II em relação às porcentagens de células positivas para Ki-67.

5.2.3 Graduação Histopatológica de Patnaik, Ehler e MacEwen (1984)

Após 23 anos e, apesar de questionada por muitos (MACY, 1985; ABADIE; ARMADEILH; DELVERDIER, 1999; STREFEZZI; XAVIER; CATÃO-DIAS, 2003; KIUPEL et al., 2004;

MISDORP, 2004; NORTHRUP et al., 2005; SCASE et al., 2006; ROMANSIK et al., 2007; WEBSTER et al., 2007), a tradicional graduação histopatológica de Patnaik, Ehler e MacEwen (1984) é, ainda, o método que obtém os melhores resultados na previsão do comportamento de mastocitomas cutâneos caninos.

A mortalidade relacionada ao tumor aumentou conforme o grau histopatológico: 0% para os de grau I, 15,4% para os de grau II e 83,4% para os de grau III ($p=0,0018$) (Tab. 6). Observa-se que a mortalidade para os mastocitomas de diferenciação intermediária se mantém baixa, mais próxima da dos de grau I do que da mortalidade dos de grau III. Esta distribuição corrobora observações de Séguin et al. (2001) e Weisse, Schofer e Sorenmo (2002), que descartam necessidade de quimioterapia para os mastocitomas de grau II em casos de ressecção cirúrgica completa.

Como indicador para tempo de sobrevida pós-cirúrgica, a graduação histológica também foi o método que mostrou melhor desempenho entre os indicadores testados, com $p<0,0001$ na análise de Kaplan-Meier seguida de "logrank test" (Fig. 13).

A maioria das críticas a este método é em relação à subjetividade na classificação dos tumores, pela somatória de critérios histomorfológicos de difícil padronização/mensuração, gerando variações intra e interobservador em grande parte dos casos (YAGER; SCOTT, 1993; SIMOES; SCHONING; BUTINE, 1994; STREFEZZI; XAVIER; CATÃO-DIAS, 2003; MISDORP, 2004; KIUPEL et al., 2005; MAIOLINO et al., 2005; NORTHRUP et al., 2005). Com a finalidade de reduzir tais variações, resolvemos que o grau histopatológico seria aquele que se repetisse entre três observadores com experiência em histopatologia (a saber: Ricardo De Francisco Strefezzi – Universidade Bandeirante de São Paulo; José Guilherme Xavier e Silvia Regina Kleeb – Universidade Metodista de São Paulo, para os casos provenientes da UNIBAN e UMESP; e Ricardo, José Guilherme Xavier e José Luiz Catão Dias – Universidade de São Paulo, para os provenientes da USP). Em todos os casos houve pelo menos dois diagnósticos iguais em relação a um dos graus.

Acreditamos, ainda, que o método possa ser aperfeiçoado dividindo-se as neoplasias em apenas dois graus, conforme sugerido por Northrup et al. (2005). Estabelecendo critérios mais objetivos, tais como a mensuração de parâmetros morfométricos nucleares, contagem de mitoses, ou outras características peculiares ao tumor, adicionaríamos parâmetros mais reprodutíveis e precisos ao método. Em trabalho comparativo multi-institucional realizado por Northrup et al. (2005), houve discrepâncias entre os diagnósticos

pois foram utilizados diversos métodos de classificação, o que permitiu, por exemplo, a inclusão de casos com mitoses presentes em mastocitomas bem-diferenciados. Outra questão referida por tais autores é a extensão, ou profundidade, das lesões. Kiupel et al. (2005) não consideraram a profundidade como fator importante à graduação, quando analisada individualmente.

5.3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As pesquisas histomorfológicas foram retomadas nos últimos anos, apesar de novos procedimentos, tais como métodos moleculares e imunoistoquímicos, estarem sendo testados, pois nenhuma das novas técnicas sobrepujou a capacidade da classificação de Patnaik, Ehler e MacEwen (1984). Permanecem, na verdade, como coadjuvantes, ou complementos, da tradicional classificação histopatológica (SIMOES; SCHONING; BUTINE, 1994; ABADIE; ARMADEILH; DELVERDIER, 1999; STREFEZZI, 2001; STREFEZZI; XAVIER; CATÃO-DIAS, 2003; KIUPEL et al., 2004; MAIOLINO et al., 2005; KIUPEL et al., 2005; NORTHRUP et al., 2005; ROMANSIK et al., 2007; SCASE et al., 2007; WEBSTER et al., 2007).

O motivo comum, entre as várias tentativas em encontrar indicadores prognósticos, têm sido, sempre, o de aperfeiçoar a avaliação de mastocitomas de grau II, grande obstáculo para clínicos e cirurgiões veterinários no tratamento desta neoplasia.

Nossos resultados, principalmente os obtidos com a morfometria em esfregaços citopatológicos, reforçam a necessidade por graduações mais simples, e nos permitem apresentar uma nova classificação para mastocitomas cutâneos caninos, baseada em indicadores precisos e de fácil reprodutibilidade.

6 CONCLUSÕES

- ✓ A citomorfometria computadorizada é um método preciso para avaliação prognóstica de mastocitomas cutâneos em cães, mantendo correlação com a graduação histopatológica de Patnaik, Ehler e MacEwen (1984), e informando sobre mortalidade em função desta neoplasia. Além disso, é capaz de prever a sobrevida dos animais tratados cirurgicamente para a doença.
- ✓ A morfometria nuclear em lâminas de citopatologia pode dividir os mastocitomas em lesões de baixo grau, com comportamento biológico favorável, e de alto grau, com evolução mais agressiva e sombria, substituindo o método histomorfológico e eliminando a sobreposição em casos de tumores de diferenciação intermediária (grau II), o grande obstáculo para graduação destes tumores.
- ✓ A análise das dimensões nucleares em exames citopatológicos é capaz de direcionar/orientar o tratamento clínico-cirúrgico, sem a necessidade de biópsias incisionais e processamento histológico do material obtido, o que confere ao método rapidez, praticidade, segurança na colheita das amostras, além de baixos custos para realização.
- ✓ A avaliação imunoistoquímica da expressão de KIT, apesar de confirmada a existência de três padrões morfológicos distintos, não está associada aos graus histopatológicos, bem como não foi um bom indicador prognóstico quanto à mortalidade decorrente de mastocitomas e à sobrevida pós-cirúrgica.
- ✓ A detecção imunoistoquímica da proteína BAX em mastocitomas cutâneos caninos não apresentou correlação com a graduação histopatológica, o mesmo se repetindo para a mortalidade em função da doença e para a sobrevida após tratamento cirúrgico, tanto quando avaliada por métodos que levam em conta intensidade de marcação e porcentagem de células marcadas, quanto quando somente porcentagem de células positivas, independentemente da intensidade.
- ✓ Mastocitomas cutâneos com alta porcentagem de células positivas para Ki-67 apresentam piores prognósticos, com maior probabilidade de óbito em função da doença, e sobrevidas menores.
- ✓ Há correlação negativa entre a porcentagem de células positivas para PCNA e a sobrevida pós-cirúrgica, mas não foram identificados valores de corte significantes para separar mastocitomas mais agressivos dos menos agressivos, tanto em relação à mortalidade em função da doença, como à sobrevida.

- ✓ Os marcadores de proliferação podem auxiliar na classificação de mastocitomas quanto à malignidade, sendo que o Ki-67 é um indicador mais útil que o PCNA, apesar de estarem correlacionados entre si.
- ✓ A graduação histomorfológica de Patnaik, Ehler e MacEwen (1984), em comparação aos indicadores imunoistoquímicos, ainda é o método histológico mais eficiente e confiável na previsão do comportamento biológico de mastocitomas cutâneos caninos, informando, com grande significado estatístico, sobre a mortalidade devido à neoplasia e a sobrevivência dos animais tratados cirurgicamente.
- ✓ Apesar das vantagens, a graduação histopatológica pode ser superada pela morfometria nuclear em exames citológicos, principalmente quando considerados os benefícios oferecidos por este novo método, tais como confiabilidade, rapidez, praticidade e baixos custos, características bastante importantes para o oncologista veterinário e o proprietário do animal.

REFERÊNCIAS

- ABADIE, J. J.; AMARDEILH, M. A.; DELVERDIER, M. E. Immunohistochemical detection of proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 in mast cell tumors from dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 215, n. 11, p. 1629-1634, Dec., 1999.
- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. **Cellular and molecular immunology**. 4. ed. London: W.B. Saunders, 2000. 553 p.
- ADAMS, J. M.; CORY, S. The Bcl-2 apoptotic switch in câncer development and therapy. **Oncogene**, v. 26, p. 1324-1337, 2007.
- AL-SARRAF, R.; MAULDIN, G. N.; PATNAIK, A. K.; MELEO, K. A. A Prospective study for the treatment of grade 2 mast cell tumors in 32 dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 10, n. 6, p. 376-378, Nov/Dec., 1996.
- ANTIGNANI, A.; YOULE, R. J. How do Bax and Bak lead to permeabilization of the outer mitochondrial membrane? **Current Opinion in Cell Biology**, v. 18, n. 6, p. 685-689, Dec., 2006.
- BOSTOCK, D. E. The prognosis following surgical removal of mastocytomas in dogs. **Journal of Small Animal Practice**, v. 14, p. 27-40, 1973.
- BOSTOCK, D. E.; CROCKER, J.; HARRIS, K.; SMITH, P. Nucleolar organizer regions as indicators of post surgical prognosis in canine spontaneous mast cell tumors. **British Journal of Cancer**, v. 59, p. 915-918, 1989.
- BURLACU, A. Regulation of apoptosis by Bcl-2 family proteins. **Journal of Cellular Molecular Medicine**, v. 7, n. 3, p. 249-257, 2003.
- CIUREA, D.; WILKINS, R. J.; SHALEV, M.; LIU, Z.; BARBA, J.; GIL, J. Use of computerized interactive morphometry in the diagnosis of mammary adenoma and adenocarcinoma in dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 53, n. 3, p. 300-303, Mar., 1992.
- COWELL, R. L. Cytology: part II. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 33, n. 1, p. ix-x, Jan. 2003.
- CROSS, P. C.; MERCER, K. L. **Cell and tissue ultrastructure: a functional perspective**. New York: W. H. Freeman, 1993. 420 p.
- DARDICK, I.; CALDWELL, D. R.; MCCAUGHEY, W. T. E.; AL-JABI, M. Nuclear morphologic and morphometric analyses of large noncleaved cell and immunoblastic non-Hodgkin's lymphomas. **Human Pathology**, v. 15, n. 10, p. 965-972, Oct., 1984.
- DARDICK, I.; PAYNE, C. M. Rationale and potencial for image analysis in histopathology: an overview. **Ultrastructural Pathology**, v. 16, p. 97-98, 1992.
- DE VICO, G.; MAIOLINO, P. Prognostic value of nuclear morphometry in feline mammary carcinomas. **Journal of Comparative Pathology**, v. 117, p. 99-105, 1997.
- DEAN, P. W. Mast cell tumors in dogs: Diagnosis, treatment, and prognosis. **Veterinary Medicine**, v. 83, n. 2, p. 185-192, Feb., 1988.
- DUNCAN, J. R.; PRASSE, K. W. Cytology of canine cutaneous round cell tumors. **Veterinary Pathology**, v. 16, n. 6, p. 673-679, 1979.

ELDAR, S.; SABO, E.; COHEN, A.; MISSELEVICH, I.; ABRAHAMSON, J.; COHEN, O.; KELNER, J.; BOSS, J. H. The value of histomorphometric nuclear parameters in the diagnosis of well differentiated follicular carcinomas and follicular adenomas of the thyroid gland. **Histopathology**, v. 34, p. 453-461, 1999.

ELLIS, P. S. J.; WHITEHEAD, R. Mitosis counting – a need to reappraisal. **Human Pathology**, v. 12, p. 1-4, 1981.

GIEGER, T. L.; THEON, A. P.; WERNER, J. A.; MCENTEE, M. C.; RASSNICK, K. M.; DECOCK, H. E. Biologic behavior and prognostic factors for mast cell tumors of the canine muzzle: 24 cases (1990-2001). **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 17, n. 5, p. 687-692, Sep-Oct., 2003.

GIL, J.; BARBA, J. Principles of stereology: computerized applications to anatomic pathology. In: MARCHEVSKY, A. M.; BARTELS, P. H. (Ed.). **Image analysis: a primer for pathologists**. New York: Raven Press, 1994. p. 79-124.

GINN, P. E.; FOX, L. E.; BROWER, J. C.; GASKIN, A.; KURZMAN, I. D.; KUBILIS, P. S. Immunohistochemical detection of p53 tumor-suppressor protein is a poor indicator of prognosis for canine cutaneous mast cell tumors. **Veterinary Pathology**, v. 37, n. 1, p. 33-39, 2000.

GONZALEZ-CAMPORA, R.; DAVALOS-CASANOVA, G.; BEATO-MORENO, A.; GARCIA-ESCUADERO, A.; MEGIA, M. J. P.; MONTIRONI, R.; LOPEZ-BELTRAN, A. BCL-2, TP53 and BAX protein expression in superficial urothelial bladder carcinoma. **Cancer Letters**, v. 250, p. 292-299, 2007.

GRIER, R. L.; DI GUARDO, G.; MYERS, R.; MERKLEY, D. F. Mast cell tumour destruction in dogs by hypotonic solution. **Journal of Small Animal Practice**, v. 36, p. 385-388, 1995.

GUROVA, K. V.; GUDKOV, A. V. Paradoxical role of apoptosis in tumor progression. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 88, p. 128-137, 2003.

HAMILTON, P. W.; ALLEN, D. C. Morphometry in histopathology. **Journal of Pathology**, v. 175, n. 4, p. 369-379, 1995.

HARTMANN, K.; ARTUC, M.; BALDUS, S. E.; ZIRBES, T. K.; HERMES, B.; THIELE, J. MEKORI, Y. A.; HENZ, B. M. Expression of Bcl-2 and Bcl-xL in cutaneous and bone marrow lesions of mastocytosis. **American Journal of Pathology**, v. 163, n. 3, p. 819-826, Sep., 2003.

HERING, F. L. O.; LIPAY, M. V. N.; RODRIGUES, P. R. T.; NESRALAH, L. J.; SROUGI, M. Comparison of positivity frequency of bcl-2 expression in prostate adenocarcinoma with low and high Gleason score. **São Paulo Medical Journal**, v. 119, n. 4, p. 138-141, 2001.

HESS, P. W. Canine mast cell tumors. **Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice**, v. 7, n. 1, p. 133-143, 1977.

HOTTENDORF, G. H.; NIELSEN, S. W. Pathologic survey of 300 extirpated canine mastocytomas. **Zentralbl Veterinarmed [A]**, v. 14, p. 272-281, 1967.

HSU, C. Y.; KURMAN, R. J.; VANG, R.; WANG, T. L.; BAAK, J.; SHIH, I. M. Nuclear size distinguishes low- from high-grade ovarian serous carcinoma and predicts outcome. **Human Pathology**, v. 36, p. 1049-1054, 2005.

HSU, M. K.; RAINE, L.; FANGER, H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex(ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 29, p. 577-580, 1981.

IKEGUCHI, M.; OKA, S.; SAITO, H.; KONDO, A.; TSUJITANI, S.; MAETA, M.; KAIBARA, N. Computerized nuclear morphometry: a new morphologic assessment for advanced gastric adenocarcinoma. **Annals of Surgery**, v. 229, n. 1, p. 55-61, 1999.

JAFFE, M. H.; HOSGOOD, G.; TAYLOR, H. W.; KERWIN, S. C.; HEDLUNG, C. S.; LOPEZ, M. K.; DAVIDSON, J. R.; MILLER, D. M.; PARANJEPE, M. Immunohistochemical and clinical evaluation of p53 in canine cutaneous mast cell tumors. **Veterinary Pathology**, v. 37, n. 1, p. 40-46, 2000.

KIUPEL, M.; WEBSTER, J. D.; KANEENE, J. B.; MILLER, R.; YUZBASIYAN-GURKAN, V. The use of KIT and Tryptase expression patterns as prognostic tools for canine cutaneous mast cell tumors. **Veterinary Pathology**, v. 41, p. 371-377, 2004.

KIUPEL, M.; WEBSTER, J. D.; MILLER, R. A.; KANEENE, J. B. Impact of tumour depth, tumour location and multiple synchronous masses on the prognosis of canine cutaneous mast cell tumours. **Journal of Veterinary Medicine Series A. Physiology, Pathology and Clinical Medicine**, v. 52, n. 6, p. 280-286, Aug., 2005.

KOSS, L. G. **Diagnostic cytology and its histopathologic bases**. 4. ed. Philadelphia: J. B. Lippincott, 1992. v. 2, 1824 p.

KRAVIS, L. D.; VAIL, D. M.; KISSEBERTH, W. C.; OGILVIE, G. K.; VOLK, L. M. Frequency of argyrophilic organizer regions in fine-needle aspirates and biopsy specimens from mast cell tumors in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 209, n. 8, p. 1418-1420, Oct. 1996.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. **Robbins e Cotran – patologia – bases patológicas das doenças**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. 1592 p.

KURABAYASHI, A.; FURIHATA, M.; MATSUMOTO, M.; OHTSUKI, Y.; SASAGURI, S.; OGOSHI, S. Expression of Bax and apoptosis-related proteins in human esophageal squamous cell carcinoma including dysplasia. **Modern Pathology**, v. 14, n. 8, p. 741-747, 2001.

LARSEN, A. E.; GRIER, R. L. Evaluation of canine mast cell tumors for presence of estrogen receptors. **American Journal of Veterinary Research**, v. 50, n. 10, p. 1779-1780, Oct. 1989.

LEVINE, R. A.; FLEISCHLI, M. A. Inactivation of p53 and retinoblastoma family pathways in canine osteosarcoma cell lines. **Veterinary Pathology**, Jan, v. 37, n. 1, p. 54-61, 2000.

LONDON, C. A.; GALLI, S. J.; YUUKI, T.; HU, Z. Q.; HELFAND, S. C.; GEISLER, E. N.; Spontaneous canine mast cell tumors express tandem duplications in the proto-oncogene c-kit. **Experimental Hematology**, v. 27, p. 689-697, 1999.

LONDON, C. A.; KISSEBERTH, W. C.; GALLI, S. J.; GEISLER, E. N.; HELFAND, S. C. Expression of stem cell factor receptor (c-kit) by the malignant mast cells from spontaneous canine mast cell tumours. **Journal of Comparative Pathology**, v. 115, p. 399-414, 1996.

LONDON, C. A.; SEGUIN, B. Mast cell tumors in the dog. **Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice**, v. 33, n. 3, p. 473-489, May, 2003.

MA, Y.; LOGLEY, B. J.; WANG, X.; BLOUNT, J. L.; LANGLEY, K.; CAUGHEY, G. H. Clustering of activating mutations in c-kit's juxtamembrane coding region in canine mast cell neoplasms. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 112, p. 165-170, 1999.

MACY, D. W. Canine mast cell tumors. **Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice**, v. 15, n. 4, p. 783-803, July, 1985.

MADDIKA, S.; ANDE, S. R.; PANIGRAHI, S.; PARANJOTHY, T.; WEGLARCZYK, K.; ZUSE, A.; ESHRAGHI, M.; MANDA, K. D.; WIECHEC, E.; LOS, M. Cell survival, cell death and cell cycle pathways are interconnected: implications for cancer therapy. **Drug Resistance Updates**, v. 10, p. 13-29, 2007.

MADEWELL, B. R. Cellular proliferation in tumors: a review of methods, interpretation, and clinical applications. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 15, n. 4, p. 334-340, July-Aug., 2001.

MADEWELL, B. R.; MUNN, R. J.; PHILLIPS, L. K. Ultrastructure of canine, feline, and bovine mast cell neoplasms. **American Journal of Veterinary Research**, v. 45, n. 10, p. 2066-2073, Oct., 1984.

MAIOLINO, P.; CATALDI, M.; PACIELLO, O.; RESTUCCI, B.; DE VICO, G. Nucleomorphometric analysis of canine cutaneous mast cell tumours. **Journal of Comparative Pathology**, Aug-Oct, v. 133, n. 2-3, p. 209-211, 2005.

MAIOLINO, P.; RESTUCCI, B.; PAPPARELLA, S.; DE VICO, G. Nuclear morphometry in squamous cell carcinomas of canine skin. **Journal of Comparative Pathology**, v. 127, n. 2-3, p. 114-117, Aug-Oct., 2002.

MARCHEVSKY, A. M.; ERLER, B. S. Morphometry in pathology. In: MARCHEVSKY, A. M.; BARTELS, P. H. (Ed.). **Image analysis: a primer for pathologists**, eds. Marchevsky AM, Bartels PH, New York: Raven Press, USA, 1994. p. 125-179.

MARIANO, M. **Estudo histoquímico comparativo entre os mastócitos de pele normal e os de mastocitoma de cão. Contribuição à patologia do processo**. 1968. 52 f. Tese (Doutorado em Patologia Experimental e Comparada) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1968.

MARTANO, M.; DAMIANO, S.; RESTUCCI, B.; PACIELLO, O.; RUSSO, V.; MAIOLINO, P. Nuclear morphometry in canine acanthomatous ameloblastomas and squamous cell carcinomas. **European Journal of Histochemistry**, v. 50, n. 2, p. 125-130, Apr-Jun., 2006.

MASSI, D.; PUIG, S.; FRANCHI, A.; MALVEHY, J.; VIDAL-SICART, S.; GONZÁLEZ-CAO, M.; BARONI, G.; KETABCHI, S.; PALOU, J.; SANTUCCI, M. Tumour lymphangiogenesis is a possible predictor of sentinel lymph node status in cutaneous melanoma: a case-control study. **Journal of Clinical Pathology**, v. 59, p. 166-173, 2006.

MCCAW, D. L.; MILLER, M. A.; BERGMAN, P. J.; WITHDROW, S. J.; MOORE, A. S.; KNAPP, D. W.; FOWLER, D.; JOHNSON, J. C. Vincristine therapy for mast cell tumors in dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 11, n. 6, p. 375-378, Nov./Dec. 1997.

MCCAW, D. L.; MILLER, M. A.; OLGILVIE, G. K.; WITHDROW, S. J.; BREWER JUNIOR, W. G.; KLEIN, M. K.; BELL, F. W.; ANDERSON, S. K. Response of canine mast cell tumors to treatment with oral prednisone. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 8, n. 6, p. 406-408, Nov/Dec., 1994.

MCMANUS, P. M. Frequency and severity of mastocitemia in dogs with and without mast cell tumors: 120 cases (1995-1997). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 215, n. 3, Aug., 1999.

MELO, E. S.; ALVES, V. A. F. Marcadores de proliferação celular. In: ALVES, V. A. F.; BACCHI, C. E.; VASSALO, J. **Manual de imuno-histoquímica**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia, 1999.

MEIJERINK, J. P. P.; MENSINK, E. J. B. M.; WANG, K.; SEDLAK, T. W.; SLÖETJES, A. W.; DE WITTE, T.; WAKSMAN, G.; KORSMEYER, S. J. Hematopoietic malignancies demonstrate loss-of-function mutations of BAX. **Blood**, v. 91, n. 8, p. 2991-2997, 1998.

MICHAEL, D.; OREN, M. The p53-mdm2 module and the ubiquitin system. **Seminars in Cancer Biology**, v. 13, p. 49-58, 2003.

MICHELS, G. M.; KNAPP, D. W.; DENICOLA, D. B.; GLICKMAN, N.; BONNEY, P. Prognosis following surgical excision of canine cutaneous mast cell tumors with histopathologically tumor-free versus nontumor-free margins: a retrospective study of 31 cases. **Journal of American Animal Hospital Association**, v. 38, n. 5, p.458-466, Sep-Oct., 2002.

MISDORP, W. Mast cells and canine mast cell tumours. A review. **Veterinary Quarterly**, v. 26, n. 4 p. 156-169, Dec., 2004.

MURPHY, S.; SPARKES, A. H.; SMITH, K. C.; BLUNDEN, A. S.; BREARLEY, M. J. Relationships between the histological grade of cutaneous mast cell tumours in dogs, their survival and the efficacy of surgical resection. **Veterinary Record**, v. 154, n. 24, p. 743-746, Jun., 2004.

NASIR, L.; BURR, P. D.; MCFARLANE, S. T.; GAULT, E.; THOMPSON, H.; ARGYLE, D. J. Cloning, sequence analysis and expression of the cDNAs encoding the canine and equine homologues of the mouse double minute 2 (mdm2) proto-oncogene. **Cancer Letters**, v. 152, n. 1, p. 9-13, 2000.

NASIR, L.; RUTTERMAN, G. R.; REID, S. W. J.; SCHULZE, Ch.; ARGYLE, D. J. Analysis of p53 mutational events and mdm2 amplification in canine soft-tissue sarcomas. **Cancer Letters**, v. 174, n. 1, p. 83-89, 2001.

NORTHRUP, N. C.; HOWERTH, E. W.; HARMON, B. G.; BROWN, C. A.; CARMICHEAL, K. P.; GARCIA, A. P.; LATIMER, K. S.; MUNDAY, J. S.; RAKICH, P. M.; RICHEY, L. J.; STEDMAN, N.L.; GIEGER, T. L. Variation among pathologists in the histologic grading of canine cutaneous mast cell tumors with uniform use of a single grading reference. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 17, n. 6, p. 561-564, Nov., 2005.

O'BRATE, A.; GIANNAKAKOU, P. The importance of p53 location: nuclear or cytoplasmic zip code? **Drug Resistance Updates**, v. 6, p. 313-322, 2003.

O'KEEFE, D. A. Canine mast cell tumors. **Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice**, v. 20, n. 4, p. 1105-1115, July, 1990.

PATNAIK, A. K.; EHLE, W. J.; MACEWEM, E. G. Canine cutaneous mast cell tumor: morphologic grading and survival time in 83 dogs. **Veterinary Pathology**, v. 21, n. 5, p. 469-474, 1984.

PEZZELLA, F.; MORRISON, H.; JONES, M.; GATTER, K. C.; LANE, D.; HARRIS, A. L.; MASON, D. Y. Immunohistochemical detection of p53 and bcl-2 proteins in non-Hodgkin's lymphoma. **Histopathology**, v. 22, p. 39-44, 1992.

PROPHET, E. B.; MILLS, B.; ARRINGTON, J. B.; SOBIN, L. H. **Laboratory methods in histotechnology**. Washington: Armed Forces Institute of Pathology, 1992. 279 p.

PULLEY, L. T.; STANNARD, A. A. Skin and soft tissues. In: **Tumors in domestic animals**. 3. ed. MOULTON, J. E. (Ed.). Los Angeles: University of California Press, 1990. p. 38-44.

QUINN, C. M.; WRIGHT, N. A. The clinical assessment of proliferation and growth in human tumours: evaluation of methods and applications as prognostic variables. **Journal of Pathology**, v. 160, p. 93-102, 1990.

RASSNICK, K. M.; MOORE, A. S.; WILLIAMS, L. E.; LONDON, C. A.; KINTZER, P. P.; ENGLER, S. J.; COTTER, S. N. Treatment of canine mast cell tumors with CCNU (Lomustine). **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 13, p. 601-605, 1999.

REGUERA, M. J.; RABANAL, R. M.; PUIGDEMONT, A.; FERRER, L. Canine mast cell tumors Express stem cell factor receptor. **American Journal of Dermatopathology**, v. 22, n. 1, p. 49-54, 2000.

RIVA, F.; BRIZZOLA, S.; STEFANELLO, D.; CREMA, S.; TURIN, L. A study of mutations in the c-kit gene of 32 dogs with mastocytoma. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 7, n. 4, p. 385-388, July, 2005.

ROELS, S. L.; VAN DAELE, A. J.; VAN MARCK, E. A.; DUCATELLE, R. V. DNA ploidy and nuclear morphometric variables for the evaluation of melanocytic tumors in dogs and cats. **American Journal of Veterinary Research**, v. 61, n. 9, p. 1074-1079, Sept., 2000.

ROGERS, K. S. Common questions about diagnosing and treating canine mast cell tumors. **Veterinary Medicine**, v. 88, n. 3, p. 246-250, Mar., 1993.

ROGERS, K. S. Mast cell tumors: dilemmas of diagnosis and treatment. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 26, n. 1, p. 87-102, Jan., 1996.

ROMANSIK, E. M.; REILLY, C. M.; KASS, P. H.; MOORE, P. F.; LONDON, C. A. Mitotic index is predictive for survival for canine cutaneous mast cell tumors. **Veterinary Pathology**, v. 44, p. 335-341, 2007.

SAKAI, H.; NODA, A.; SHIRAI, N.; IIDAKA, T.; YANAI, T.; MASEGI, T. Proliferative activity of canine mast cell tumours evaluated by bromodeoxyuridine incorporation and Ki-67 expression. **Journal of Comparative Pathology**, v. 127, p. 233-238, 2002.

SAMPAIO-GÓES, F. C. G.; OLIVEIRA, D. T.; DORTA, R. G.; NONOGAKI, S.; LANDMAN, G.; NISHIMOTO, I. N.; KOWALSKI, L. P. Expression of PCNA, p53, BAX, and BCL-X in oral poorly differentiated and basaloid squamous cell carcinoma: relationships with prognosis. **Head and Neck**, v. 27, p. 982-989, 2005.

SCASE, T. J.; EDWARDS, D.; MILLER, J.; HENLEY, W.; SMITH, K.; BLUNDEN, A.; MURPHY, S. Canine mast cell tumors: correlation of apoptosis and proliferation markers with prognosis. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 20, p. 151-158, 2006.

SÉGUIN, B.; LEIBMAN, N. F.; BREGAZZI, V. S.; OGILVIE, G. K.; POWERS, B. E.; DERNELL, W. S.; FETTMAN, M. J.; WITHDROW, S. J. Clinical outcome of dogs with grade-II mast cell tumors treated with surgery alone: 55 cases (1996-1999). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 218, n. 7, p.1120-1123, Apr. 2001.

SETOGUSHI, A.; OKUDA, M.; NISHIDA, E.; YAZAWA, M.; ISHIZAKA, T.; HONG, S. H.; HISASUE, M.; NISHIMURA, R.; SASAKI, N.; YOSHIKAWA, Y.; MASUDA, K.; OHNO, K.; TSUJIMOTO, H.

Results of hyperamplification of centrosomes in naturally developing tumors of dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 62, n. 7, p. 1134-1141, July, 2001.

SHELLY, S. M. Cutaneous lesions. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 33, n. 1, p. 1-46, Jan., 2003.

SHIMIZU, H.; HUPP, T. R. Intrasteric regulation of MDM2. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 28, n.7, p. 346-349, July, 2003.

SIMEONOV, R.; SIMEONOVA, G. Computerized cytomorphometric analysis of nuclear area, nuclear perimeter and mean nuclear diameter in spontaneous canine mammary gland tumours. **Veterinary Research and Communication**, v. 31, n. 5, p. 553-558., July, 2007.

SIMEONOV, R.; SIMEONOVA, G. Computerized morphometry of mean nuclear diameter and nuclear roundness in canine mammary gland tumors on cytologic smears. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 35, n. 1, p. 88-90, Mar., 2006a.

SIMEONOV, R.; SIMEONOVA, G. Fractal dimension of canine mammary gland epithelial tumors on cytologic smears. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 35, n. 4, p. 446-448, Dec., 2006b.

SIMOES, J.P.C.; SCHONING, P.; BUTINE, M. Prognosis of canine mast cell tumors: a comparison of three methods. **Veterinary Pathology**, v. 31, n. 6, p. 637-647, 1994.

SOHN, S. K.; JUNG, J. T.; KIM, D. K.; KIM, J. G.; KWAK, E. K.; PARK, T; SHIN, D. G.; SOHN, K. R.; LEE, K. B. Prognostic significance of bcl-2, bax, and p53 expression in diffuse large B-cell lymphoma. **American Journal of Hematology**, v. 73, n. 2, p. 101-107, 2003.

SOINI, Y.; PUHAKKA, A.; KAHLOS, K.; SÄILY, M.; PÄÄKKÖ, P.; KISTINEN, P.; KINNULA, V. Endothelial nitric oxide synthase is strongly expressed in malignant mesothelioma but does not associate with vascular density or the expression of VEGF, FLK1 or FLT1. **Histopathology**, v. 39, p. 179-186, 2001.

STONE, D. M.; JACKY, P. B.; PRIEUR, D. J. Chromosomal fragile site expression in dogs: II. Expression in Boxer dogs with mast cell tumors. **American Journal of Medical Genetics**, v. 40, p. 223-229, 1991.

STREFEZZI, R. F. S. **Morfometria nuclear de mastocitomas cutâneos caninos e sua relação com a graduação histopatológica**. 2001. 82 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental e Comparada) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

STREFEZZI, R. F. S.; XAVIER, J. G.; CATÃO-DIAS, J. L. Morphometry of canine cutaneous mast cell tumors. **Veterinary Pathology**, v. 40, n. 3, p. 268-275, 2003.

TAKAHAMA JUNIOR, A.; ALVES, F. A.; PINTO, C. A. L.; CARVALHO, A. L.; KOWALSKI, L. P.; LOPES, M. A. Clinicopathological and immunohistochemical analysis of twenty-five head and neck osteosarcomas. **Oral Oncology**, v. 39, n. 5, p. 521-530, 2003.

TURREL, J. M.; KITCHELL, B. E.; MILLER, L. M.; THÉON, A. Prognostic factors for radiation treatment of mast cell tumor in 85 dogs. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 193, n. 8, p. 936-940, Oct. 1988.

TYLER, R. D.; COWELL, R. L.; BALDWIN, C. J.; MORTON, R. J. Introduction. In: COWELL, R. L.; TYLER, R. D. **Diagnostic cytology of the dog and cat**. California: American Veterinary Publications, 1999. p. 1-19.

VALENT, P.; HORNY, H. P.; LI, C. Y.; LONGLEY, B. J.; METCALFE, D. D.; PARWARESCH, R. M.; BENNETT, J. M. Mastocytosis. In: JAFFE, E. S.; HARRIS, N. L.; STEIN, H.; VARDIMAN, J. W. (eds.) **World Health Organization classification of tumors: pathology and genetics of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues**. Lyon, França: IARC Press, 2001. p. 293-302.

WEBSTER, J. D.; YUZBASIYAN-GURKAN, V.; MILLER, R.; KANEENE, J. B.; KIUPEL, M. Cellular proliferation in canine cutaneous mast cell tumors: associations with c-KIT and its role in prognostication. **Veterinary Pathology**, v. 44, p. 298-308, 2007.

WEISSE, C.; SHOFR, F. S.; SORENMO, K. Recurrence rates and sites for grade II canine cutaneous mast cell tumors following complete surgical excision. **Journal of American Animal Hospital Association**, v. 38, n. 1, p. 71-73, Jan-Feb., 2002.

WU, H.; HAYASHI, T.; INOUE, M. Immunohistochemical expression of Mdm2 and p53 in canine cutaneous mast cell tumours. **Journal of Veterinary Medicine Series A. Physiology, Pathology and Clinical Medicine**, v. 53, n. 2, p. 65-68, Mar., 2006.

YAGER, J. A.; SCOTT, D. W. The Skin and Appendages. In: JUBB, K. V. F.; KENNEDY, P. C.; PALMER, N. C. (Ed.). **Pathology of domestic animals**. 4. ed. California: Academic Press, 1993. v. 1, p. 531-738.

YANG, W. Y.; LIU, C. H.; CHANG, C. J.; LEE, C. C.; CHANG, K. J.; LIN, C. T. Proliferative activity, apoptosis and expression of oestrogen receptor and Bcl-2 oncoprotein in canine mammary gland tumours. **Journal of Comparative Pathology**, v. 134, p. 70-79, 2006.

ZEMKE, D.; YAMINI, B.; YUZBASIYAN-GURKAN, V. Mutations in the juxtamembrane domain of c-kit are associated with higher grade mast cell tumors in dogs. **Veterinary Pathology**, v. 39, p. 529-535, 2002.