IVONE IZABEL MACKOWIAK DA FONSECA

**Avaliação da expressão do gene supressor de tumor PTEN,
proto-oncogene c-kit, matrilisina (MMP-7), Conexinas 32 e 43
e do complexo E-caderinas/cateninas em mastocitomas
da espécie canina: estudos *ex vivo* e *in vitro***

**São Paulo
2014**

IVONE IZABEL MACKOWIAK DA FONSECA

**Avaliação da expressão do gene supressor de tumor PTEN,
proto-oncogene c-kit, matrilisina (MMP-7), Conexinas 32 e 43 e
do complexo E-caderinas/cateninas em mastocitomas da espécie
canina: estudos *ex vivo* e *in vitro***

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 a obtenção do
título de Doutor em Ciências

Departamento:

Patologia

Área de Concentração

Patologia Experimental e Comparada

Orientadora:

Prof^ª. Dr^ª. Maria Lúcia Zaidan Dagli

São Paulo

2014

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.2946
FMVZ

Fonseca, Ivone Izabel Mackowiak da
Avaliação da expressão do gene supressor de tumor PTEN, proto-oncogene c-kit, matrilisina (MMP-7), Conexinas 32 e 43 e do complexo E-caderinas/cateninas em mastocitomas da espécie canina: estudos *ex vivo* e *in vitro* / Ivone Izabel Mackowiak da Fonseca. -- 2014.
274 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, São Paulo, 2014.

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.

Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Profa. Dra. Maria Lúcia Zaidan Dagli.

1. Mastocitomas 2. Conexinas 3. E-caderina 4. c-Kit. 5. PTEN. 6. MMP-7. I. Título.

Comissão de Ética para uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação da expressão e correlação entre as conexinas 32, 43, E-caderina e proteínas citoplasmáticas associadas a E-caderinas em mastocitomas da espécie canina", protocolado sob o nº1792/2009, utilizando 60 (sessenta) cachorros, sob a responsabilidade da Profa Dra Maria Lucia Zaidan Dagli, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética para uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 09/12/2009.

We certify that the Research "Evaluation of expression and correlation between the connexins 32, 43, E-cadherin and cytoplasmic proteins associated with E-cadherin in mast cell tumors of dogs", protocol number 1792/2009, utilizing 60 (sixty) dogs, under the responsibility Profa Dra Maria Lucia Zaidan Dagli, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethics Committee for animal use" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo was approved in the meeting of day 12/09/2009.

São Paulo, 10 de dezembro de 2009

Profa Dra Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: FONSECA, Ivone Izabel Mackowiak da

Título: Avaliação da expressão do gene supressor de tumor PTEN, proto-oncogene c-kit, matrilisina (MMP-7), Conexinas 32 e 43 e do complexo E-caderinas/cateninas em mastocitomas da espécie canina: estudos *ex vivo* e *in vitro*

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 a obtenção do
título de Doutor em Ciências

Data: __/__/____

Banca Examinadora

Prof(a) Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a) Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a) Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a) Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a) Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

“Quando o homem aprender a respeitar até o menor ser da criação, seja animal ou vegetal, ninguém precisará ensiná-lo a amar seu semelhante”.

Albert Schweitzer (Nobel da Paz – 1952).

DEDICATÓRIA

Primeiramente agradeço a Deus por permitir que eu trilhasse este caminho.

Aos meus amados pais Estanislau Mackowiak e Irde Terezinha M. P. Mackowiak, meu porto seguro, minha referência de amor incondicional.

Ao meu querido esposo Pedro Paulo da Fonseca, pelo incentivo, suporte, paciência, amor e dedicação ao longo destes anos de estudo. Muito obrigada.

Aos meus queridos filhos David Mackowiak da Fonseca e Jonathan Mackowiak da Fonseca o maior tesouro que Deus me deu, obrigada pelo incentivo, amor e apoio nestes longos anos de estudo, vocês são a base sólida sobre a qual todos os meus sonhos foram se construindo.

A você Rita Amorim seja bem vinda à família, obrigada pelo incentivo, pelo apoio, paciência e compreensão pelas horas de ausência no momento da redação desta tese.

A você Marina Pelline Silva obrigada pelo seu carinho, incentivo, apoio e compreensão pelas horas de ausência ao longo destes anos de pesquisa, e confecção desta tese.

Aos meus irmãos, Marcimino, Moacir, Rose, Clóvis e Rodrigo, pelo amor que nos une.

Ao meu irmão do coração Luciano Basso, por estar sempre presente e ter me ajudado sempre que precisei ao longo destes anos de estudo.

A minha afilhada e sobrinha Karim Gisele Martins, que sempre me incentivou e para a qual desejo ser exemplo e amiga.

*A todos os meus sobrinhos e sobrinhas por fazerem parte da minha vida e acompanharem esta jornada, em especial a **Mariana Isabele Mackowiak** e **Maria Luiza Mackowiak**,*

*A minha querida tia **Octavina Ana Basso**, meu exemplo de vida e superação, tudo que conquistei na minha vida, tanto na área acadêmica como na pessoal foram influenciados pelo convívio que tive oportunidade de ter com você.*

*A minha querida amiga **Julia**, obrigada por ter ficado ao meu lado em todos os momentos desde que eu cheguei a São Paulo, nossa amizade já vem de longa data e estes laços cada vez mais fortes, minha irmã do coração.*

*Aos meus amigos **Mauro Vicari** e família, pessoas que mesmo a distância sempre me apoiaram e incentivaram nos momentos difíceis, e que sempre vibraram com as minhas conquistas.*

*As minhas cunhadas e amigas **Guiomar, Hilda, Vilma, Nilza, Mirian, Ivone, Loiri, Ema**, obrigada pelo apoio e incentivo nestes anos de estudo.*

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A professora Maria Lucia Zaidan Dagli, minha orientadora e amiga. Sempre disposta a assistir-me atenciosamente, incentivando nos momentos difíceis. Profissional íntegro, ética e apaixonada pela pesquisa. Compartilhamos momentos de vida nos últimos cinco anos, que só fizeram aumentar a minha admiração. Muito obrigada pela oportunidade, confiança e respeito a mim dedicados e por acreditar e permitir a realização deste trabalho. A você minha eterna gratidão e admiração.

AGRADECIMENTOS

À técnica do laboratório, Marguiti Isaura Soares Silva por todo respaldo técnico e principalmente pela amizade.

Aos colegas do Laboratório de Oncologia Experimental que se tornaram amigos. Por toda ajuda e ensinamento, consideração, amizade, carinho, preocupação e por todos os momentos de alegria que pudemos compartilhar. Luciana, Daniel, Lucas, Greg, Tarso, Marcelo, Isis, Luise, Kátia Kimura, Karen, Juliana.

Em especial a você Márcia Nagamine por ter enfrentado comigo todas as dificuldades no estabelecimento das culturas primárias dos mastocitomas e ter me ajudado a superá-las.

Ao Professor Bruno Cogliati pela amizade e conselhos ao longo destes anos.

Aos colegas do Laboratório de Patologia Morfológica e Molecular Sirlei, Tereza, Elisangela, Juliana Guerra, Juliana pela amizade e convívio.

A Andréia Oliveira Latorre pela amizade, conselhos e ajuda na citometria de fluxo.

Aos colegas do Laboratório de Farmacologia Vagner, Nicole, Herculano, por todo respaldo técnico e principalmente pela amizade.

Agradeço Claudia Mori e todos os funcionários do Biotério, por toda ajuda e pela amizade.

Agradeço a todos os funcionários do Departamento de Patologia, por toda ajuda, pela amizade.

Aos funcionários e amigos do HOVET, principalmente a Thaís e Samantha, obrigada por me auxiliar na coleta dos tumores de mastocitomas.

A funcionária e amiga Noêmia, obrigada por me auxiliar a encontrar os prontuários dos animais deste estudo.

A todos os funcionários do VPT pela ajuda e carinho, e em especial ao Claudio e Luciano, Idalina, Nelsinho, Edson, Milena, Lucia, Raimundo, Luciana, que estiveram envolvidos direta e indiretamente na realização deste doutorado.

Aos funcionários da Biblioteca da FMVZ pela ajuda na confecção da tese, em especial a você Elza.

Agradecimento especial aos cães que fizeram parte deste trabalho.

A FAPESP pelo apoio financeiro (Processo nº 09/ 12827-1; 11/13260-5), como também ao auxílio pesquisa, sem o mesmo não teríamos condições de realizar este estudo.

Muito obrigada

RESUMO

FONSECA, I. I. M. da. **Avaliação da expressão do gene supressor de tumor PTEN, proto-oncogene c-kit, matrilisina (MMP-7), Conexinas 32 e 43 e do complexo E-caderinas/cateninas em mastocitomas da espécie canina: estudos *ex vivo* e *in vitro*.** [Evaluation of the expression of the tumor suppressor gene PTEN, proto-oncogene c-kit, matrilysin (MMP-7), Connexins 32 and 43 and E-caderinas/cateninas complex in mast cell tumors of dogs: ex vivo and in vitro studies]. 2014. 274 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Os mastocitomas são formações cutâneas neoplásicas que mais acometem os cães, por isso inúmeras pesquisas estão sendo direcionadas no descobrimento de novas opções de tratamento, diagnóstico e prognóstico desta doença. O objetivo deste trabalho foi avaliar a expressão de um conjunto de proteínas que estão interligadas ou interligam vias de sinalização, na tentativa de identificar proteínas que se apresentem diferencialmente expressas nos mastocitomas caninos de diferentes graus. Realizamos um estudo da expressão deste conjunto de proteínas em 18 tumores oriundos dos arquivos do Serviço de patologia animal do Departamento de Patologia da FMVZ-USP. Realizamos coleta de material fresco de outras 18 amostras de mastocitomas cutâneos caninos, as quais foram submetidas ao cultivo celular, e então foram estabelecidas 10 linhagens de mastocitomas cutâneos caninos a fim de se avaliar este mesmo grupo de marcadores moleculares *in vitro*. As amostras do arquivo foram submetidas à imunomarcação das seguintes proteínas: PTEN, c-kit, E-caderina, β -catenina, α -catenina, p120-catenina, MMP-7. Nas linhagens tumorais estabelecidas analisamos o ciclo celular, ploidia de DNA, proliferação celular pelo CFSE, análise ultraestrutural pela microscopia eletrônica de transmissão, análise mutacional do gene c-Kit, e análise por imunocitoquímica e imunofluorescência dos seguintes marcadores moleculares: PTEN, c-kit, E-caderina, β -catenina, α -catenina, p120-catenina, MMP-7, CX32, CX43, vimentina, triptase. Os resultados demonstram a alteração da expressão das proteínas do complexo E-caderina/catenina, do c-Kit, da proteína PTEN e MMP-7 de acordo com o grau do mastocitoma canino. Observamos além da redução de expressão uma localização subcelular de todas estas proteínas nos tumores mais agressivos como nos mastocitomas de grau 3. O mesmo foi observado para as proteínas Cx 43 e 32. Realizamos levantamento do histórico clínico dos 18 casos de mastocitoma caninos oriundos do arquivo, e os parâmetros clínicos avaliados foram: idade, raça, gênero, localização, tempo de evolução, alteração linfonodo, metástases, tempo sobrevida, intervalo recidiva, óbito. Foram associados a um pior

prognóstico os pacientes que apresentaram os seguintes parâmetros: animais idosos, presença de metástase, localização no tórax e graduação tumoral. Nas linhagens tumorais estabelecidas, a análise da ploidia revelou que todas as linhagens de mastocitomas são diploides e o CFSE mostrou que a proliferação máxima ocorre dentro de 24hs de cultivo. A análise ultraestrutural comprova que as células das linhagens são mastócitos tumorais. A análise pela imunocitoquímica dos marcadores em estudo revelaram padrões similares aos encontrados na imunohistoquímica. Pela expressão da vimentina e da triptase confirmamos mais uma vez se tratar de linhagens de mastócitos em cultivo. Na análise mutacional do gene c-kit encontramos mutações no éxon 8 e 11, mas não no éxon 17. Nossos resultados revelam a ocorrência simultânea de inúmeras alterações moleculares nos mastocitoma caninos. As proteínas avaliadas têm funções e vias distintas, mas, que se interligam podendo regular ou serem reguladas, dependendo do momento em que se encontra a célula. A desestabilização do complexo E-caderina-cateninas parece ser o programa efetor na progressão dos mastocitomas caninos. A finalidade maior de se realizar estudos morfológicos, funcionais e moleculares das neoplasias é contribuir, mais cedo ou mais tarde, para o controle destas doenças. Esperamos, com este trabalho, ter fornecido informações importantes que favorecerão a busca por melhores tratamentos dos mastocitomas caninos.

Palavras-chave: Tumor de mastócitos. E-caderina. Conexinas. MMP-7. PTEN.

ABSTRACT

FONSECA, I. I. M. da. **Evaluation of the expression of the tumor suppressor gene PTEN, proto-oncogene c-kit, matrilysin (MMP-7), Connexins 32 and 43 and E-caderinas/cateninas complex in mast cell tumors of dogs: ex vivo and in vitro studies.** [Avaliação da expressão do gene supressor de tumor PTEN, proto-oncogene c-kit, matrilisina (MMP-7), Conexinas 32 e 43 e do complexo E-caderinas/cateninas em mastocitomas da espécie canina: estudos *ex vivo* e *in vitro*]. 2014. 274 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Mast cell tumors are malignant skin formations that most affect dogs, so many research projects are being directed at the discovery of new treatment options, diagnosis and prognosis of this disease. The objective of this study was to evaluate the expression of a set of proteins that are interlinked or interconnected signaling pathways, in an attempt to identify proteins that show differentially expressed in canine mast cell tumors of different grades. We performed a study of the expression of this set of 18 proteins in tumors originating from the files of the Service of Animal Pathology, Department of Pathology of the FMVZ - USP. We collected other 18 new samples of canine cutaneous mast cell tumors, which were subjected to cell culture, and 10 strains of canine cutaneous mast cell tumors were established in order to evaluate in vitro this same group of molecular markers. The samples were subjected to immunostainings the following proteins: PTEN, c-kit, E-cadherin, β -catenin, α -catenin, p120-catenin, MMP-7. In established tumor cell lines we analyzed the cell cycle, DNA ploidy, cell proliferation by CFSE, ultrastructural analysis by transmission electron microscopy, mutational analysis of c-kit gene, and analysis by immunocytochemistry and immunofluorescence of the following molecular markers: PTEN, c-kit, E-cadherin, β -catenin, α -catenin, p120-catenin, MMP-7, CX32, Cx43, vimentin, tryptase. The results demonstrate the altered expression of the proteins, c-Kit, MM7 and PTEN proteins according to the level of the canine mastocytoma E-caderina/catenina complex. It has been observed a reduced expression as well as alterations in subcellular localization of all these proteins in more aggressive tumors as in grade 3 mast cell tumors. The same was observed for Cx 43 and 32 proteins. It has been performed a survey of the medical records of 18 cases of canine mast cell tumors retrieved from the archives, and clinical parameters evaluated were age, race, gender, location, time of evolution, change lymph node metastasis, survival time, recurrence interval, death. Older animals, metastasis, and tumor location in the chest, and mast cell tumor grade: patients who had the following parameters were associated with a worse prognosis. In the

established tumor cell lines, ploidy analysis revealed that all lines are diploid mastocytoma and CFSE proliferation showed that the maximum occurs within 24 hours of cultivation. The ultrastructural analysis showed that the tumor cells are mast cell lineages. Analysis by immunocytochemistry markers studied showed similar patterns to those found in immunohistochemistry. By expression of vimentin and tryptase confirmed once again the case of mast cell lines in culture. In mutational analysis of the c-kit, mutations were found in exon 8 and 11, but not in exon 17. Our results show the simultaneous occurrence of numerous molecular alterations in canine mast cell tumors. Proteins have different functions and evaluated pathways, but that interlock may regulate or be regulated, depending on the moment of the cell. The destabilization of the complex E-cadherin-catenins seems to be the effector program in the progression of canine mast cell tumors. The main purpose of performing morphological, functional and molecular studies of tumors is to contribute, sooner or later, to the control of these diseases. Hopefully, with this work, we have provided important information which will facilitate the search for better treatment of canine mast cell tumors

Keywords: Tumor Mast cells. E-cadherin. Connexins. MMP-7. PTEN.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Distribuição dos 18 casos de mastocitoma cutâneo canino do estudo retrospectivo em função graduação tumoral, raça, idade, gênero, número de formações, localização, linfonodos acometidos, tempo de evolução, intervalo para recidiva, óbito e tempo de sobrevida. Atendidos no serviço de Cirurgia de Pequenos animais - HOVET - FMVZ/USP - São Paulo - 2004 - 2010 99
- Tabela 2 - Distribuição das taxas de mortalidade, relacionadas ou não aos mastocitomas, em função dos padrões de marcação pela imunoistoquímica para o c-kit (segundo Kiupel et al., 2004). Porcentagens em relação ao total de casos para cada padrão de marcação. FMVZ/USP - São Paulo, 2004 – 2010..... 119
- Tabela 3 - Distribuição dos 18 casos de mastocitoma cutâneo canino, mantidos a cultura celular, em função da raça, idade, gênero, localização, tempo de sobrevida. Atendidos no serviço de Cirurgia de Pequenos animais- HOVET- FMVZ/USP - São Paulo, 2010 – 2012 122
- Tabela 4 - Na tabela estão representados os valores obtidos da análise do ciclo celular para 8 linhagens tumorais e um exemplo da leitura realizada para os linfócitos caninos..... 132

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Lista dos anticorpos primários utilizados na reação imunoistoquímica, e imunofluorescência	84
Quadro 2 -	Composição do tampão de lise	93
Quadro 3 -	Desenhos dos Primers para análise mutacional do gene c-kit	94
Quadro 4 -	Protocolo recomendado pelo Taq Master Mix Eppendorf®.....	94
Quadro 5 -	Composição da reação de sequenciamento.....	96
Quadro 6 -	Representação dos valores obtidos nas leituras da fluorescência do CFSE nas diferentes linhagens tumorais dos mastocitomas.....	134

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Molécula de caderina clássica representando o domínio extracelular com os cinco domínios da E-caderina e o domínio citoplasmático com as p120-catenina, β -catenina e α -catenina.....	55
Figura 2 -	Sítios de ligação às proteínas dentro da região intracelular da E-caderina	56
Figura 3 -	Estrutura e a organização de domínio de MMPs.....	60
Figura 4 -	Modelo para a estabilização dos complexos juncionais contendo E-caderina pelo signalosome MAGI-1b/PTEN	63
Figura 5 -	Estrutura de canais de junções de comunicação intracelulares	65
Figura 6 -	Organização estrutural da Cx43 e a montagem de junções.....	65
Figura 7 -	Diferentes formas dos receptores de membrana tirosina quinase	71
Figura 8 -	Locais de ligação nos RTK do tipo III das moléculas de transdução de sinal	71
Figura 9 -	Microscopia eletrônica de transmissão. A– Mastócito pele canina não estimulado. B – Mastócito pele canina estimulado.....	77
Figura 10 -	Microscopia eletrônica de transmissão de mastócitos caninos de pele (MCP) e mastócitos caninos medula óssea (MCMO).....	77
Figura 11 -	A representação dos vários eventos moleculares que ocorrem durante a marcação das células com diacetato carboxifluoresceína succinimidyl éster (CFDA, SE)	79
Figura 12 -	Distribuição do tempo de sobrevida (meses) de acordo com o grau histológico	101
Figura 13 -	Fotomicrografia representativa da coloração Hematoxilina/Eosina em amostras de tecido neoplásico de mastocitoma.....	102
Figura 14 -	Fotomicrografia representativa da coloração Azul Toluidina nas amostras de tecido neoplásico de mastocitoma.....	103
Figura 15 -	Fotomicrografia da imunomarcação com E-caderina (clone NCH-38), com contra-coloração por hematoxilina.....	105
Figura 16 -	Análise comparativa da imunomarcação citoplasmática para a E-caderina (NCH-38) em todas as classes MCTs.....	106

Figura 17 - Fotomicrografia da imunomarcação da expressão da E-caderina utilizando o anticorpo anti-E-caderina humana (clone HECD-1).....	107
Figura 18 - Análises comparativas das imunomarcações citoplasmáticas e nucleares para a E-caderina (clone HECD-1) em todos os graus do mastocitoma	108
Figura 19 - Fotomicrografia da imunomarcação da proteína β -catenina, em todos os graus dos mastocitomas.....	109
Figura 20 - Análises comparativas das imunomarcações citoplasmáticas e nucleares da β -catenina em todos os graus do mastocitoma canino.....	110
Figura 21 - Fotomicrografia da imunomarcação da proteína α -catenina, em todos os graus dos mastocitomas.....	111
Figura 22 - Análises comparativas das imunomarcações citoplasmáticas e nucleares da α -catenina em todos os graus do mastocitoma canino	112
Figura 23 - Fotomicrografia da imunomarcação da proteína p120-catenina, em todos os graus dos mastocitomas	113
Figura 24 - Análises comparativas das imunomarcações citoplasmáticas e nucleares da p120-catenina em todos os graus do mastocitoma canino.....	114
Figura 25 - Fotomicrografia da imunomarcação do PTEN em todos os graus dos mastocitomas	115
Figura 26 - Análises comparativas das imunomarcações citoplasmáticas e nucleares do PTEN em todos os graus do mastocitoma canino	116
Figura 27 - Fotomicrografia da imunomarcação da metaloproteinase 7 (MMP-7), em todos os graus do mastocitoma.....	117
Figura 28 - Análises comparativas das imunomarcações citoplasmáticas e nucleares para a MMP-7 em todos os graus do mastocitomas.....	118
Figura 29 - Fotomicrografia da imunomarcação para o c-Kit, nos diferentes graus do mastocitoma canino.....	120
Figura 30 - Fotomicrografia das células da medula óssea estimulada com IL-3 e SCF (mastócitos) em cultura	123
Figura 31 - Fotomicrografia das células da medula óssea após 30 dias de estímulo com IL-3 e SCF (mastócitos) em cultura	123
Figura 32 - Fotomicrografia representativa da coloração Azul Toluidina nas amostras de mastócitos neoplásicos em cultura que cresceram de forma aderente as garrafas de cultivo	125

Figura 33 - Fotomicrografia das células da linhagem T05, fusiforme e aderidas à garrafa de cultura. Sem adição dos fatores de crescimento no meio de cultivo (SCF e IL-3)	125
Figura 34 - Fotomicrografia das células da linhagem T06, fusiforme e aderidas à garrafa de cultura. Sem adição dos fatores de crescimento no meio de cultivo (SCF e IL-3)	126
Figura 35 - Fotomicrografia das células da linhagem T07, fusiforme e aderidas à garrafa de cultura. Sem adição dos fatores de crescimento no meio de cultivo (SCF e IL-3)	126
Figura 36 - Fotomicrografia das células da linhagem T10. Presença de mastócitos em cachos ou colônias com 60 dias em cultivo sem os fatores de crescimento (SCF e IL-3).....	127
Figura 37 - Fotomicrografia das células da linhagem T12, células fusiformes e aderidas à garrafa de cultura e alguns ninhos celulares sobre a monocamada, sem adição dos fatores de crescimento (SCF e IL-3)	127
Figura 38 - Fotomicrografia mastócitos tumorais linhagem T13. Presença de mastócitos em colônias após 60 dias em cultivo sem os fatores de crescimento (SCF e IL-3).....	128
Figura 39 - Fotomicrografia das células da linhagem T15, células redondas e fusiformes e aderidas à garrafa de cultura e alguns ninhos celulares sobre a monocamada, sem adição dos fatores de crescimento (SCF e IL-3).....	128
Figura 40 - Fotomicrografia das células da linhagem T16, células fusiformes e aderidas à garrafa de cultura e alguns ninhos celulares sobre a monocamada, sem adição dos fatores de crescimento (SCF e IL-3)	129
Figura 41 - Fotomicrografia das células da linhagem T17, células redondas e fusiformes aderidas à garrafa de cultura, sem adição dos fatores de crescimento (SCF e IL-3).....	129
Figura 42 - Fotomicrografia das células mastócitos tumorais recém-coletados (linhagem T18) em cultura, sem adição dos fatores de crescimento (SCF e IL-3)	130
Figura 43 - Ilustra o padrão dos gráficos para as fases G0/G1, G2 e fase S do ciclo celular dos linfócitos caninos	131
Figura 44 - Figura ilustra o padrão de dispersão das células de uma das linhagens de mastocitoma e o histograma das fases do ciclo celular.....	131
Figura 45 - Análise comparativa das fases do ciclo celular das oito linhagens de mastocitoma em cultivo e seus respectivos índices de proliferação	133

Figura 46 - Os histogramas ilustram a proliferação celular pelo CFSE, em uma das linhagens de mastocitoma em cultivo, nos tempos basal, 24 e 48 hs.....	135
Figura 47 - O gráfico ilustra a porcentagem de proliferação das sete linhagens tumorais de mastocitoma analisadas pelo método CSFE.....	135
Figura 48 - Fotomicrografia das células provenientes da medula óssea estimulada com IL-3 e SCF (Mastócitos normais) fixadas com glutaraldeído e coradas com Azul da toluidina	136
Figura 49 - Eletromicrografia das células provenientes da medula óssea canina estimulada com fatores de crescimento IL-3 e SCF, fixadas em resina e analisadas pela microscopia eletrônica de transmissão.....	137
Figura 50 - Fotomicrografia das células provenientes da linhagem T05 fixadas com glutaraldeído e coradas com Azul da toluidina	138
Figura 51 - Eletromicrografia das células provenientes da linhagem T05, fixadas em resina e submetidas à análise pela microscopia eletrônica de transmissão.....	138
Figura 52 - Fotomicrografia das células provenientes da linhagem T06 fixadas com glutaraldeído e coradas com Azul da toluidina	139
Figura 53 - Eletromicrografia das células provenientes da linhagem T06, fixadas em resina e submetidas à análise pela microscopia eletrônica de transmissão.....	140
Figura 54 - Fotomicrografia das células provenientes da linhagem T07 fixadas com glutaraldeído e coradas com Azul da toluidina	141
Figura 55 - Eletromicrografia das células provenientes da linhagem T07, fixadas em resina e submetidas à análise pela microscopia eletrônica de transmissão.....	141
Figura 56 - Fotomicrografia das células provenientes da linhagem T10 fixadas com glutaraldeído e coradas com Azul da toluidina	142
Figura 57 - Eletromicrografia das células provenientes da linhagem T10, fixadas em resina e submetidas à análise pela microscopia eletrônica de transmissão.....	143
Figura 58 - Fotomicrografia das células provenientes da linhagem T12 fixadas com glutaraldeído e coradas com Azul da toluidina	144
Figura 59 - Eletromicrografia das células provenientes da linhagem T12, fixadas em resina e submetidas à análise pela microscopia eletrônica de transmissão.....	144

Figura 60 - Fotomicrografia das células provenientes da linhagem T13 fixadas com glutaraldeído e coradas com Azul da toluidina	145
Figura 61 - Eletromicrografia das células provenientes da linhagem T13, fixadas em resina e submetidas à análise pela microscopia eletrônica de transmissão.....	146
Figura 62 - Fotomicrografia das células provenientes da linhagem T15 fixadas com glutaraldeído e coradas com Azul da toluidina	147
Figura 63 - Eletromicrografia das células provenientes da linhagem T15, fixadas em resina e submetidas à análise pela microscopia eletrônica de transmissão.....	147
Figura 64 - Fotomicrografia das células provenientes da linhagem T16 fixadas com glutaraldeído e coradas com Azul da toluidina	148
Figura 65 - Eletromicrografia das células provenientes da linhagem T16, fixadas em resina e submetidas à análise pela microscopia eletrônica de transmissão.....	149
Figura 66 - Fotomicrografia das células provenientes da linhagem T17-1 fixadas com glutaraldeído e coradas com Azul da toluidina	150
Figura 67 - Eletromicrografia das células provenientes da linhagem T17-1, fixadas em resina e submetidas à análise pela microscopia eletrônica de transmissão.....	150
Figura 68 - Fotomicrografia das células provenientes da linhagem T17-2 fixadas com glutaraldeído e coradas com Azul da toluidina	151
Figura 69 - Eletromicrografia das células provenientes da linhagem T17-2, fixadas em resina e submetidas à análise pela microscopia eletrônica de transmissão.....	152
Figura 70 - Fotomicrografia das células provenientes da linhagem T17-suspensão fixadas com glutaraldeído e coradas com Azul da toluidina.....	153
Figura 71 - Eletromicrografia das células provenientes da linhagem T17-suspensão, fixadas em resina e submetidas à análise pela microscopia eletrônica de transmissão.....	153
Figura 72 - Fotomicrografia das células provenientes do tumor T18 recém-coletado fixado com glutaraldeído e coradas com Azul da toluidina	154
Figura 73 - Eletromicrografia das células provenientes do tumor T18 recém-coletado, fixadas em resina e submetidas à análise pela microscopia eletrônica de transmissão	155

Figura 74 - Fotomicrografia das células provenientes da medula óssea estimuladas com IL-3 e SCF, caracterizadas pela imunocitoquímica para E-caderina, triptase, c-Kit e vimentina	156
Figura 75 - Fotomicrografia representativa da imunocitoquímica para E-caderina nas células controle e nas diferentes linhagens celulares do mastocitoma canino	157
Figura 76 - Fotomicrografia representativa da imunocitoquímica para β -catenina nas células controle e nas diferentes linhagens mastocitomas	158
Figura 77 - Fotomicrografia representativa da imunocitoquímica para p120-catenina nas células controle e nas diferentes linhagens mastocitomas	159
Figura 78 - Fotomicrografia representativa da imunocitoquímica para PTEN nas células controle e nas diferentes linhagens mastocitomas	160
Figura 79 - Fotomicrografia representativa da imunocitoquímica para c-Kit nas células controle e nas diferentes linhagens mastocitomas	161
Figura 80 - Fotomicrografia representativa da imunocitoquímica para Cx32 nas células controle e nas diferentes linhagens mastocitomas	162
Figura 81 - Fotomicrografia representativa da imunocitoquímica para Cx43 nas células controle e nas diferentes linhagens mastocitomas	163
Figura 82 - Fotomicrografia representativa da imunocitoquímica para α -catenina nas células controle e nas diferentes linhagens mastocitomas	164
Figura 83 - Fotomicrografia representativa da imunocitoquímica para MMP-7 nas diferentes linhagens mastocitomas	164
Figura 84 - Fotomicrografia representativa da imunocitoquímica para Triptase nas diferentes linhagens mastocitomas	165
Figura 85 - Fotomicrografia representativa da imunocitoquímica para Vimentina nas diferentes linhagens mastocitomas	166
Figura 86 - Fotomicrografia representativa da dupla marcação pela imunofluorescência para E-caderina e PTEN nas células controle MCF10A e nas diferentes linhagens mastocitomas	168
Figura 87 - Fotomicrografia representativa da dupla marcação pela imunofluorescência para β -catenina e PTEN nas células controle MCF10A e nas diferentes linhagens mastocitomas	170
Figura 88 - Fotomicrografia representativa da dupla marcação pela imunofluorescência para α -catenina e PTEN nas células controle MCF10A e nas diferentes linhagens mastocitomas	172

Figura 89 - Fotomicrografia representativa da dupla marcação pela imunofluorescência para p120-catenina e PTEN nas células controle MCF10A e nas diferentes linhagens mastocitomas	174
Figura 90 - Fotomicrografia representativa da dupla marcação pela imunofluorescência para E-caderina e Cx43 nas células controle MCF10A e nas diferentes linhagens mastocitomas	176
Figura 91 - Fotomicrografia representativa da dupla marcação pela imunofluorescência para E-caderina e c-Kit nas células controle MCF10A e nas diferentes linhagens mastocitomas	178
Figura 92 - Fotomicrografia representativa da dupla marcação pela imunofluorescência para E-caderina e MMP-7 nas células controle MCF10A e nas diferentes linhagens mastocitomas	180
Figura 93 - Fotomicrografia representativa da dupla marcação pela imunofluorescência para E-caderina e Cx32 nas células controle MCF10A e nas diferentes linhagens mastocitomas	182
Figura 94 - Fotomicrografia representativa da dupla marcação pela imunofluorescência para Triptase e PTEN nas células controle MCF10A e nas diferentes linhagens mastocitomas	184
Figura 95 - Fotodocumentação em gel de agarose do produto de PCR para o éxon 8 do gene c-kit	185
Figura 96 - Fotodocumentação em gel de agarose do produto de PCR para o éxon 10-11 do gene c-kit.....	186
Figura 97 - Fotodocumentação em gel de agarose do produto de PCR para o éxon 17 do gene c-kit.....	186
Figura 98 - Sequência nucleotídica do RNA mensageiro do gene c-kit canino e a sequência de aminoácidos deduzida.....	187
Figura 99 - Representação esquemática da proteína c-kit, indicando a localização do éxon 8 na região do domínio extracelular	188
Figura 100 - Sequência nucleotídica do produto gerado pelos primers do exon 8 do gene c-kit, utilizando o DNA genômico.....	189
Figura 101 - A figura ilustra a região de reconhecimento e alinhamento do éxon 8 no gene c-kit, o qual se alinhou perfeitamente na região do domínio extracelular do gene	189
Figura 102 - A figura ilustra o resultado do pareamento de bases do RNA mensageiro e o produto do exon 8 do gene c-kit pelo programa BLAST.....	190

Figura 103 - Esquematisação das mudanças ocorridas no gene c-Kit com a inserção do G no exon 8	191
Figura 104 - Eletroferogramas do sequenciamento do éxon 8 do gene c-kit, demonstrando uma alteração em heterozigose (G → A), no códon 425.....	191
Figura 105 - A figura ilustra o resultado do pareamento de bases do RNA mensageiro com o produto do exon 8 do gene c-kit pelo programa BLAST.....	192
Figura 106 - Esquema das mudanças ocorridas na sequencia genica com a inserção de um Guanina no exon 8 do gene c-kit.....	192
Figura 107 - Eletroferogramas do sequenciamento do éxon 8 do gene c-kit, demonstrando uma alteração em homozigose (G → A).....	192
Figura 108 - Esquema das mudanças ocorridas no éxon 8 do gene c-kit, mostrando uma alteração no códon 442 em homozigose (G → A), nos dois alelos do gene.....	193
Figura 109 - Eletroferograma do sequenciamento do éxon 8 do gene c-kit, mostrando uma alteração em homozigose (G → A), no códon 442.....	193
Figura 110 - A figura ilustra a região de reconhecimento do éxon 10 - 11 no gene c-kit o qual se alinhou perfeitamente na região do domínio transmembrana do gene.....	194
Figura 111 - A figura ilustra a região de reconhecimento dos éxons 10 - 11 no gene c-kit o qual se alinhou perfeitamente na região do domínio transmembrana do gene.....	194
Figura 112 - A figura ilustra a região de reconhecimento do éxon 10 do gene c-kit o qual se alinhou perfeitamente na região do domínio transmembrana do gene c-kit pelo programa BLAST	195
Figura 113 - A figura ilustra a região de reconhecimento do éxon 11 no gene c-kit o qual se alinhou perfeitamente na região do domínio transmembrana do gene c-kit pelo programa BLAST	196
Figura 114 - Eletroferograma esta representando a sequencia normal do exon 11do gene c-kit na região do códon 576	196
Figura 115 - A figura ilustra a região de reconhecimento do éxon 10 - 11 no gene c-kit o qual se alinhou perfeitamente na região do domínio transmembrana do gene apresentando alteração na leitura do códon 576 ...	197

Figura 116 - O esquema ilustra a região do códon 576 do éxon 11 do gene c-kit onde ocorreu uma troca de uma Citosina por uma Timina, mantendo o aminoácido tirosina	197
Figura 117 - A figura ilustra a região do códon 576 do éxon 11 onde houve a troca de uma Citosina por uma Timina	198
Figura 118 - A figura ilustra a sequencia do produto de PCR e reconhecimento do éxon 17 no gene c-kit	198
Figura 119 - A figura ilustra a região de pareamento e reconhecimento do éxon 17 no gene c-kit o qual se alinhou perfeitamente na região do domínio intracitoplasmático do gene.....	199
Figura 120 - A figura ilustra a região de pareamento e reconhecimento do éxon 17 no gene c-kit o qual se alinhou perfeitamente na região do domínio intracitoplasmático do gene.....	199
Figura 121 - A figura ilustra o eletroferograma da sequencia normal do éxon 17 do gene c-kit	199

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Nucleotideo Adenina
A	Alfa
aa	Aminoácidos
AL	Abdome lateral
AKT	Também conhecida como "proteína quinase B", PKB
APC	Adenomatous polyposis coli
α -1PI	Alpha-1 proteinase inhibitor
β	Beta
β -cat	β -catenina,
BE	Bolsa escrotal
BD	Domínio de ligação
C	Cabeça/pescoço
C	Nucleotideo Citosina;
C	Extremidade C-terminal
Ca	Região matriz de cisteína
CAC	Campos de alta celularidade
Cat	Catalítico domínio
CDH1	Gene cadherin 1
CD13 ⁺	Progenitores Hematopoiéticos CD13 ⁺
CD34 ⁺	Progenitores Hematopoiéticos CD34 ⁺
CD44	É uma glicoproteína da superfície celular envolvidas nas interacções célula-célula,
CD117 ⁺	Progenitores Hematopoiético c-kit
CFSE	Carboxifluoresceína succinimidyl éster
CFDA, SE	Diacetato carboxifluoresceína succinimidyl éster
CK	Quinase caseína
CTNND1	Catenin (Cadherin-Associated Protein), Delta 1 ¹
Conéxons	Unidade morfológica das junções do tipo GAP que consiste da oligomerização de 6 conexinas

Códon	Sequência de três nucleotídeos do ácido ribonucleico mensageiro que, na síntese de proteínas
Cp	Domínio citoplasmático
CpG	Citosina e guanina ligadas por fosfatos
Cx32	Conexina 32; proteína da junção GAP beta-1
Cx43	Conexina 43; proteína da junção GAP alfa-1
DAB	Diaminobenzidina tetrahidrocloreto
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol, corante núcleo celular
Di	Dígito
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo trifosfatado
EC1	Domínio extracelular
EGF	Fator de crescimento Epidermico
Éxon	Um segmento de bases nitrogenadas de um determinado gene eucarioto que consiste de DNA que codifica para uma sequência de nucleotídeo no RNA mensageiro.
EDTA	Ácido etilenodiaminotetraacético
EPLIN	Proteína epitelial perdida em neoplasia
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FAM	Cromógeno fosforamidite
FcεRI	Receptor de alta afinidade por IgE
FMVZ/USP	Faculdade Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo
Fn	Domínio fibronectina
FcεRI	Receptores Fcε de alta afinidade
GAP	Proteína ativadora da GTPase
G	Âncora GPI
G	Nucleotídeo Guanina
G1	Fase de crescimento 1
G2	Fase de crescimento 2
G0	Fase de quiescência
GJIC	Comunicação por junções comunicantes entre duas células caracterizadas pelo acoplamento de conéxons de ambas as células adjacentes
GJB1	Gap junction beta-1 protein

GAP	Junções GAP
HAV	Histidina-alanina-valina,
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
H/E	Hematoxilina-Eosina
HOVET	Hospital Veterinário
Hpx	domínio hemopexina
HRP	Horseradish Peroxidase
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule 1
IgE	Imunoglobulina E
HMC-1	Linhagem de mastócitos humanos
Intron	Seção de DNA que não codifica qualquer parte da proteína produzida pelo gene
IgE	Imunoglobulina E
ID	Índice de DNA;
IL	Immunoglobulin-like
IL	Interleucinas
IP	Iodeto de propídio
I/P	Inguinal/perineal
JA	Juncões aderentes
JAK2	Janus quinase 2
kDa	Kilodaltons
L	Lombar
LA	Lateral da coxa
LSAB	Labeled Streptavidin Biotin
M	Fase de Mitose
MB	Membros
MCP	Mastócitos caninos de pele
MCMO	Mastócito de medula óssea
MCF10A	Células mamárias humanas
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MMP	Metaloproteinases de matriz
MMP-7	Matrilisina
MCTs	Mastocitomas cutâneos caninos
mRNA	Ácido Ribonucléico mensageiro

MP	Membrana proximal
MTQ	Os mastócitos da pele contêm triptase, quimase e carboxipeptidase
MT	Os mastócitos de mucosas contêm triptase
N	N-terminal
NaOH	Hidróxido de sódio
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NR	Óbito não relacionado ao tumor
OMS	Organização Mundial da Saúde
P	Prepúcio
P-815	Linhagem celular de mastocitoma de camundongo
PAF	Punção por agulha fina
PBS	Solução tampão a base de fosfato
PCR	Reação em Cadeia Polimerase
PDGFR alfa e beta	Receptores alfa e beta do fator de crescimento derivado das plaquetas
PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i>
PKD	Proteína quinase D
PTEN	Phosphatase and tensin homologue
PHTN	PTEN hamartoma tumor syndromes
PLC	Fosfolipase C
PI3K	Phosphatidylinositide 3-kinases
PIPKI γ	Fosfatidilinositol-fosfato quinase I γ
PTP μ	Proteína tirosina fosfato μ ,
PIP	Fosfatidilinositol
PIP2	Fosfatidilinositol-4,5-bifosfato
PIP3	Fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfato
Primer	Oligonucleotídeos que recebem um determinado gene; iniciadores
PM	Peso molecular
PVP-40	Polivinilpirolidona - 40
PRO	Propeptídeo,
PS1	Presenilina 1
R	Óbito relacionado ao tumor
RBL-2H3	Linhagem de mastócitos de rato
RNA _m	Acido ribonucleico mensageiro
RPM	Rotações por minuto

S	Fase de síntese
S	Peptídeo sinal,
SCF	Stem Cell Factor
SCFR	Receptor de Stem Cell Factor
SDS	Sódio dodecil sulfato
SFBi	Soro fetal bovino inativado
SHP-1	Uma proteína fosfatase não receptora
Src	Rous sarcoma virus
SRD	Sem Raça Definida
T	Torácica
T	Nucleotídeo Timina;
TCF	Fator de transcrição
TPA	12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate
TM4SF	Membros da superfamília transmembranar 4
LET	Lymphoid enhancer-binding factor 1
TM	Domínio transmembranar
V	Inserção vitronectina
VPT	Departamento de Patologia Animal
Zn	Sítio ativo zinco
Wnt1	(wingless-type mmtv integration site family, member 1)

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Alfa
β	Beta
Cm	Centímetro
M	Molar
Mg	Miligramma
G	Gramma
Kg	Quiligramma
hs	Horas
ML	Mililitro
μ l	Microlitro
nm	Nanômetros
ng	Nanogramma
pmol	Picomol
μ m	Micrometro
μ M	Micromol
mM	MiliMol
%	Porcentagem
=	Igual
p (valor)	Valor da estatística p ou p-valor
®	Marca registrada
pH	Indicador ácido-básico
°C	Graus Celsius
γ	Gama
δ	Delta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	37
2 OBJETIVOS	40
2.1 OBJETIVO GERAL.....	40
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	40
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	42
3.1 MASTÓCITOS.....	42
3.2 MASTOCITOMA	45
3.2.1 Incidência e Etiopatologia.....	45
3.2.2 Comportamento Biológico e Metástases.....	47
3.2.3 Diagnóstico e características histopatológicas	57
3.2.4 Tratamento.....	51
3.2.5 Prognóstico	52
3.2.6 Marcadores moleculares	52
3.2.6.1 Complexo de adesão E-caderina/cateínas.....	53
3.2.6.2 β -catenina	56
3.2.6.3 α -catenina	58
3.2.6.4 p120-catenina.....	58
3.2.6.5 Metaloproteinase matrix (MMP).....	59
3.2.6.5.1 <i>Matrilisina (MMP7)</i>	61
3.2.6.6 PTEN	62
3.2.6.7 Comunicação juncional... ..	63
3.2.6.7.1 <i>Conexinas 43</i>	66
3.2.6.7.2 <i>Conexinas 32</i>	67
3.2.6.8 Proto-oncogene c-kit	68
3.2.6.9 Triptase	73
3.2.6.10 Vimentina	74
3.2.7 Cultura celular primária de mastocitomas caninos	75
3.2.8 Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	75
3.2.9 Ploidia de DNA e Ciclo celular por citometria de fluxo.....	78
3.2.10 Proliferação celular pelo CFSE.....	78
4 MATERIAL E MÉTODOS	81

4.1 SELEÇÃO DOS ANIMAIS	81
4.2 COLETA DO MATERIAL PARA CULTIVO CELULAR	81
4.3 SELEÇÃO DAS AMOSTRAS DO ACERVO PARA ESTUDO.....	82
4.4 HISTÓRICO CLÍNICO.....	82
4.5 PROCESSAMENTO E CLASSIFICAÇÃO DOS TUMORES.....	82
4.6 ANÁLISE IMUNOISTOQUÍMICA	83
4.6.1 Avaliação da expressão da E-caderina	84
4.6.2 Avaliação da expressão das cateninas.....	85
4.6.3 Avaliação da expressão do gene supressor de tumor PTEN.....	85
4.6.4 Avaliação da expressão da Matrilisina (MMP7)	86
4.6.5 Avaliação da expressão do proto-oncogene KIT	86
4.7 CULTURA CELULAR.....	86
4.7.1 Cultura de células primária de mastocitomas canino	87
4.7.2 Cultura de células de medula óssea canina	88
4.8 ANÁLISE DAS FASES DO CICLO CELULAR E PLOIDIA	88
4.9 ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR PELO CFSE	89
4.10 IMUNOCITOQUÍMICA.....	89
4.11 IMUNOFLUORESCÊNCIA	90
4.12 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET).	91
4.13 ANÁLISE MUTACIONAL DO GENE c-Kit	92
4.13.1 Extração DNA genômico.....	92
4.13.2 Reação em Cadeia Polimerase.....	93
4.13.3 Purificação dos produtos de PCR	95
4.13.4 Reação de Sequenciamento Gênico.....	95
4.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	96
5 RESULTADOS	98
5.1 HISTÓRICO CLÍNICO.....	98
5.2 GRADUAÇÃO HISTOPATOLÓGICA	101
5.2.1 Coloração Azul de Toluidina	103
5.3 IMUNOMARCAÇÃO PARA E-CADERINA (Clone NCH38).....	103
5.4 IMUNOMARCAÇÃO PARA E-CADERINA (Clone HECD-1)	106
5.5 IMUNOMARCAÇÃO PARA β -CATENINA	108
5.6 IMUNOMARCAÇÃO PARA α -CATENINA	110
5.7 IMUNOMARCAÇÃO PARA p120-CATENINA	112

5.8 IMUNOMARCAÇÃO PARA PTEN	115
5.9 IMUNOMARCAÇÃO PARA MMP-7	116
5.10 IMUNOMARCAÇÃO PARA c-Kit.....	118
5.11 ESTABELECIMENTO DO CULTIVO CELULA DOS MASTOCITOMAS	120
5.11.1 Cultivo de Mastócitos a partir da medula óssea canina.....	122
5.11.2 Estabelecimento das linhagens celulares dos tumores de mastocitoma	124
5.12 CICLO CELULAR E PLOIDIA DE DNA	130
5.13 PROLIFERAÇÃO CELULAR PELO MÉTODO CFSE.....	134
5.14 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)	136
5.15 IMUNOCITOQUÍMICA.....	155
5.15.1 Avaliação dos Mastócitos provenientes de Medula óssea	155
5.15.2 Avaliação da expressão da E-caderina nas linhagens tumorais	156
5.15.3 Avaliação da expressão da β-catenina nas linhagens tumorais.....	157
5.15.4 Avaliação da expressão da p120-catenina nas linhagens tumorais.....	158
5.15.5 Avaliação da expressão do PTEN nas linhagens tumorais	159
5.15.6 Avaliação da expressão do c-kit nas linhagens tumorais	160
5.15.7 Avaliação da expressão da Conexina 32 nas linhagens tumorais.....	161
5.15.8 Avaliação da expressão da Conexina 43 nas linhagens tumorais.....	162
5.15.9 Avaliação da expressão da α-catenina nas linhagens tumorais.....	163
5.15.10. Avaliação da expressão da MMP-7 nas linhagens tumorais	164
5.15.11 Avaliação da expressão da Triptase nas linhagens tumorais	165
5.15.12 Avaliação da expressão da vimentina nas linhagens tumorais.....	166
5.16 IMUNOFLUORESCÊNCIA	166
5.16.1 Dupla marcação pela imunofluorescência para E-caderina e PTEN	166
5.16.2 Dupla marcação pela imunofluorescência para β-catenina e PTEN	169
5.16.3 Dupla marcação pela imunofluorescência para α-catenina e PTEN	171
5.16.4 Dupla marcação pela imunofluorescência para p120-catenina e PTEN	173
5.16.5 Dupla marcação pela imunofluorescência para E-caderina e Conexina 43.....	175
5.16.6 Dupla marcação pela imunofluorescência para E-caderina e c-kit	177
5.16.7 Dupla marcação pela imunofluorescência para E-caderina e MMP-7.....	179
5.16.8 Dupla marcação pela imunofluorescência para E-caderina e Cx32.....	181
5.16.9 Dupla marcação pela imunofluorescência para Triptase e PTEN.....	183
5.17 ANÁLISE MUTACIONAL DO GENE C-KIT	184

5.17.1 Amplificação do Gene c-kit pela Reação em Cadeia Polimerase (PCR)	185
5.17.2 Sequenciamento gênico do gene Gene c-kit.....	187
5.17.2.1 Análise do exon 8 do gene c-kit	188
5.17.2.2 Análise dos exons 10-11 do gene c-kit.....	194
5.17.2.3 Análise dos exons 17 do gene c-kit	198
6 DISCUSSÃO	201
7 CONCLUSÕES.....	232
REFERÊNCIAS.	234
GLOSSÁRIO	273

Introdução

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos tem se relatado uma grande incidência de afecções neoplásicas em animais domésticos e a prevalência tem aumentado devido à sobrevida mais longa desses animais. Neste contexto, o cão tem sido uma das espécies mais acometidas. Dentre as neoplasias cutâneas que acometem os cães, o mastocitoma é a mais frequente, representando cerca de 7 a 21% de todos os tumores cutâneos (GROSS et al., 2005) e 11 a 27% de todos os tumores malignos desta espécie (THAMM; VAIL, 2001, 2007), contrastando com os humanos, em que as neoplasias dos mastócitos são muito raras (THARP, 1998). Os mastocitomas apresentam um comportamento biológico muito variável. Vários autores têm direcionado sua pesquisa na busca de parâmetros clínicos ou patológicos que possam ser utilizados no diagnóstico e/ou prognóstico do mastocitoma. Apesar de alguns avanços nesta área, o conhecimento a respeito desta neoplasia ainda é insuficiente. Até o momento o grau histológico tem-se revelado o critério mais consistentemente associado com o prognóstico (HOTTENDORF; NIELSEN, 1968; BOSTOCK 1973; PATNAIK et al., 1984; SIMÕES et al., 1994; THAMM et al., 2006).

Nos últimos anos, observamos um avanço crescente na procura de novos elementos que apoiem esses critérios de classificação morfológica. Dentre eles, os estudos “*in vitro*” têm auxiliado a compreensão de diversos fatores responsáveis pela proliferação dos mastócitos e seu mecanismo de ação frente a patógenos. Sendo os mastócitos células que se dispersam no tecido conjuntivo, seu isolamento e cultivo fazem-se necessários para avaliarmos as alterações genéticas e epigenéticas nas células tumorais somente, e não nas demais células do tecido conjuntivo.

O objetivo fundamental desta tese foi a detecção de alterações genéticas em mastocitomas caninos as quais poderiam representar fatores prognósticos, fornecendo indicações mais precisas acerca do comportamento destes tumores. Foram estudados 18 casos de mastocitomas caninos (6 de grau 1, 6 de grau 2 e 6 de grau 3), os quais foram caracterizados segundo alguns parâmetros epidemiológicos e clínicos como a raça, o gênero e a idade dos animais, bem como a localização das lesões. Foram utilizados métodos de imunohistoquímica para avaliação das proteínas do complexo de adesão célula-célula (E-caderina, β -catenina, α -catenina e p120 catenina), caracterização de componentes da matriz

(MMP-7), gene supressor de tumor (PTEN), da presença de proteínas de membrana (c-Kit), além de proteínas de membrana responsáveis pela comunicação intercelular (Cx32 e Cx43).

Realizou-se ainda o cultivo celular e estabelecimento de 10 linhagens dos diferentes graus do mastocitoma canino, nas quais, foi avaliada a proliferação celular dos tumores “*in vitro*”, além de análises morfológicas e ultraestruturais por meio da microscopia eletrônica de transmissão. Analisou-se também a expressão do gene supressor de tumor PTEN, proto-oncogene KIT, moléculas de adesão do complexo caderina/cateninas, conexinas 43 e 32 e da Matrilisina (MMP7) pela imunocitoquímica e imunofluorescência. Como também a análise mutacional do gene c-kit para os éxons 8, 10-11 e 17 nestas linhagens celulares. O presente estudo buscou saber se estas moléculas presentes em células epiteliais estariam sendo moduladas também em células de origem mesenquimal e se mutações no gene c-kit poderia influenciar suas expressões.

Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Este estudo tem como principal objetivo descrever as alterações de PTEN, c-kit, matrilisina (MMP7), Conexina 32 e Conexina 43, complexo E-caderina/cateninas nas três graduações do mastocitoma cutâneo canino, *ex vivo* e *in vitro*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar análise histopatológica e graduar os mastocitomas segundo Patnaik;
- Estabelecer e caracterizar a cultura primária das três graduações do mastocitoma;
- Avaliar diferenças ultraestruturais dos mastócitos mantidos em cultivo celular;
- Analisar o ciclo celular e ploidia DNA;
- Analisar proliferação celular pelo método CFSE;
- Analisar a localização e expressão por imunoistoquímica para as seguintes proteínas: PTEN, c-kit, MMP-7, Cx32, Cx43, E-caderina, β -catenina, α -catenina, p120-catenina;
- Analisar a localização e expressão por imunocitoquímica e imunofluorescências das proteínas: PTEN, c-kit, MMP-7, Cx32, Cx43, E-caderina, β -catenina, α -catenina, p120-catenina;
- Pesquisar mutações no gene c-Kit.

Revisão de Literatura

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 MASTÓCITOS

Os mastócitos originam-se de células precursoras hematopoéticas localizadas na medula óssea. Embora em muitos aspectos sejam semelhantes aos leucócitos e basófilos, os mastócitos originam-se de uma célula-tronco distinta. Estes mastócitos imaturos circulam na corrente sanguínea, cruzam a parede de vênulas e penetram nos tecidos, onde vão proliferar e se diferenciar (METCALFE et al., 1997) perto dos vasos sanguíneos, nervos, e nas superfícies das mucosas, tais como a pele, trato respiratório e do trato gastrointestinal (BAUER et al., 2000; HEIB et al., 2008), de modo que possam reagir rapidamente em caso de um ataque de xenobióticos, tais como bactérias, parasitas, vírus ou mesmo pólen aparentemente inócuo. Do ponto de vista fisiológico, os mastócitos participam na remodelação do tecido, cura de ferida, e angiogênese (HEBDA et al., 1993; BLAIR et al., 1997; WELLER et al., 2006), enquanto que do ponto de vista patológico eles são considerados como efetores principalmente de doenças alérgicas agudas e crônicas mediadas por Imunoglobulina E (IgE) (WILLIAMS; GALLI, 2000), incluindo as suas funções complexas em doenças autoimunes (BENOIST; MATHIS, 2002), tolerância periférica (SAYED et al., 2008; DE VRIES et al., 2009), na imunidade inata e adaptativa (GALLI et al., 2005a,b; PALKER et al., 2010).

A pele normal do cão contém 4 a 12 mastócitos por campo de maior ampliação, (BENINGO et al., 2000), sendo mais numerosos no pavilhão auricular e no focinho, (AUXILIA; HILL, 2000), localizados principalmente na derme e na junção dermoepidérmica (NOVIANA et al., 2004).

O mastócito é uma célula mononucleada que se apresenta de formas variáveis (redonda, oval, poligonal ou fusiforme), medindo de 8 a 20 µm de diâmetro, com um núcleo redondo central ou ligeiramente descentralizado (AROK, 2004). O seu citoplasma tem uma composição anormal em organelas, mas a sua característica mais evidente são os grânulos citoplasmáticos que contêm numerosos mediadores inflamatórios que são libertados quando estimulado. O tamanho dos grânulos varia entre 0,2 e 0,5 µm de diâmetro. (THARP, 1998), com em média mil grânulos em cada célula. No interior dos grânulos, inúmeras substâncias biologicamente ativas que são sintetizadas e estocadas, como a histamina, heparina,

dopamina, prostaglandinas, diferentes interleucinas e também algumas enzimas como a quimase, triptase, hidrolases, proteoglicanos e as carboxipeptidases (BENSIGNOR et al., 1996). Os proteoglicanos dentro dos grânulos dos mastócitos permitem a ligação a uma variedade de corantes catiônicos, como o azul de toluidina ou o Giemsa, que se coram metacromaticamente (KRAMER; WINDRUM, 1955). Esta metacromasia é causada pela presença de hexassacarídeos, a unidade fundamental da heparina (JAQUES et al., 1977).

Células precursoras dos mastócitos estão presentes na medula óssea, cordão umbilical, sangue periférico e fígado fetal. A diferenciação efetua-se a partir de progenitores hematopoiéticos CD34⁺ *stem cells*, ou CD13⁺, e CD117⁺ (também conhecido como KIT) na medula óssea (KIRSHENBAUM et al., 1999; AROK, 2004), no sangue periférico são células agranulares, (KIRSHENBAUM et al., 1991). Depois de migrarem para os tecidos, estas células precursoras dos mastócitos assumem a sua típica aparência granulares e completam a sua maturação com a concomitante diversidade fenotípica (ZUCKER-FRANKLIN et al., 1981; KIRSHENBAUM et al., 1991; GURISH; AUSTEN, 2001).

A diferenciação e a proliferação dos mastócitos são reguladas por dois mecanismos distintos. O primeiro é dependente de um fator de crescimento derivado dos fibroblastos *Stem Cell Factor* - (SCF), e o segundo é dependente de interleucinas (IL) produzidas por células T (IL-3, -4, -9 e -10) (HILL; MARTIN, 1998). A IL-3 é importante para a proliferação precoce dos mastócitos, enquanto que o SCF atua para manter a viabilidade e promover a maturação dos mesmos (METCALFE et al., 1997).

A diferenciação celular se estabelece quando precursores apresentam sequencialmente os seguintes marcadores: os antígenos precoces CD34, o CD13 e o c-Kit (KIRSHENBAUM et al., 1999), marcadores de diferenciação precoce (FcεRI ou receptor IgE, histamina e triptase) (WELLE, 1997; CARTER; METCALFE, 2002), e marcadores de diferenciação tardia (heparina, quimase) (WELLE, 1997). A heparina e a quimase são marcadores presentes somente nos mastócitos que se encontram nos tecidos. As enzimas quimase e triptase são específicas dos mastócitos, sendo a triptase a de escolha na sua identificação, (SCHWARTZ, 1985).

Existem duas populações de mastócitos as residentes na pele e as da mucosa as quais possuem características histoquímicas e bioquímicas distintas. Os mastócitos da mucosa contêm apenas triptase, enquanto que os do tecido conjuntivo contêm triptase, quimase e catepsina G (NOLI; MIOLO, 2001). Foram identificados no homem dois tipos de mastócitos, segundo suas determinações bioquímicas e morfológicas (THARP, 1998). Os mastócitos da

pele contêm triptase, quimase e carboxipeptidase, denominando-se MTQ (IRANI et al., 1991; CAUGHEY, 1996; THARP, 1998). Mais de 90% dos mastócitos cutâneos contêm triptase e quimase (BUCKLEY et al., 1999). Por outro lado, a maioria dos mastócitos do pulmão e da mucosa intestinal produz apenas triptase e estes foram denominados MT (BEIL; PAMMER, 2001). Além dessas duas populações, existem outros mastócitos que apresentam apenas a enzima quimase e são denominados MQ, que podem estar presentes numa medula normal ou reativa, em gânglios axilares, pulmão, mucosa e submucosa intestinal (WEIDNER; AUSTEN, 1993; HORNY et al., 2003). O fenótipo dos mastócitos humanos também é heterogêneo no seu conteúdo em citocinas. Por exemplo, a IL-4 existe preferencialmente em MTQ enquanto que a IL-5 e IL-6 estão quase exclusivamente restritas ao subtipo MT (PUXEDDU et al., 2003). A heterogeneidade dos mastócitos também se provou na pele canina. Os mastócitos do cão, tal como os mastócitos humanos são heterogêneos em relação ao seu conteúdo em proteases (CAUGHEY, 1988), sendo que ambas as proteínas quimase e triptase foram clonadas e caracterizadas (CAUGHEY et al., 1990). No cão foram identificados três tipos de mastócitos baseados no seu conteúdo em triptase e quimase e na sensibilidade ao formol. Os mastócitos que contêm as duas enzimas são os mais comuns na pele canina após fixação com formol, constituindo cerca de 70% dos mastócitos cutâneos (KUBE et al., 1998; WELLE et al., 1999; NOLI; MIOLO, 2001). A heterogeneidade dos mastócitos é regulada por muitos fatores, incluindo citocinas que influenciam a maturação, diferenciação e proliferação celular. Os mastócitos podem mudar suas características fenotípicas de forma reversível de acordo com alterações no ambiente (KITAMURA, 1989). Essas células exibem essas diferenças em suas propriedades bioquímicas e funcionais, gerando populações individuais, o que permite uma maior flexibilidade frente a estresses fisiológicos, imunológicos, inflamatórios e em outras atividades biológicas em que estejam envolvidos (LONGLEY et al., 1995; GALLI et al., 2005).

Os mastócitos estão presentes no tecido conjuntivo e são importantes na resposta inflamatória e traumatismos teciduais. Os grânulos citoplasmáticos encontrados nestas células contêm substâncias biologicamente ativas, tais como heparina, histamina, fator ativador de plaquetas e fator quimiotático eosinofílico (LAZARUS et al., 1986; METCALFE et al., 1997; JANEWAY et al., 2002), sugerem que os mastócitos caninos assemelham-se mais aos mastócitos humanos do que os de camundongos.

Interações entre células e os componentes da matriz do tecido conjuntivo podem alterar a biologia da célula envolvida. A ligação dos componentes da matriz com os

mastócitos regula vários processos como a fosforilação intracelular de proteínas, incorporação de timidina, liberação de histamina e mobilidade celular. É razoável esperar que estas interações matriz-mastócitos resultem também em alterações fisiológicas (THOMPSON et al., 1989; ROTTEM et al., 1993), síntese de citocinas, síntese de grânulos, sobrevivência celular e apoptose. De fato, estas interações entre os mastócitos e a matriz que o rodeia pode eventualmente ser mostrada como sendo o maior estímulo regulatório para ajustar a resposta biológica de mastócitos diferenciados e maduros (MEKORI; OH; METCALFE, 1993).

Quanto à adesão dos mastócitos foi observado que ela é acompanhada pelo espraiamento das células e uma redistribuição dos grânulos citoplasmáticos. A adesão também se mostrou ser dependente de cálcio e da temperatura (THOMPSON et al., 1991).

Mastócitos maduros estão localizados preferencialmente na pele, sistema respiratório, trato gastrointestinal e gênito-urinário próximos a vasos sanguíneos e linfáticos. São as células-chave nas reações alérgicas agudas e também têm um importante papel nas reações crônicas (MOTA, 1995).

3.2 MASTOCITOMA

O mastocitoma foi descrito pela primeira vez por Bashford et al., em 1905. Os mastocitomas são formações cutâneas neoplásicas originadas de mastócito (SELYE, 1965; VAIL, 1996; SOTER, 2000). Nos humanos a ocorrência é rara, no entanto, em cães o mastocitoma representa um dos tumores mais comum na espécie (MACY, 1985; DE NARDI et al., 2002),

3.2.1 Incidência e etiopatogenia

A neoplasia originária de mastócitos é denominada mastocitoma e esta doença é comum e representa 7 - 21% dos tumores caninos (PRIESTER, 1973; COHEN et al., 1974). A distinção deve ser feita entre mastocitose humana que é geralmente transitória ou indolente (LONGLEY et al., 1995) e neoplasia de mastócitos canino que é uma doença imprevisível e muitas vezes agressiva e metastática (MACY; MACEWEN, 1989). Os casos de mastocitoma

humano essencialmente solitário nunca metastatizam, já os mastocitomas caninos comportam-se de modo maligno em 50 % dos casos (HOTTENDORF; NIELSEN, 1969).

Os mastocitomas dos cães ocorrem principalmente na faixa etária de oito a nove anos, não havendo predisposição sexual ou raça definida, embora as raças Boxer, Boston Terrier, Bull Terrier, Beagle, Labrador Retriever, Golden Retriever, Fox Terrier, Bulldog Inglês, Pugs, Schnauzer, Shar-pei, Bull Mastiff, Cocker Spaniel, Staffordshire Terrier, Fox Terrier, Dachshund, Rhodesian Ridgebacks sejam as mais predispostas (PATNAIK et al., 1984; SIMOES et al., 1994; VAIL, 1996; GOLDSCHMIDT, HENDRICK, 2002; LONDON; SÉGUIN, 2003; STREFEZZI et al., 2003; MISDORP, 2004; RECH et al., 2004; WELLE et al., 2008).

Os mastocitomas apresentam-se na forma cutânea como nodulações avermelhadas na derme, não encapsulados, com tamanho variando de 1 a 30 cm de diâmetro. Esses nódulos podem ser múltiplos ou solitários, de consistência firme e muitas vezes infiltrada no subcutâneo e na musculatura circunvizinha (MADEWELL; THIEILEN, 1987; FOX, 1998).

As formações solitárias são muito mais frequentes, mas mastocitomas cutâneos múltiplos são relatados entre 5 e 25% dos pacientes. Não está claro se os tumores múltiplos são metástases ou possuem origem multicêntrica (TURIN et al., 2006).

A maioria dos mastocitomas se estende além das bordas palpáveis (HOTTENDORF; NIELSEN, 1968). O mastocitoma pode ocorrer em todo o corpo, mas aproximadamente 50% deles estão localizados no tronco e períneo, 40% nos membros e 10% na cabeça e pescoço (TARDY et al., 1992; FOX, 1998; TORTELLY et al., 2000). Mais raramente o mastocitoma pode se apresentar na forma visceral e disseminada e se caracteriza principalmente por massas neoplásicas no baço, fígado, mediastino, pulmão e linfonodos (POLLACK et al., 1991).

A etiopatogenia e os eventos moleculares e genéticos que contribuem para a tumorigênese durante o desenvolvimento e progressão dos tumores ainda não estão bem elucidados, acreditando-se na existência de origem multifatorial (THAMM; VAIL, 2007). A etiologia dos mastocitomas nos cães é desconhecida. Várias hipóteses associam tais proliferações a processos inflamatórios crônicos ou aplicações de substâncias irritantes em subcutâneo (GOVIER, 2003). Alguns relatos sugerem a associação dos mastocitomas a uma etiologia viral (MISDORP, 2004). A transmissão hereditária de sequências de genes predispostos a esta neoplasia foi evidenciado nas raças descendentes do Bulldog, sendo observada uma fragilidade cromossômica, com instabilidade nos cromossomos 3, 4 e 15, mas essas alterações foram interpretadas como consequências da idade avançada dos animais e

não uma síndrome racial específica ou doença familiar (GINN et al., 2000). O desenvolvimento do tumor provavelmente dependa de outros fatores, como agente carcinogênico ou vírus (MACY, 1985).

3.2.2 Comportamento biológico e metástases

As metástases associadas aos mastocitomas ocorrem em linfonodos regionais em aproximadamente 76% dos casos. Outros órgãos como baço, fígado e medula óssea também são acometidos com frequência (MACY, 1985). Os sinais clínicos são dependentes da localização e tamanho do tumor, bem como das complicações secundárias (THAMM; VAIL, 2007). As alterações sistêmicas podem ocorrer devido à degranulação dos mastócitos e a subsequente liberação de heparina e histamina. A histamina pode estimular os receptores gástricos de H₂, resultando em uma excessiva secreção ácida e hipermotilidade, podendo levar a formação de úlceras gástricas e duodenais. Clinicamente o animal pode apresentar anorexia, vômito, diarreia e melena (O'KEEFE, 1990; FOX, 1998; TORTELLY et al., 2000). Coagulopatias estão associadas aos mastocitomas devido à liberação de heparina (MACY, 1985; TORTELLY et al., 2000).

3.2.3 Diagnóstico e características histopatológicas

O diagnóstico preciso dos mastocitomas é importante para escolha apropriada do tratamento e determinação do prognóstico (RECH et al., 2004). O diagnóstico citológico pode ser realizado por meio de punção por agulha fina (PAF) ou por decalque das lesões sobre a lâmina de microscopia (O'KEEFE, 1990; LONDON; SÉGUIN, 2003). É provavelmente o método mais simples para o diagnóstico do mastocitoma canino, pois é pouco invasivo, com poucos riscos para o paciente, reduzida agressão ao processo neoplásico e deve ser realizado antes da cirurgia. (GOLDSCHMIDT; HENDRICK, 2002; LAVALLE; CARNEIRO; PEREIRA, 2003). Porém a histopatologia é necessária para confirmar o diagnóstico, graduar o tumor e determinar se as margens cirúrgicas estão livres de células

neoplásicas, além de ser, muitas vezes a única forma de realizar o diagnóstico definitivo de neoplasias pouco diferenciadas (O'KEEFE, 1990; FOX, 1998; SUEIRO et al., 2002; LAVALLE et al., 2004, RECH et al., 2004).

O mastocitoma é uma neoplasia de células redondas e deve passar por um diagnóstico diferencial, pois existem outros tumores de células redondas como o linfoma, plasmocitoma, histiocitoma, melanoma e o tumor venéreo transmissível (LONDON; SÉGUIN, 2003). Com exame citológico são observadas células redondas e, quando coradas com Hematoxilina-Eosina, é possível evidenciar os grânulos citoplasmáticos dos mastócitos. Para a confirmação da graduação destes tumores é recomendada a utilização da coloração pelo Azul de Toluidina, pois cora estes grânulos de vermelho-púrpura (coloração metacromática) e o fundo em azul (coloração ortocromática) (LAVALLE; CARNEIRO; PEREIRA, 2003; LONDON; SÉGUIN, 2003). O primeiro estudo de seguimento classificou os mastocitomas em três categorias: o grau 1, fracamente diferenciado, altamente pleomórfico e com mitoses freqüentes; o grau 2 como de diferenciação intermédia, altamente celular, moderadamente pleomórfico e com mitoses infreqüentes e, por fim, o grau 3 bem diferenciado, menos celular, monomórfico, com feixes de colágeno maduros e com mitoses raras (BOSTOCK, 1973).

Em 1984, Patnaik et al. desenvolveram um trabalho semelhante, estabelecendo a classificação mais aceita atualmente: mastocitoma de grau 1, 2, e 3, conforme o grau crescente de anaplasia celular. Ambos os pesquisadores relacionavam o prognóstico do portador dessa neoplasia com sua sobrevida sendo sempre menor quanto maior o grau de malignidade do tumor. O sistema de gradação de Patnaik usa uma combinação de características citológicas com a espessura do tumor, que se supõe ter origem na derme superficial e expandir-se em profundidade para o tecido subcutâneo. São definidos os mastocitomas de grau 1 como sendo tumores bem diferenciados com bom prognóstico, os mastocitomas de grau 3 como fracamente diferenciados com mau prognóstico e os mastocitomas de grau 2 de diferenciação intermédia e prognóstico intermédio (PATNAIK et al., 1984). Em geral, os mastocitomas são tumores não capsulados, dérmicos ou subcutâneos, constituídos por células redondas organizadas em cordões e em aglomerados celulares. Raramente atingem a junção dermoepidérmica e não se observam agregados de mastócitos intraepidérmicos (GROSS et al., 2005). A epiderme está habitualmente intacta em lesões pequenas e pode estar ulcerada em grandes tumores. O estroma colagenizado varia de escasso a abundante e pode aparecer edemaciado ou hialinizado (GROSS et al., 2005). Estão presentes eosinófilos em número variável, dispersos pelo tumor ou formando agregados,

podendo existir deposição de mucina e hialinização perivascular. Os focos de desgranulação eosinofílica podem envolver feixes de colágeno eosinofílicos brilhantes, para formar figuras em chama, referidas como colagenólise (GROSS et al., 1992; GROSS et al., 2005).

Os mastocitomas de grau 1 são pequenos, bem circunscritos e não capsulados e confinados à derme interfolicular. A epiderme está intacta e as células estão organizadas em cordões e em aglomerados celulares densos e lembram os mastócitos granulados normais, com bordos celulares discretos e grânulos citoplasmáticos basófilos. Os núcleos são pequenos, redondos a ovais, com nucléolos indistinguíveis. As figuras mitóticas são raras ou ausentes. A necrose tumoral é incomum, mas podem surgir ocasionalmente grandes áreas de enfartamento (PATNAIK et al., 1984; HENDRICK et al., 1998; GROSS et al., 2005). Os mastocitomas de grau 2 são usualmente maiores, mais profundos e menos circunscritos que os tumores de grau 1. Em geral estendem-se pela derme profunda e pelo tecido subcutâneo. As células neoplásicas são maiores, mais pleomórficas e de granulação mais dispersa do que as células dos tumores de grau 1. Os núcleos estão moderadamente aumentados, uniformes e vesiculares, com nucléolos pequenos, mas óbvios, enquanto que a atividade mitótica varia de ausente a baixa. O citoplasma é moderado e variavelmente granulado (PATNAIK et al., 1984; GROSS et al., 2005). Os mastocitomas de grau 3 são geralmente grandes, fracamente circunscritos e infiltram-se profundamente no tecido subcutâneo. A necrose e a ulceração são características secundárias comuns. As células tumorais são redondas, poligonais ou pleomórficas, organizadas em cordões sólidos e ninhos, enquanto as margens celulares são indistinguíveis. Os núcleos são grandes, redondos a ovais, e têm nucléolos proeminentes. A atividade mitótica é moderada a alta, existindo mitoses atípicas (PATNAIK et al., 1984; GROSS et al., 2005). Também está reconhecido um subgrupo de mastocitomas de grau 3 que mimetizam tumores linfóides e ocorrem nas junções mucocutâneas, lábio e nariz. Estes mastócitos são caracterizados por células pequenas, uniformes, com citoplasma mínimo, núcleo eucromático com nucléolos pequenos e grânulos citoplasmáticos indistinguíveis (GROSS et al., 2005).

Em 2011, Kiupel et al. avaliaram a consistência da classificação microscópica entre patologistas veterinários quanto ao significado prognóstico do sistema de classificação proposta por Patnaik. Nesse estudo, 95 mastocitomas (MCTs) cutâneos de 95 cães foram classificados em um estudo cego por 28 patologistas veterinários de 16 instituições. A concordância entre os patologistas veterinários foi de 75% para o diagnóstico de grau 3 MCTs e inferior a 64 % para o diagnóstico de grau 1 e 2 MCTs . Para melhorar a concordância entre

patologistas e proporcionar um melhor significado prognóstico, um sistema de classificação histológica 2-classes foi planejado. O diagnóstico de alto grau de MCTs é baseado na presença de qualquer um dos seguintes critérios: pelo menos 7 figuras mitóticas em 10 campos de alta celularidade (CAC); ao menos 3 células multinucleadas (3 ou mais núcleos) em 10 CAC, pelo menos três núcleos bizarros em 10 CAC; cariomegalia. Os campos com maior atividade mitótica ou com maior grau de anisocariose foram selecionados para avaliação dos diferentes parâmetros. De acordo com este novo sistema de classificação, os mastocitomas de alto grau foram significativamente associados com menor tempo de metástase ou desenvolvimento de um novo tumor e, com menor tempo de sobrevida. O tempo médio de sobrevida foi de menos de 4 meses para MCTs de alto grau, mas mais de 2 anos para MCTs de baixo grau.

A avaliação e a interpretação do aspirado de linfonodo também tem tido problemas em seu diagnóstico. Lavallo e Carneiro e Pereira (2003) afirmaram que a citologia do linfonodo regional é eficaz como método de pesquisa de metástase, havendo geralmente correspondência da citologia com a histopatologia, observando maior dificuldade nos tumores de grau 3. É necessário que todos os nódulos cutâneos existentes sejam avaliados citologicamente, uma vez que todos podem se tratar de mastocitoma (LONDON; SÉGUIN, 2003). Dobson e Scase (2007) não consideram fácil a interpretação do aspirado de linfonodo, porque normalmente o linfonodo contém mastócitos no seu interior, devendo-se diferenciar as células normais das neoplásicas. O guia da Organização Mundial da Saúde (OMS) admite que o linfonodo esteja positivo para metástase quando a contagem de mastócitos representa mais de 3% da população de celular no aspirado. Entretanto, mesmo com este critério, mais de 25% dos cães serão diagnosticados como mastocitoma metastático (DOBSON; SCASE, 2007).

Krick et al. (2009) realizaram um trabalho em que foi observada uma boa associação da citologia dos linfonodos com o prognóstico do mastocitoma. A avaliação dos linfonodos foi associada ao grau histopatológico e a sobrevida, sendo encontrada uma correlação positiva entre os animais que apresentavam linfonodos comprometidos e menor sobrevida, assim como geralmente apresentavam grau mais elevado do histopatológico. Para considerar o linfonodo positivo para metástase deveria ter mastócitos no infiltrado linfóide do linfonodo com presença de agregado de células, mastócitos pobremente diferenciados com pleomorfismo, anisocitose, anisocariose, e/ou diminuição ou granulação variável, e/ou mais de cinco agregados de mais de três mastócitos. Os linfonodos eram considerados possivelmente metastáticos e provavelmente metastáticos quando apresentavam duas ou três

incidências de agregados de duas ou três células e mais de três locais de agregados de mastócitos de duas ou três células, e/ou dois a cinco agregados de mais de três mastócitos, respectivamente. Estes autores também consideraram que a citologia dos linfonodos alterados contribui para o estadiamento clínico dos animais com mastocitoma. Foi encontrada uma especificidade de 96% e sensibilidade de 100% pelos critérios propostos.

3.2.4 Tratamento

A busca de um protocolo terapêutico mais adequado para o tratamento dos mastocitomas caninos tem sido um dos principais objetivos da oncologia veterinária (MERLO, 2000). Mastocitomas podem ser tratados com cirurgia, radioterapia, quimioterapia ou a combinação dos três (SCOTT et al., 1996). No momento, a cirurgia ainda é o tratamento mais indicado para os mastocitomas solitários, sem evidências de metastização. Historicamente, a excisão deveria ser ampla, com margens de 3 cm, bem como um plano tissular de profundidade (GOVIER, 2003). Se a excisão completa não for possível, a radioterapia está indicada como tratamento adjuvante em mastocitomas de grau 1 e de grau 2 incompletamente excisados, com taxas de sobrevivência de 90% aos 3 e 5 anos (MOORE, 2002). Independentemente da terapia usada, os cães com tumores de baixo grau ou de grau intermédio devem ser avaliados regularmente quanto à recidiva local, ou possível disseminação sistêmica (THAMM; VAIL, 2007).

Os agentes quimioterápicos, principalmente glicocorticóides, são usados para tratar mastocitomas sistêmicos ou quando não é possível realizar a ressecção dos mesmos (O'KEEFE, 1990; ROGERS, 1996). A quimioterapia com um único fármaco (ciclofosfamida ou doxorrubicina) ou com protocolos combinados (ciclofosfamida, doxorrubicina, hidroxiureia, vincristina e prednisolona) produz resultados pouco animadores, com taxas de sobrevida de 45% a 1 ano (GOVIER, 2003). A presença de sinais sistêmicos, como vômito e anorexia, resultantes da manipulação do tumor ou de doença metastizante, induz a necessidade de drogas bloqueadoras dos efeitos da histamina, como a cimetidina, ranitidina ou omeprazole (GOVIER, 2003).

3.2.5 Prognóstico

Além do exame físico, como palpação de linfonodos e investigação quanto à presença de esplenomegalia e hepatomegalia, é aconselhado a realização de exames complementares como aspirado dos linfonodos com o uso de agulha fina para avaliação citológica (LANGENBACH et al., 2001), radiografias e ultrassonografias com a finalidade de detectar a neoplasia sistêmica (O'KEEFE, 1990).

De todos os fatores prognósticos avaliados, o grau histológico é o mais importante. Em cães, existe uma correlação entre o grau histológico e o tempo de sobrevida do animal (PATNAIK et al., 1984; ROGERS, 1993). Os tumores mais anaplásicos têm um maior potencial metastático e maior tendência a se disseminar e produzir patologias sistêmicas que os tumores classificados como grau 1 e 2. Os animais com mastocitomas de grau 1 têm um tempo de sobrevida duas vezes maior que os que apresentarem o tumor de grau 2 e seis vezes maior que portadores do tumor de grau 3 (PATNAIK et al., 1984).

Outros fatores que influenciam o prognóstico são a raça, localização e duração dos neoplasmas (MACY, 1986; ROGERS, 1993). Cães da raça Boxer possuem uma tendência maior a desenvolver mastocitomas bem diferenciados. Em cães, os tumores localizados na região perineal, inguinal, escrotal e prepúcio tendem a um comportamento mais agressivo, condicionando o portador a um menor tempo de sobrevida. Quanto à duração dos neoplasmas, observa-se que massas pequenas crescem lentamente e permanecem localizadas durante longos períodos de tempo e apresentam melhor prognósticos que os tumores de crescimento rápido, com infiltração e com metástases (GERRITSEN et al., 1998).

3.2.6 Marcadores moleculares

Inúmeros autores descrevem o uso de marcadores moleculares para auxiliar no diagnóstico dos mastocitoma caninos (ABADIE et al., 1999; SCASE et al., 2006; WEBSTER et al., 2007).

3.2.6.1 Complexo de adesão caderina/cateninas

A capacidade de invasão das neoplasias para os tecidos adjacentes e disseminação para órgãos distantes, em parte, é atribuída à diminuição da expressão das moléculas de adesão, o que facilita o desprendimento das células e seu consequente deslocamento. Entretanto, outras funções têm sido imputadas a estas moléculas, incluindo regulação da proliferação, diferenciação e apoptose celular (BEAVON, 2000; WIJNHOFEN; DINJENS; PIGNATELLI, 2000; PEINADO; PORTILLO; CANO, 2004).

Nos últimos anos, algumas moléculas de adesão celular, bioquímica e geneticamente distintas, foram descritas, dentre as quais, destacam-se as integrinas, a superfamília das imunoglobulinas, as selectinas, as caderinas e o determinante celular CD44. Sugere-se que, possivelmente, todas as moléculas de adesão contribuem, em maior ou menor proporção, para o controle do comportamento das células neoplásicas ou com o direcionamento da resposta imune antitumoral (BEAVON, 2000; MOON et al., 2004; TAKAHASHI-YANAGA; SASAGURI, 2007).

O termo CD44 define um grupo de proteínas da superfície celular com diferentes pesos moleculares que variam de 85 a 160 kDa. A proteína de 90 kDa é a forma predominante nos leucócitos, enquanto as isoformas maiores (150 a 160 kDa) são encontradas em células epiteliais e mesenquimais atuando como um receptor para o ácido hialurônico na matriz extracelular (BANKFALVI et al., 1999).

As caderinas representam uma família de moléculas de adesão celular transmembranares, dependentes do cálcio, que se ligam através de ligações homofílicas. Elas são importantes não apenas no estabelecimento e manutenção das uniões intercelulares, mas também na determinação da especificidade adesiva das células. As caderinas são também essenciais no desenvolvimento da polaridade celular e no estabelecimento da morfologia tecidual. O cálcio é essencial para a função adesiva das caderinas e na proteção contra a digestão pelas proteases (WHEELLOCK; JOHNSON, 2003). As caderinas são divididas em subclasses de acordo com sua distribuição tecidual. Existe a caderina epitelial (E-caderina); molécula de adesão celular 120/80 (CAM 120/80) ou Arc-1 (em cães), a qual é encontrada em células epiteliais; a caderina neural (N-caderina); a caderina placentária (P-caderina), encontrada em placenta e no epitélio, embora possa ser expressa em outros tecidos durante o

desenvolvimento e, também a β -caderina que é encontrada no cérebro (WIJNHOFEN; DINJENS; PIGNATELLI, 2000).

A E-caderina do tipo I é uma proteína de uma única passagem transmembrana bem caracterizada que é expressa principalmente em células epiteliais, é codificada pelo gene que CDH1 localizado no cromossomo 5 em cães. Este gene codifica uma proteína de 120kDa que contém um domínio citoplasmático de 150aa e um domínio extracelular de 550aa com cinco repetições extra citoplasmáticas, cada uma com cerca de 110aa (PERTZ, 1999; CAVALLARO, 2004). E-caderina contribui para a geração e manutenção das junções aderentes (JA) via interação homofílica (E-caderina-E-caderina), na maioria das vezes adesão de células homotípica (interação de células epitelial-epitelial). Estas moléculas de adesão não estão aleatoriamente distribuídas sobre as superfícies celulares, mas apresentam uma tendência de localização nas junções especializadas denominadas junções aderentes, onde desempenham um papel fundamental no desenvolvimento destas estruturas (RAMBURAM; GOVENDER, 2002).

Alterações na expressão da E-caderina podem ocorrer tanto em processos fisiológicos como em patológicos. Dentre os fisiológicos, destacam-se a inibição das adesões entre as células epiteliais para regeneração e cicatrização das feridas. Assim que o defeito tenha se fechado, a adesão celular é restaurada permitindo que o epitélio retorne a sua resistência inicial (BEAVON, 2000). Como o complexo caderinas/cateninas é um requisito fundamental para a manutenção da adesão intercelular normal, alterações na expressão da E-caderina podem, consequentemente, ser um importante passo no desenvolvimento e progressão de um tumor maligno (WIJNHOFEN; DINJENS; PIGNATELLI, 2000; MENKE et al., 2001; BANKFALVI et al., 2002). No que se refere ao domínio extracelular da E-caderina, este, une-se através de ligações homofílicas dependentes de cálcio ao domínio extracelular de outra molécula de E-caderina de uma célula vizinha, assumindo uma conformação de um “zíper molecular” (BEAVON, 2000; WIJNHOFEN; DINJENS; PIGNATELLI, 2000). O domínio citoplasmático da E-caderina está ligado ao citoesqueleto de actina através de interações heterotípicas com as moléculas denominadas cateninas. Estas proteínas foram identificadas por Ozawa, Baribault e Kemler, em 1989, que sugeriram os termos α , β e γ catenina para designar as moléculas de 102, 88 e 80 kDa, respectivamente (Figura 1).

Figura 1 - Molécula de caderina clássica representando o domínio extracelular com os cinco domínios de E-caderina e o domínio citoplasmático com as cateninas

Fonte: Adaptado de Gumbiner (2005)

Legenda: No domínio citoplasmático da E-caderina se ligam cateninas p120-catenina e a β-catenina, α-catenina, α-actinina, vinculina, EPLIN e actina, estas moléculas são responsáveis pela modulação das adesões e sinalização celular

As caderinas clássicas Tipo I, que também incluem N-caderina, P-caderina, e VE-caderina, possuem um padrão de repetição terminal Histidina-Alanina-Valina (HAV) na posição 79 – 81 aa dentro do primeiro domínio extracelular (EC1), esta sequência é essencial para o reconhecimento de adesão celular (VAN ROY; BERX, 2008) (Figura 2).

A região intracelular da E-caderina contém duas regiões conservadas o domínio justamembranar (JMD), também conhecido como domínio membrana proximal/conservado (DMPC), que é um domínio de ligação da β-catenina. O domínio de ligação da β-catenina facilita a interação da E-caderina com a actina do citoesqueleto via o complexo de adesão citoplasmático, que consiste na β-catenina, α-catenina, e, possivelmente a proteína EPLIN (*Epithelial Protein Lost In Neoplasia*), (PEREZ-MORENO; FUCHS, 2006).

Na região JMD, onde se liga p120ctn, também se liga a presenilina 1, a qual pode inibir a ligação p120ctn e facilitar a clivagem do domínio citoplasmático da E-caderina (via γ-secretase), levando a desmontagem das junções aderentes. Na região onde a β-catenina interage com a E-caderina também se ligam várias outras proteínas, por exemplo, a fosfatidilinositol-fosfato quinase Iγ (PIPKIγ) em que o domínio de ligação encontra-se dentro do sítio de ligação β-catenina (LING et al., 2007). Vinculado PIPKIγ preferencialmente na E-caderina dimerizada e é responsável pela conversão de fosfato de fosfatidilinositol (PIP) a fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP2) (LING et al., 2007). Proteína Tirosina fosfatase μ

interage com o domínio C-terminal da E-caderina, parcialmente sobrepostos aos domínios de ligação da β -catenina, e acredita-se que esta sobreposição pode estar protegendo a E-caderina de ser fosforilada na tirosina (VAN ROY; BERX, 2008).

Figura 2 - Sítios de ligação às proteínas dentro da região intracelular da E-caderina

Fonte: Adaptado de Van Roy e Berx (2008)

Legenda: O domínio citoplasmático de E-caderina contém sítios de ligação para uma variedade de moléculas de sinalização, facilitando, assim, o seu papel na transdução de sinal. Abreviações: S: peptídeo sinal, PRO: propeptídeo, EC: domínio extracelular, TM: domínio transmembranar, N: N-terminal, C: extremidade C-terminal, β -cat: β -catenina, HAV: histidina-alanina-valina, BD: domínio de ligação, PS1: presenilina 1, PIPKI γ : tipo I γ fosfatidilinositol fosfato quinase, PTP μ : proteína tirosina fosfato μ , AA: amino ácido, CK: quinase caseína, PKD: proteína quinase D

3.2.6.2 β -catenina

A β -catenina é uma proteína situada no citoplasma que é codificada pelo gene CTNNB1, localizado no cromossomo 3p21 em humanos e no cromossomo 23 em cães. A proteína codificada por este gene tem 92 kDa. Ela é multifuncional, pois tem papel importante como proteína de adesão e como fator de transcrição nas vias de sinalização, principalmente as relacionadas com a via Wnt (*wingless-type MMTV integration site family*) (KRAUS et al., 1994; MACDONALD et al., 2009).

A via de sinalização Wnt é uma rede de proteínas que passa sinais de receptores na superfície da célula através do citoplasma e finalmente para o núcleo da célula aonde uma cascata de sinalização conduz à expressão de genes-alvo (WALLINGFORD; HABAS, 2005; HABAS, 2006).

A estrutura da β -catenina é muito similar àquela da proteína Armadillo, presente na via de sinalização *Wingless*/Wnt da mosca de fruta chamada *Drosophila*. É composta por uma região N-terminal, uma região central de repetição Armadillo e outra C-terminal (SCHWEIZER et al., 2003).

O tipo mais comum de adesão intercelular acontece através das junções aderentes, elas são importantes para manter a arquitetura tecidual e polaridade celular, limitando a movimentação e proliferação celular. A β -catenina fica numa posição intermediária ligada ao domínio citoplasmático da E-caderina numa extremidade e na outra se liga da α -catenina (ALBERTS et al., 2006).

Numa mesma célula, existem dois complexos distintos de ligação das E-caderina/catenina. Uma extremidade da β -catenina e da γ -catenina liga-se ao domínio citoplasmático da E-caderina, enquanto que a outra extremidade das β -cateninas ou das γ -cateninas se une as α -cateninas na rede de microfilamentos de actina do citoesqueleto. Em resumo, um complexo vai ser composto pela E-caderina, β -catenina e α -catenina e o outro representado pela E-caderina, γ -catenina e α -catenina (NOLLET, 1999; BEAVON, 2000; WIJNHOFEN; DINJENS; PIGNATELLI, 2000).

Na ausência de sinais mitóticos externos, a β -catenina é sequestrada em um complexo com a proteína APC (*adenomatous polyposis coli*), um dos principais elementos da maquinaria proteolítica celular, onde a β -catenina livre é fosforilada e degradada. Normalmente, a quantidade de β -catenina livre no citoplasma é pequena e a elevação no teor de β -catenina livre é o resultado da inativação do sistema APC ou ativação da via WNT-1 (WIJNHOFEN; DINJENS; PIGNATELLI, 2000). A maioria das mutações do gene APC resulta em uma proteína truncada que continua com a capacidade de formar complexos, mas não degrada a β -catenina, resultando no aumento da β -catenina livre no citoplasma e sua translocação para o núcleo, a qual se liga a fatores de transcrição TCF/LET que levam a ativação inapropriada da expressão gênica (Figura 2) (NOLLET, 1999; MOON et al., 2004; IWAI et al., 2005; GAO et al., 2005; SCULLY et al., 2005).

3.2.6.3 α -catenina

A α -catenina é uma proteína de 102 kDa composta por 906 aminoácidos. Nesta proteína existem três regiões de ligação de grande homologia com a proteína vinculina. (HERRENKNECHT et al., 1991; NAGAFUCHI et al., 1991). A proteína α -catenina é codificada pelo gene CTNNA1, localizado no cromossomo 5 em humanos e no cromossomo 11 em cães. Nos últimos anos foram descobertos inúmeros parceiros de α -catenina. A β -catenina é uma das proteínas que se liga próximo à região N-terminal da α -catenina (resíduos 57-146) (POKUTTA; WEIS, 2000), e F-actina, que se liga na região C-terminal (resíduos 697-903) da α -catenina (POKUTTA et al., 2002).

3.2.6.4 p120-catenina

A p120-catenina é uma proteína situada no citoplasma e é codificada pelo gene CTNND1, localizado no cromossomo 11 em humanos e no cromossomo 18 em cães. A proteína codificada por este gene tem 120 kDa. O domínio das caderinas/cateninas é altamente conservado para muitos outros membros da família das caderinas (STAPPERT; KEMLER, 1994). Os domínios das moléculas p120-catenina e δ -cateninas pertencentes a uma discreta subfamília das cateninas que interagem com o outro domínio citoplasmático das E-caderinas mais membrana proximal, também se apresentam conservados. (YAP; GUMBINER, 1998; LU et al., 1999).

A p120-catenina foi originalmente identificada como um substrato para o oncogene *Src* (proto-oncogene tirosina-proteína quinase), que é ativado após a estimulação dos receptores tirosina quinase e integrinas na membrana plasmática, e tem um papel indispensável em múltiplas vias homeostáticas fisiológicas (REYNOLDS et al., 1994; SHIBAMOTO et al., 1995). A p120-catenina controla o retorno e regula os níveis de caderinas na membrana das células (IRETON et al., 2002; DAVIS et al., 2003; XIAO et al., 2003). Este retorno das E-caderinas para a membrana celular ocorre por um complexo cinético com habilidade de mover as vesículas ao longo dos microtúbulos (CHEN et al., 2003; FRANZ; RIDICY, 2004; YANAGISAWA et al., 2004).

A p120 também exerce um papel fundamental na via de sinalização celular. Quando a p120-catenina migra para o núcleo ela se liga ao fator Kaiso que é um repressor da transcrição gênica. Ao fazer a repressão do fator Kaiso, deixa ativa a transcrição de inúmeros genes dentre eles esta a ciclina D1, matrilisina (MMP7), c-jun, c-fos, c-fra-1 (Figura 2) (NOLLET et al., 1999; GRAHAM et al., 2000; PARK et al., 2005). A p120-catenina pode influenciar as atividades de pequenas Rho GTPases, atuando como um interruptor molecular que controla o balanço entre a adesão e a migração celular (ANASTASIADIS et al., 2000).

3.2.6.5 Metaloproteinase matrix (MMP)

As metaloproteinases de matriz (MMP) são enzimas zinco dependentes e pertencem a uma família de 24 membros em humanos (FINGLETON, 2007). A estrutura e organização das MMPs estão ilustradas na figura 3. As MMPs são uma família de endopeptidases que atuam em uma variedade de proteínas extracelulares, como as quimiocinas, peptídeos antimicrobianos, componentes da matriz extracelular incluindo colágeno, gelatina, fibronectina, laminina e proteoglicanos, e numerosos efeitos reparadores em processos imunológicos e infecciosos (PARKS et al., 2004; PAGE-McCAW et al., 2007). Embora as MMPs sejam conhecidas como enzimas com a habilidade de degradar e clivar proteínas da matriz extracelular como colágeno e fibronectina, recentes literaturas sugerem que elas têm um papel dominante e atuam como moléculas alteradoras de sinais (LYNCH; MATRISIAN, 2002).

Para muitos substratos, a clivagem pelas metaloproteinases resulta em um processo de ganho de função, como os de ativação de um peptídeo antimicrobiano latente (WILSON et al., 1999; WILSON et al., 2009) e citocinas (PARKS et al., 2004) ou alteração da atividade biológica, assim como limitando a proteólise das quimiocinas (McQUIBBAN et al., 2000; VAN LINT et al., 2007) e a digestão de proteínas da superfície celular (CAUWE et al., 2007).

Neste contexto, o mecanismo de controle da ativação do zimogênio e o ganho de atividade proteinase para um substrato específico têm estado sob uma alta hierarquia de eventos que controlam muitas vias de resposta do hospedeiro. Como para todas as proteinases, a atividade das MMPs é regulada por quatro pontos: expressão gênica, compartimentalização (isto é acumulação perinuclear da enzima), proenzima (ou zimogênio)

ativação e inativação da enzima e controles futuros pela viabilidade do substrato, concentração e afinidade (RA et al., 2009). A transcrição desses genes é diferencialmente ativada por forbol ester, lipopolisacarídeos (LPS) ou estafilococos enterotóxico B. Tanto o cálcio como o zinco são necessários para a catálise das metaloproteínases (MACHEIN et al., 1997).

Figura 3 - Estrutura do domínio de MMPs

Fonte: Extraído de Visse e Nagase (2003)

Legenda: A organização de domínio de MMPs: S, peptídeo sinal; Pro, propeptido; Cat, catalítico domínio; Zn, sítio ativo zinco; Hpx, domínio hemopexina; Fn, domínio fibronectina, V, inserção vitronectina : I, domínio transmembrana tipo I; II, domínio transmembrana do tipo II; G, âncora GPI; Cp, domínio citoplasmático; Ca, região matriz de cisteína; e Ig, IgG-domínio like. Um local de clivagem da furina está descrita como uma faixa preta entre propeptido e domínio catalítico

3.2.6.5.1 Matrilisina (MMP-7)

A Matrilisina (MMP-7) é um zimogênio de 28 kDa, que em humanos está localizada na região 11q21-q22 e no cão esta localizada no cromossomo 5. A enzima MMP-7 quando na forma ativa tem 19 kDa, é expressa em células epiteliais da mucosa, secretada na região apical e, em alguns macrófagos, funciona como efetor chave nas funções de reparo e imunidade. As funções estabelecidas para a matrilisina incluem facilitar a re-epitelialização celular, (DUNSMORE et al., 1998; McGUIRE et al., 2003), clivagem do Faz ligante para promover a apoptose (POWELL et al., 1999; MITSIADES et al., 2001), liberação do sindecan-1 para o controle do influxo de neutrófilos (LI et al., 2002), e elastólise mediada pelos macrófagos (FILIPPOV et al., 2003).

A enzima MMP7 degrada colágeno tipo IV, elastina, fibronectina, entactina, tenascina, osteonectina, aggrecan, vitronectina, decorina, versican, α -1PI, osteopondina, E-caderina, plasminogênio, β -4 integrina, α -prodefensina, Faz ligante e pro-TNF- α . (KERKELÄ; SAARIALHO-KERE, 2003).

O mRNA da MMP-7 é produzido exclusivamente por células epiteliais em camundongos e sua expressão está restrita a órgãos específicos, sugerindo que além de degradação da matriz e remodelamento, a MMP-7 pode estar envolvida em diferentes funções nestes órgãos (WILSON et al., 1995).

A proteína matrilisina é uma metaloproteinase que digere a matriz extracelular e um dos seus alvos é a porção extracelular das E-caderinas. A clivagem da E-caderina pela MMP7 inicia-se como uma via alternativa para proliferação celular, ignorando a via p27, mas estes resultam em uma melhor atividade RhoA e aumentam os níveis de ciclina D1. Assim mudanças adicionais na capacidade migratória é um resultado predominante da clivagem da E-caderina pela MMP7 e a perda de inibição por contato. O aumento na proliferação indica que a clivagem da E-caderina pela MMP7 pode regular o potencial de crescimento de células não transformadas. É possível que uma expressão aberrante de MMP7 seja o resultado de um programa de iniciação celular que promove a proliferação epitelial e migração, e que o processamento da E-caderina pela MMP7 seja o programa molecular efetor. (LYNCH et al., 2010). O fator de transcrição kaiso se liga ao promotor do gene da matrilisina e inibe especificamente a sua transcrição. (SPRING et al., 2005).

3.2.6.6 PTEN

O gene PTEN (*phosphatase and tensin homologue*) foi identificado simultaneamente por dois grupos de pesquisa como um gene candidato a supressor tumoral. Esse gene está localizado na região 10q23 e codifica a proteína PTEN, com 403 aminoácidos (LI et al., 1997; STECK et al., 1997). A proteína PTEN age na regulação do ciclo celular e apoptose, além de aspectos relacionados à fisiologia da célula, incluindo adesão celular, migração e diferenciação celular (Di CRISTOFANO; PANDOLFI, 2000).

A estabilização dos complexos juncionais contendo E-caderina pelo signalosome MAGI-1b/PTEN estão ilustrados na figura 4. A proteína PTEN contém um domínio fosfatase tirosina proteína com características que se assemelham as fosfatases de especificidade dual, que são capazes de desfosforilar tanto os resíduos serina e treonina, quanto os resíduos de tirosina. É uma fosfatase, que atua sobre proteínas e lipídios. Apesar de o PTEN possuir a especificidade dual, seu principal substrato *in vivo* é o fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfato (PIP3) e a reação deste com a enzima PTEN gera fosfatidilinositol (4,5)-difosfato (PIP2) (MAEHAMA; DIXON, 1998; LEEVERS et al., 1999), que desempenha um papel importante na via da PI3K por catalisar a degradação de PIP3 gerado por PI3K. A manutenção de baixos níveis de PIP3 é um fator que desfavorece manifestações neoplásicas por inibir a via PIP3/AKT (WENG et al., 1999), que estimula o proto-oncogene AKT, promovendo a progressão incontrolada do ciclo celular, migração, inibição da apoptose e estímulo para metástase. Alterações nessas proteínas foram encontradas em diversos tecidos como cérebro (glia), mama, próstata, endométrio, pele e rim (CAPUANO, 2005).

Alterações somáticas ou geneticamente herdáveis desse gene tem sido altamente relacionada ao desenvolvimento de diversas alterações orgânicas como a síndrome de Cowden, PHTN (*PTEN hamartoma tumor syndromes*) e câncer de próstata, endométrio, melanoma, glioblastomas e astrocitomas. A doença de Cowden é uma síndrome autossômica de predisposição ao câncer, principalmente o mamário, tireoidiano e cutâneo (LIAW et al., 1997).

Figura 4 - Modelo para a estabilização dos complexos juncionais contendo E-caderina pelo sinalosome MAGI-1b/PTEN

Fonte: Adaptado de Kotelevets et al., (2005)

Legenda: PTEN é voltado para a membrana plasmática através de seu domínio C2; sua porção PDZ ancora e se liga às junções aderentes através da interação de MAGI-1b com a β-catenina. Src ativado recruta PI3K para a membrana plasmática, fosforilando sua subunidade reguladora p85 a qual interage com a β-catenina. Atividades antagônicas da proteína PTEN e PI3K permitem regulação de segundo mensageiro PIP3 e recrutamento de proteínas que contêm o domínio PH, tais como AKT e fatores de troca GTP (GEFs) pela subfamília Rho GTPases. A atividade AKT induzida por Src é o suficiente para migração celular. Desestabilização dos complexos juncionais por Src podem envolver outros caminhos, como a ativação de pequenas GTPases. A p120-catenina citoplasmática é um substrato eficiente para atividade da quinase Src, modulando para o estado ativado a família das pequenas Rho GTPases, estimulando a migração celular. MP= membrana plasmática

3.2.6.7 Comunicação Juncional

As junções aderentes são importantes não apenas no estabelecimento e manutenção das uniões intercelulares, mas também na determinação da especificidade adesiva das células, e também são responsáveis pela manutenção da comunicação intercelular através das junções comunicantes presentes nas membranas celulares chamadas de *gap junctions* (WHEELLOCK; JOHNSON, 2003). A comunicação via *gap junctions*, ou comunicação juncional, é realizada pelo alinhamento de conjuntos de canais protéicos transmembranares, chamados de placas juncionais, presentes entre células apostas. Cada placa juncional pode conter até milhares destes canais protéicos. Estes canais são formados pelo alinhamento de dois conjuntos de proteínas transmembranares chamadas conexinas (Cx), onde, cada grupo de seis compõe um

hemicanal, ou connexon. Os connexons, compostos por connexinas do mesmo tipo, formam canais homotípicos, enquanto que aqueles compostos por connexinas de tipos diferentes formarão canais heterotípicos com propriedades diferentes daquelas esperadas para canais homotípicos (Figuras 5 e 6), (WILLECKE et al., 2002; GOODENOUGH; PAUL, 2003). A variedade de canais aumenta quando dentro de cada connexon é encontramos diferentes tipos de connexinas (WILLECKE et al., 2002).

Canais intercelulares funcionais são formados quando células adjacentes expressam hemicanais complementares que, quando alinhados, permitem o intercâmbio bidirecional de íons e pequenas moléculas entre as células, determinando o acoplamento metabólico e elétrico. Inicialmente, pensava-se que somente moléculas de até um kilodalton (kDa) atravessariam os canais juncionais (LOEWENSTEIN, 1981; KUMAR; GILULA, 1996a) mas, atualmente, sabe-se que dependendo da conformação, é possível que moléculas entre um e meio e quatro kDas passem pelo poro juncional (NEIJSEN et al., 2005; VALIUNAS et al., 2005) (Figura 6).

Todas as moléculas de connexina têm quatro domínios que abrangem a membrana, dois domínios extracelulares e uma grande cauda citoplasmática C-terminal que tem um papel importante na propagação do canal. A propagação dos canais ou a abertura e o fechamento pode ser controlada pós-translacional por vários fatores de crescimento (LAMPE; LAU, 2004).

O agrupamento dos canais juncionais na membrana depende de contato intercelular e resulta na formação da placa juncional (normalmente composta de centenas de canais), região onde o espaço extracelular fica bastante reduzido embora às membranas não cheguem a se tocar (LAMPE et al., 1991; KISTLER et al., 1994). Cada connexon possui meia vida curta, de duas a cinco horas dependendo do tipo de connexina, sendo continuamente renovado na membrana, isolado ou agrupado nas placas juncionais (EVANS; MARTIN, 2002; THOMAS et al., 2005).

Figura 5 - Estrutura de canais de junções de comunicação intracelulares

Fonte: Adaptado de Mathias et al., (2010)

Legenda: Cada proteína forma uma unidade de conexina. Seis conexinas se combinam para formar um connexon. Vários membros da família das conexinas podem se combinar para formar canais intracelulares homomérico ou heteroméricos (junções de comunicação entre as células adjacentes). As junções de comunicação proporcionam um sistema micro circulação entre as células, permitindo a passagem de uma variedade de pequenos metabolitos celulares, íons, e segundos mensageiros

Figura 6 - Organização estrutural da Cx43 e a montagem de junções

Fonte: Adaptado de Goodenough; Paul, (2003)

Legenda: (A) Uma junção gap é um conjunto de seis moléculas de conexina, compreendendo um hemi canal chamado connexon que forma um canal funcional quando ele está ligado a um hemi canal presente na membrana de uma célula vizinha. Estes canais facilitam a difusão passiva de pequenas moléculas e peptídeos envolvidos numa série de processos como a maturação e diferenciação celular, a morte celular por apoptose e apresentação cruzada. (B) as moléculas de Conexina atravessam a membrana plasmática (mp) 4 vezes, e expõem duas voltas extracelulares para o espaço extracelular. Em ambos as alças extracelulares há três resíduos de cisteína conservados (pontos azuis), que são críticos para o encaixe de um hemicanal em outro hemicanal presente na membrana de uma célula adjacente. A grande cauda citoplasmática C-terminal abriga inúmeros sítios regulatórios para fosforilação (pontos amarelos) que controlam a propagação do canal

Estudos realizados para avaliar a comunicação celular através das *gap junctions* mostraram que os hemicanais isolados também podem funcionar como via de intercâmbio entre a célula e o meio extracelular (GOODENOUGH; PAUL, 2003; CONTRERAS et al., 2004). Atualmente, vinte tipos de conexinas já foram identificados em camundongos e vinte e um em humanos (SOHL; WILLECKE, 2003). Presentes em diversos tecidos, estas proteínas são nomeadas de acordo com o peso molecular deduzido de seu DNA complementar (cDNA) e pertencem a uma única família gênica, exibindo antigenicidades específicas, permitindo-nos acompanhar seu perfil de expressão e distribuição *in situ*. Apesar de o deslocamento celular ser aparentemente incompatível com o estabelecimento de contatos juncionais estáveis, estudos têm sugerido que os níveis de comunicação juncional afetam ou são afetados pela atividade migratória celular (HUANG et al., 1998).

Estudos utilizando células e tecidos neoplásicos têm sido particularmente úteis como modelos de migração celular. Inicialmente, estes estudos tinham em comum o estabelecimento de uma correlação negativa entre o grau de acoplamento juncional homocelular e a invasão/proliferação tumoral (ELIAS; FRIEND, 1976; NAVOLOTSKI et al., 1997; NAUS; BANI-YAGHOUB, 1998). Ao comparar o grau de severidade metastática entre diferentes linhagens tumorais humanas, Navolotski et al., em 1997, demonstraram que o desenvolvimento tumoral (migração e proliferação) estava relacionado à redução dos níveis de comunicação celular.

3.2.6.7.1 *Conexina 43*

Estudos recentes desvincularam as junções comunicantes da possível função de supressores tumorais (LIN et al., 2002; ZHANG et al., 2003; POLLMAN et al., 2005) e demonstraram que o acoplamento heterocelular via Conexina 43 (Cx43) entre células de tumor de mama e células endoteliais aumentam a mobilidade das primeiras e conseqüentemente a invasibilidade do tumor. Correlações positivas semelhantes foram extraídas de estudos realizados com tumores de próstata (POLLMAN et al., 2005). Em outros sistemas, tem-se evidenciado uma correlação negativa entre o acoplamento e a migração celular, como no desenvolvimento de resposta inflamatória (ZHLER et al., 2003).

As conexinas são expressas em vários tipos de células do sistema imunológico. Essas células normalmente têm funções diferentes e controlam as respostas imunológicas ou executam estas em uma série de maneiras diferentes (OVIEDO-ORTA et al., 2001). Mais notavelmente, as conexinas são expressas por quase todas as células do sistema imunológico e podem ser reguladas quando as células imunes são expostas a fatores inflamatórios. (EUGENIN et al., 2003).

A cauda C-terminal de Cx43 contém vários motivos que podem ser objeto de regulação de proteína-quinases (Figura 6B). A fosforilação da cauda de Cx43, e, assim, a propagação do canal, é realizada através de quinases que podem ser a jusante das vias de sinalização do receptor da proteína G acoplada. (NEIJSEN et al., 2007).

Em 2005, Mota demonstrou uma fraca marcação citoplasmática de Cx43 restrita a poucos grupos de células individuais em amostras de mastocitomas submetidas à imunofluorescência, independente do grau de diferenciação das células tumorais (grau 2 ou 3). Essa escassez de marcação foi confirmada com os resultados obtidos na reação de *immunoblot*, que predominantemente revelaram-se negativos, independente do grau histológico dos tumores (MOTA, 2005).

Giepmans et al., (2001) em seu estudo mostram que a Cx43 é fosforilada na região c-terminal no resíduo Tyr 265 pela proteína Src, resultando em uma interação estável entre estas proteínas levando a uma inibição da comunicação celular via *junções gap*.

3.2.6.7.2 *Conexina 32*

A Conexina 32 (Cx32) é uma proteína de comunicação celular. Essa proteína é codificada pelo gene GJB1, localizado no cromossomo Xq13.1 em humanos e cães e tem 32 kDa. A primeira conexina a ser clonada foi a Cx32 (KUMAR; GILULA, 1986b), e em seguida foi a Cx43 (BEYER et al., 1987). A proteína conexina 32 é expressa em vários tecidos, incluindo o fígado, baço, estômago, pulmão, pâncreas, rim e sistema nervoso (YAMASAKI; NAUS, 1996). Estudos realizados por Vliagoftis e colaboradores demonstraram a expressão de conexina 32 (Cx32) e conexina 43 (Cx43) em mastócitos murinos em cultura. Esse mesmo estudo revelou a presença de Cx43 na membrana citoplasmática dessas células, sugerindo que os mastócitos têm potencial de se comunicarem

com outras células e com o microambiente por meio de junções comunicantes (VLIAGOFTIS, 1999).

3.2.6.8 Proto-oncogene c-kit

O KIT foi descrito pela primeira vez pelo bioquímico alemão Axel Ullrich em 1987 como o homólogo celular do oncogene viral do sarcoma felino Hardy-Zuckerman 4-FeSV (BESMER et al., 1986; YARDEN et al., 1987). O gene KIT também designado CD117 ou Kit é o produto proteico do proto-oncogene *c-kit* (YARDEN et al., 1987). O gene do KIT está localizado no cromossomo 4 nos humanos (D'AURIO et al., 1988) e no cromossomo 13 em cães. Este gene codifica uma proteína tirosina quinase transmembranar pertencente a uma superfamília de genes das imunoglobulinas (BLECHMAN et al., 1993).

O c-kit pertence a uma família de receptores tirosina quinase (RTK) e a subfamília de receptores de tipo III cujos membros incluem: Os receptores alfa e beta do fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGFR alfa e beta), receptor do fator estimulador de colônias de tipo 1 (CSF1-R) e receptor FLT3. Todos os membros desta família de receptores tirosina-quinase contêm cinco domínios *immunoglobulin-like* (IL) no seu domínio extracelular para ligação do respectivo ligante (*Stem Cell Factor* - SCF). Possuem, ainda, um único domínio transmembranar e um domínio citoplasmático tirosina-quinase no qual se encontra inserida uma quinase de grandes proporções (QIU et al., 1988; CANÔNICO et al., 2001; GIBSON; COOPER, 2002) (Figura 7).

O receptor tirosina-quinase (RTK) c-kit é um regulador crítico de crescimento, diferenciação, migração e proliferação de células hematopoéticas, germinativas e sistemas melanocíticos (KITAMURA et al., 1995; LENNARTSSON et al., 2005; GRICHNIK, 2006).

A proteína c-kit que não se encontra ligada ao SCF existe predominantemente como um monômero enzimaticamente inativo ao nível da membrana citoplasmática da célula. O SCF existe, sobretudo, como um dímero bivalente, podendo ser expresso na superfície das células estromais ou libertado como uma molécula solúvel por clivagem proteásica. A ligação do SCF induz uma dimerização do c-kit e uma auto-fosforilação da tirosina no domínio intracelular do receptor (ZHANG et al., 2000). O c-kit é ativado pela ligação do ligante, conduzindo assim a uma variedade de eventos de sinalização que desempenham um papel

fundamental na hematopoiese (KITAMURA et al., 1995). Quando há uma ligação a este domínio do ligante induz-se a dimerização rápida e extensa das moléculas receptoras em um mecanismo que envolve a ligação do ligante dimérico monovalente, seguido por um aumento na afinidade de "receptores e estabilização gradual dos dímeros". Parece, assim, que c-Kit tem pelo menos duas funções: a ligação do ligante e a dimerização do receptor induzida pelo ligante, muito além da atividade de quinase. Ambas as funções são independentes dos domínios transmembranar e citoplasmático (MENDELSON et al., 2001).

Todos os membros desta família de receptores tirosina-quinase contêm cinco domínios *immunoglobulin-like* no seu domínio extracelular para a ligação do respectivo ligante e, possuem, ainda, um único domínio transmembranar além de um domínio citoplasmático tirosina-quinase no qual se encontra inserida uma quinase de grandes proporções (Figura 7), (MENDELSON et al., 2001). O SCF comporta-se como uma citocina homodimérica não covalente, sendo indispensável para a produção e função dos mastócitos e desempenhando, ainda, um papel importante no desenvolvimento dos melanócitos, das células germinativas e das células "pacemaker" intestinais (RYGAARD et al., 1993; NAKAGAWA et al., 2000; NISHIDA et al., 2002). No que se refere ao mecanismo de ação do dímero SCF-c-Kit, a dimerização do receptor tirosina-quinase (induzida pelo SCF) e consequente ativação do c-Kit é seguido pela internalização do c-kit e translocação deste para vesículas citoplasmáticas (JAHN et al., 2002). Este processo de formação de vesículas é estritamente dependente da atividade tirosina-quinase do c-Kit. Essas mesmas vesículas, entretanto, constituídas na periferia celular, dirigem-se para o centro através da chamada via endossômica num processo dependente do recrutamento de Src e sem necessidade de recrutamento da PI3-quinase. O tratamento das células com óxido fenilarsínico (bloqueador da internalização do receptor) impede a translocação do c-kit para as referidas vesículas citoplasmáticas. Já o tratamento das células com inibidores proteossômicos conduziria, pelo contrário, à acumulação do c-kit nas vesículas. O c-kit o internalizado sofre uma autofosforilação intermolecular no domínio intracitoplasmático tirosina-quinase, no qual se encontra localizada uma enzima quinásica. (SILVA, 2003). Em todo este processo, a tirosina-quinase nunca é "criada" nem destruída, mas sim constantemente reciclada (TANIGUCHI et al., 1999; ISOZAKI et al., 2000; PALUMBO et al., 2002; SHIBANUMA et al., 2002).

A regulação negativa dos receptores tirosina-quinase ativados (c-Kit, EGF ou PDGF) pode ser promovida pela família Cbl de ligases da ubiquitina (família que contém 3 membros: Cbl; Cbl-b e Cbl-3, através da ubiquitinação e degradação dos referidos receptores) (TIAN

et al., 1999; MIETTINEN et al., 2000; LUX et al., 2000; ANZAI et al., 2002; HEINRICH et al., 2002; SZYMKIEWICZ et al., 2002). Além da família Cbl, outros membros da superfamília transmembranar 4 (TM4SF) também modulam negativamente a função do c-Kit e, como tal, regulam a sensibilidade do c-Kit ao SCF em células progenitoras hematopoiéticas (MAUDUIT et al., 1999). Os efeitos do TM4SF sobre o c-Kit é: menor internalização, menor degradação, menor fosforilação da tirosina-quinase como também uma redução da atividade quinásica em resposta ao SCF (STROHMEYER et al., 1991; LEROY et al., 1999; DRIANCOURT et al., 2000). Além destes repressores, existe uma tirosina-fosfatase a SHP-1, que também regula negativamente a sinalização do c-Kit, no caso de degradação da SHP-1, pode ocorrer uma ativação do c-Kit mesmo na ausência do fator de crescimento. (SMITH et al., 2001; BROUDY et al., 1999). A ligação c-Kit-SCF permite a criação neste receptor de locais de ligação ("ancoragem") para inúmeras proteínas de transdução de sinal, contendo todas elas domínios SH2 (Figura 8). Estas incluem a fosfatidilinositol 3'-quinase (PI3K) e a fosfolipase C (PLC) gama-1, a Stat1, a família de quinases Src (Src, Lyn e Fyn) e, por último, a GAP (proteína ativadora da GTPase) (YEE et al., 1994; SERVE et al., 1995). A ligação do SCF ao c-Kit ativa de forma igual à proteína quinase C, Rac1, JNK e o Raf-1 promovem, ainda, a fosforilação da tirosina do JAK2 e, finalmente, a associação da proteína adaptadora CRKL e da p120. Sempre que a anteriormente referida SHP-1 (uma tirosina-fosfatase que contém, igualmente, um domínio SH2) se conjuga com uma tirosina da região justamembranar do c-Kit, inframesmodula a transdução de sinal deste último (TAYLOR; METCALFE, 2000).

Figura 7 - Diferentes formas dos receptores de membrana tirosina quinase

Fonte: Adaptado de MENDELSON et al., (2001)

Figura 8 - Locais de ligação e autofosforilação no receptor tirosina quinase do tipo III

Fonte: Adaptado de MENDELSON et al., (2001)

Legenda: moléculas de transdução de sinal (os locais tirosínicos de ligação sofrem autofosforilação quando ocorre a ligação de moléculas de transdução de sinal que contenham domínios SH2) (P) - local de fosforilação

A regulação transcricional da expressão do c-Kit tem sido descrita em diversos estudos (GOKKEL et al., 1992; VANDENBARK et al., 1992; ANDRE et al., 1997). O proto-oncogene c-Kit compreende 21 éxons (com uma extensão genômica de 80 Kb de DNA) ao nível do cromossomo 4ql2 (ANDRE et al., 1992; GIEBEL et al., 1992)

A maioria destes éxons possui entre 100 e 200 pares de bases. A extremidade 3' da região codificante deste gene (correspondendo ao éxon 1) possui 2300 pares de bases (2,3 Kb) e é flanqueada por sinais de poli-adenilação. O protooncogene c-Kit codifica a síntese da proteína monomérica, a qual possui três domínios (Figura 7) (ASHMAN 1999): O domínio extracelular (éxons 1-9), constituído por cinco domínios *immunoglobulin-like*, local de ligação do SCF; o domínio transmembranar (éxon 10); o domínio intracelular (éxons 11-21), constituído por: uma hélice inibidora justamembranar (hélice anfipática de tipo alfa codificada pelo éxon 11), que, ao suprimir a fosforilação e atividade quinásica no KIT não ligado ao SCF, inibe a atividade do KIT; uma quinase intracelular (codificada pelo éxon 17) constituída pelas duas subunidades que compõem a quinase do KIT e pelo *pocket* enzimático (que funciona como uma área de ativação) em localização intermédia (ASHMAN 1999).

Já Foram identificadas sete isoformas do gene c-Kit (REITH, et al., 1991; CROSIER et al., 1993; WYPYCH et al., 1995). Sendo que, quatro delas resultam de *splicing* alternativo do RNAm e caracterizam-se pela presença ou ausência de uma sequência tetrapeptídica - GNNK - na região justamembranar do domínio extracelular e, ainda, pela presença ou ausência de um resíduo de serina na região interquinásica do domínio citoplasmático (FLANAGAN et al., 1991; HAYASHI et al., 1991; ZHU et al., 1994).

A proteína KIT que não se encontra ligada ao SCF existe predominantemente como um monômero enzimaticamente inativo ao nível da membrana citoplasmática da célula. O SCF existe, sobretudo, como um dímero bivalente, podendo ser expresso na superfície das células estromais ou libertado como uma molécula solúvel por clivagem proteásica. A ligação do SCF induz uma dimerização do c-Kit e uma auto-fosforilação da tirosina no domínio intracelular do receptor (ZHANG et al., 2000).

Esta auto-fosforilação de resíduos específicos de tirosina cria locais de ancoragem para moléculas de transdução de sinal e induz ligação do substrato e fosforilação. Em algumas vias de transdução de sinal, como a via PI3K/AKT e a via JNK foram implicadas na mediação da mitogênese induzida pelo c-kit (ROSEN et al., 2001).

Mutações que provoquem fosforilação independente do ligante provocam a ativação constitutiva do c-kit e transformam *in vitro*, linhagens celulares dependentes de fatores de

crescimento em linhagens celulares que não se encontram estritamente dependentes de fatores de crescimento e, além disso, convertem *in vivo* tumores indolentes em tumores agressivos. (LONGLEY et al., 2001). Mutações somáticas que causaram a ativação constitutivas do c-kit, foram associadas a certas neoplasias como a mastocitose adulta ou pediátrica atípica e a maioria dos GIST (ALLANDER et al., 1999; HIROTA et al., 2000). Estas mutações ativadoras do c-kit estão divididas em dois tipos: Mutações de tipo *pocket* enzimático, que alteram a sequência de aminoácidos que constituem diretamente no local enzimático ou mutações do tipo regulador, que afetam a regulação da molécula de quinase. O primeiro tipo de mutações tem como exemplo a substituição D816V, característica da mastocitose adulta, que afeta a via de ativação à entrada do *pocket* enzimático localizado no domínio quinásico do c-kit. As mutações do tipo regulador, pelo contrário, não afetam a sequência de aminoácidos do local enzimático, mas sim a hélice inibitória justamembranar (cuja função é a inibição da molécula de quinase) (MOSKSLUK et al., 1999; HIROTA et al., 2001; MOREY et al., 2002). Desta forma, inibindo esse papel inibidor de quinase promovido pela referida hélice, obtém-se uma ativação constitutiva do c-kit.

3.2.6.9 Triptase

A triptase é uma serina protease neutra tetramérica com um peso molecular de 134 kDa. Os genes que codificam triptase nos mastócitos estão localizados no braço curto do cromossomo 16 (SCHWARTZ, 2001). As primeiras investigações sobre o papel da triptase foi focado em sua capacidade de clivar certos substratos extracelulares, tais como peptídeo intestinal vasoativo (TAM; CAUGHEY, 1990), calcitonina relacionada gene peptídeo (WALLS et al., 1992a), fibronectina (LOHI et al., 1992) e cininogênios (WALLS et al., 1992b). A triptase é um fator de crescimento potente para células epiteliais, células musculares lisas das vias aéreas e fibroblastos (CAIRNS et al., 1997; BROWN et al., 1995; RUOSS et al., 1991; CAIRNS et al., 1997; GRUBER et al., 1997). Durante a inflamação, a triptase pode estimular a liberação de IL-8 e quimioatraentes pelos granulócitos, e superregular a expressão de ICAM-1 em células epiteliais (CAIRNS et al., 1997). A enzima é constituída por quatro subunidades não-covalentemente ligada, e cada subunidade tem um sítio da enzima ativa. Existem dois tipos principais de triptase nos mastócitos, uma α -triptase

e uma β -triptase. Há cerca 90% de identidade de sequência entre os dois tipos. β -triptases são classificadas em β I-, β II e β III-triptases, e os α -triptases em α I- e α II-triptases (SCHWART 2001; SOTO et al., 2002; PENG et al., 2003). Na β II-triptase é armazenada nos grânulos secretores dos mastócitos (REN et al., 1998). Em contraste, uma pro-tryptase é segregada constitutivamente a partir de mastócitos como uma pró-enzima inativa e é a maior forma de triptase encontrada no sangue de indivíduos normais. O pH ótimo para a β -triptase para processar β -pro-triptase a β -pro'triptase é em torno de 5,5-6,5 (SAKAI et al., 1996). Esta gama de pH indica que os resíduos de histidina desempenhar um papel crucial neste processo de ativação (REN et al., 1998). A β -triptase é lançada em tecidos ácidos, como áreas de má vascularização e ou inflamação.

3.2.6.10 Vimentina

A Vimentina é uma proteína de 52-58 kDa, da família dos filamentos intermediários. Os filamentos intermediários são uma característica estrutural importante de células eucarióticas. Eles compõem o citoesqueleto, juntamente com microtúbulos e microfilamentos de actina. Embora a maioria dos filamentos intermediários sejam estruturas estáveis, nos fibroblastos, a vimentina existe como uma estrutura dinâmica. Esse filamento é usado como marcador para tecidos derivados do mesoderma e, como tal, pode ser usado como um marcador imuno-histoquímico para sarcomas ou outras células de origem mesenquimal. (MACHADO; FIGUEIREDO, 1996). O alto grau de insolubilidade da vimentina sugere a sua função estrutural no citoplasma, como forma de suporte e ancoragem da posição das organelas no citosol. A vimentina está ligada ao núcleo celular, retículo endoplasmático e mitocôndria, lateralmente ou terminalmente (KATSUMOTO et al., 1990). Algumas evidências bioquímicas e morfológicas indicam que os filamentos de vimentina estão associados à membrana nuclear e plasmática, mantendo a posição do núcleo e do fuso mitótico, durante a vida da célula. Durante a mitose, a vimentina sofre fosforilação do seu domínio amino terminal e se dispersa em agregados, contendo formas filamentosas (CHOU et al., 1989).

3.2.7 Cultura celular primária de mastocitomas caninos

Há uma variedade de linhagens de mastocitoma murino descrito em literatura e uma das mais utilizadas para experimentação é a linhagem P-815, estabelecida por Dunn e Potter (1957). Tais células foram originadas de mastocitoma cutâneo de camundongo DBAf/2 induzido pelo carcinógeno químico metilcolantreno (BARSUMIAN et al., 1985). Existem linhagens estabelecidas de células de mastocitomas caninos, mas não estão comercialmente disponíveis. De Vinney e Gold (1990) estabeleceram com sucesso duas linhagens de células de mastocitoma canino cutâneo em cultura permanente *in vitro* (C1 e C2), e Ishiguro et al. (2001) estabeleceram uma nova linhagem a partir de uma mastocitoma de mucosa oral. Essas linhagens ficam em cultura contínua por mais de 1 ano e serve como fonte permanente de estudos. Os mastócitos obtidos de um mastocitoma canino podem ser mantidos em cultura celular por um período de até 11 semanas com viabilidade maior de 90% (LAZARUS et al., 1986). Inúmeros estudos com várias linhagens de células neoplásicas de humanos ou de roedores, tais como mastócitos HMC-1, P-815 e RBL-2H3 têm fornecido muitas informações sobre a biologia dos mastócitos (TSUJIMURA et al., 1994).

3.2.8 Microscopia Eletrônica de Transmissão

Os estudos moleculares só foram possíveis após a década de 70. Até então, os estudos morfológicos foram determinantes para compreender uma das principais estruturas dos mastócitos, seus grânulos (OLIVER et al., 1947; PADAWER, 1970; DVORAK et al., 1995a,b; DVORAK et al., 2003).

Quanto à morfologia ultraestrutural, verifica-se que mastócitos imaturos circulam no sangue como precursores agranulares e desenvolvem grânulos depois que migram para os tecidos conjuntivos. Essas células possuem núcleo grande com cromatina dispersa, nucléolo grande e numerosos ribossomos arranjados em rosetas livres no citoplasma ou ligados ao retículo endoplasmático.

Observa-se a presença de grânulos imaturos, os quais apresentam densidade centralmente condensada. Mastócitos maduros contêm grânulos secretores ligados à

membrana, possuem núcleo único, com cromatina parcialmente condensada, porém com nucléolo pouco evidente, pequenos complexos de Golgi e dobras na membrana celular. Apresentam grande número de grânulos secretores, além de pequenos ribossomos, muitos dos quais não estão ligados ao retículo endoplasmático (DVORAK, 1985). Os grânulos característicos dos mastócitos humanos contêm estruturas lamelares ou membranosas que estão dispostas em rolos cilíndricos semelhantes a papiros e formações membranosas laminadas frequentemente vistas em uma matriz eletro densa. Em raras ocasiões, os grânulos contêm material particulado (GHADIALLY, 1984).

Estudo realizado por Garcia et al. (1998), comparou pela análise da ultra estrutural dos mastócitos normais e de uma linhagem estabelecida de mastócitos tumorais caninos, (BR - mutação pontual ativadora no domínio da JM c-Kit (L575P), onde tanto mastocitos normais quanto os tumorais foram submetidos a diversos estímulos para degranulação (IgE anti-canine, antígeno S1 de *Ascaris suum*, Concanavalina A, Substância P, calcio ionóforo A23187, composto 48/80 ou TPA (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate) e observaram no exame ao microscópio eletrônico, diferenças significativas entre mastócitos de pele canina normal e as células da linhagem BR (Figura 9).

O grupo de Kawarai et al. (2010) realizaram estudos comparativos da morfologia de mastócitos normais de pele canina com mastócitos caninos provenientes da medula óssea estimulada. E observaram que os mastócitos provenientes da medula óssea podem ser uma fonte útil para estudos de mastócitos caninos maduros, pois se assemelham muito com os mastócitos normais provenientes da pele canina (Figura 10).

Figura 9 - Microscopia eletrônica de transmissão. Mastócito de pele canina estimulados e não estimulados

Fonte: Adaptado de Garcia et al. (1998)

Legenda: **A**– Mastócito não estimulado de pele canina. Numerosos grânulos ovais ou redondos podem ser vistos no citoplasma. Os grânulos são cheios com um material altamente electro denso, homogêneo, com pouco ou nenhum halo lucente. Barra 1,5 μ m. **B** – Mastócito de pele canina estimulado. Um núcleo irregular e um nucléolo muito proeminente são presente. A membrana plasmática tem numerosas dobras e alguns canais de degranulação são vistos no citoplasma. Não são vistos grânulos citoplasmáticos. Barra 2,0 μ m. **C** – Mastócito linhagem BR não estimulado. Poucos grânulos moderadamente, elétron densos com um visível halo lucente estão presentes no citoplasma. Barra 2,5 μ m. **D** – Mastócito linhagem BR estimulado. Muitos canais de degranulação podem ser vistos no citoplasma. Nenhum grânulo visível no citoplasma. Barra 1,5 μ m

Figura 10 - Microscopia eletrônica de transmissão de mastócitos caninos de pele (MCP) e mastócitos caninos medula óssea (MCMO)

Fonte: Kawai et al. (2010)

Legenda: Mastócitos caninos de pele (MCP) e de medula óssea (MCMO), 6 semanas após o início da cultura. (a) MCP canino, (b) grânulos de eletro denso homogêneo em MCP, (c) MCMO canino, (d) de grânulos discretos de deslocamento numa MCMO canino. Barras = 2 μ m (a, c), a 200 nm (b, d)

3.2.9 Ploidia de DNA e ciclo celular por citometria de fluxo

A presença de anomalias cromossomais nos mastocitomas está descrita, juntamente com presença de células hipoplóides e hiperplóides dentro do mesmo tumor (STONE et al., 1991). Ayl et al. (1992) realizaram um estudo de ploidia de ácido desoxirribonucleico (DNA) em mastocitomas e verificaram que aproximadamente 70% dos tumores eram diplóides, não havendo correlação entre a ploidia do DNA e o grau histológico. Da mesma forma, não se encontraram diferenças nos tempos de sobrevivência total entre os tumores diplóides e aneuplóides. Foram encontradas diferenças de ploidia entre casos com estágio 1 da doença e estágios mais avançados, parecendo haver uma tendência para maior mortalidade no primeiro ano dos animais com tumores aneuplóides. A ploidia do DNA não parece, no entanto, ser um forte fator de prognóstico nos mastocitomas (AYL et al., 1992).

A ploidia de DNA é um conceito que descreve o conteúdo de DNA no interior da célula. A utilização do corante fluorescente e intercalante de DNA, o iodeto de propídeo, permitem marcar o DNA de uma forma estequiométrica, ou seja, a quantidade de DNA é diretamente proporcional à quantidade do corante que é medida pela fluorescência emitida em um equipamento de citometria de fluxo. Esta relação pode ser demonstrada graficamente por meio de um histograma onde a partir de sua análise é possível identificar presença de aneuploidias, bem como, avaliar a frequência de células nas diferentes fases do ciclo celular, em especial a determinação de células em fase S como um indicador de proliferação celular (RABINOVITCH, 1994). Para o cálculo da ploidia de DNA, utilizamos a fórmula abaixo:

$$\frac{\text{Média da fluorescência do canal do pico G1 células tumorais}}{\text{Média da fluorescência do canal do pico G1 células controle}} = \text{Índice de Proliferação}$$

3.2.10 Proliferação celular pelo CFSE

Um meio eficaz e popular para monitorar divisão de linfócitos é realizado pelo corante fluorescente *Carboxifluoresceína succinimidyl éster* (CFSE) (LYONS et al., 1994; QUAH et al., 2007; PARISH et al., 2009; QUAH et al., 2010). CFSE é um corante fluorescente de

longa duração a base de carboxifluoresceína que se liga covalentemente a moléculas intracelulares. Assim, quando uma célula marcada com CFSE se divide, seus progenitores (células filhas) são dotados de metade do número de moléculas marcadas com carboxifluoresceína, assim, cada divisão celular pode ser avaliada medindo a diminuição da fluorescência celular correspondente por citometria de fluxo. A capacidade de CFSE para rotular as populações celulares com uma alta intensidade fluorescente de variância excepcionalmente baixo, juntamente com a sua baixa toxicidade celular, o torna um corante ideal para medir a divisão celular. Uma vez que é um corante baseado em fluoresceína, também o torna compatível com uma ampla variedade de fluorocromos e aplicável a citometria de fluxo multicor. Estas células marcadas podem ser usadas tanto para análises *in vitro* e como *in vivo*. Vários eventos moleculares que ocorrem durante a marcação das células com diacetato carboxifluoresceína succinimidyl éster (CFDA, SE) estão representados na figura 11.

Figura 11 - A representação dos vários eventos moleculares que ocorrem durante a marcação das células com diacetato carboxifluoresceína succinimidyl éster (CFDA, SE)

Fonte: Adaptado de Parish et al. (1999)

Material e Métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 SELEÇÃO DOS ANIMAIS

Este projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, sob o número de protocolo 1792/ 2009.

Foram selecionados aleatoriamente 18 cães acometidos pelo mastocitoma cutâneo caninos atendidos no Serviço de Cirurgia de Pequenos Animais – HOVET - FMVZ/USP, no período de março de 2010 a abril de 2013, dos quais foram coletados fragmentos tumorais para o estabelecimento do cultivo celular. Os diagnósticos dos mastocitomas foram estabelecidos através da citologia aspirativa por agulha fina na consulta dos animais. Neste estudo não houve preferência racial, de idade ou gênero. Os critérios de inclusão foram:

- ✓ Cães com diagnóstico de mastocitoma cutâneo canino através do exame histopatológico e sem tratamento quimioterápico prévio;
- ✓ Cães com histórico clínico passíveis de acompanhamento.
- ✓ Excisão cirúrgica como única forma de tratamento, não tendo sido usada terapia adjuvante.

4.2 COLETA DE AMOSTRAS DOS MASTOCITOMAS PARA O CULTIVO CELULAR

Os cães acometidos por mastocitomas cutâneos foram submetidos à excisão cirúrgica, e uma fração do tumor foi coletada e imersa em uma solução de álcool 70%, seguida por uma lavagem em PBS contendo antibiótico/antimicótico (penicilina, estreptomicina e anfotericina-B), e posteriormente acondicionadas em meio de cultivo com antibiótico/antimicótico até o processamento para cultura celular. A outra porção do tumor foi identificada e imersa em uma solução de formaldeído a 10% e encaminhada para o Serviço de Patologia Animal do Hospital Veterinário (FMVZ-USP) para classificação histológica.

4.3 SELEÇÃO DAS AMOSTRAS DO ACERVO PARA O ESTUDO

Realizamos neste mesmo período um estudo retrospectivo, onde 18 casos de mastocitoma cutâneo canino (MCT) já em blocos de parafina foram classificados aleatoriamente do acervo do Serviço de Patologia Animal do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, estes foram selecionados em mais de 280 casos diagnosticados entre os anos de 2004 a 2010. Para estes casos de mastocitomas foram realizadas consultas aos prontuários dos animais. Este estudo retrospectivo foi realizado para se estabelecer o padrão e a intensidade das imunomarcações das proteínas em estudo nas amostras de mastocitomas caninos parafinadas.

4.4 HISTÓRICO CLÍNICO

O histórico completo de cada cão, seja das 18 amostras do estudo retrospectivo ou dos 18 casos novos de mastocitomas, foi analisado incluindo: idade, gênero, peso, raça, número de formações e sua localização, margens do tumor, metástase, tempo de sobrevivência e a ocorrência de morte. Estas informações foram obtidas por contato com o clínico ou com o proprietário ou no prontuário médico.

4.5 PROCESSAMENTO E CLASSIFICAÇÃO DOS TUMORES

As amostras de mastocitomas foram processadas no Laboratório de Histologia do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. Do material parafinado foram obtidos 2 cortes de 5 µm de espessura de cada amostra, desparafinizados em xilol, reidratados em uma bateria de etanol e lavados em água destilada. A diferenciação histológica foi realizada através da utilizando da coloração Hematoxilina - Eosina e confirmada com a coloração de Azul de Toluidina. Os mastocitomas foram classificados segundo critérios descritos por Patnaik (1984) e Kiupel

(2011). Todos os tumores foram avaliados histopatologicamente por três patologistas, de forma independente e sem conhecimento de informações clínicas dos cães.

4.6 ANÁLISE IMUNOISTOQUÍMICA

As amostras tumorais para as reações de imunoistoquímica foram fixadas em formol 10% e emblocados em parafina. Secções de 5 µm do tecido tumoral foram montadas em lâminas pré-tratadas com silane (3-Aminopropyltriethoxysilane, Sigma®), passaram por desparafinização e hidratação, em xilol e graduações decrescentes de etanol. Na sequência foi utilizada a recuperação antigênica pelo calor em banho-maria em uma solução tampão citrato (pH 6,0), por 12 minutos em microondas. Após o resfriamento das lâminas, estas foram lavadas com solução tamponada com fosfatos (PBS) 0,01 M e pH 7,4, por 5 minutos com três repetições.

O bloqueio da atividade da peroxidase endógena por sua vez, foi realizado utilizando incubação em peróxido de hidrogênio a 3% em metanol, por 30 minutos. Para redução de sinais inespecíficos na reação as lâminas foram incubadas durante 30 minutos a 37 °C em uma solução de PBS contendo 5% de leite desnatado. Em seguida, os cortes foram lavados e incubados com os anticorpos primários de acordo com as determinações específicas de cada anticorpo (Quadro 1), em câmara úmida por 18 horas a 4 °C. Para a amplificação do complexo antígeno anticorpo utilizou-se kit baseado na técnica da avidina-biotina-peroxidase (*kit LSAB+System-HRP* - Dako, Carpinteria, CA, USA). Inicialmente foi feita a incubação por 30 minutos em temperatura ambiente com o anticorpo secundário biotilado contra imunoglobulina G de camundongo, coelho e cabra. Seguido de nova lavagem e nova incubação com a solução de estreptavidina-peroxidase por mais 30 minutos. O complexo antígeno anticorpo foi revelado empregando-se o cromógeno à base de diaminobenzidina (DAB) (*liquid DAB substrate-chromogen system – Dakocytomation*), controlando o tempo de exposição de acordo com o anticorpo utilizado.

A contra-coloração foi feita com hematoxilina de Harris, após as reações, as lâminas foram lavadas, desidratadas em bateria de etanol (70%, 80%, 95% e absoluto) e montadas em *Entellan* (SEM, Hatfield, PA, EUA). Como controle negativo, os anticorpos primários foram substituídos por tampão PBS. A pele canina foi usada como controle positivo para as reações

com os anticorpos das proteínas do complexo de adesão E-caderina/cateninas, PTEN, e MMP-7. Um mastocitoma bem diferenciado foi usado como controle positivo para o c-kit.

Em cada corte histológico foi avaliada a especificidade e intensidade da marcação positiva nas células dos mastocitomas, a intensidade foi avaliada com base no contraste de cores com outras estruturas do tecido. As secções foram observadas e fotografadas (ampliação 400x) em 10 campos aleatórios de alta celularidade.

Quadro 1 - Lista dos anticorpos primários utilizados na reação imunoistoquímica, imunocitoquímica e imunofluorescência

Anticorpo primário	Espécie	Clone	Origem	Isotipo	Diluição
E-caderina	Monoclonal	HECD-1	Invitrogen	IgG1	1:100
E-caderina	Monoclonal	NCH38	DAKO	IgG1-kappa	1:100
α -catenina	Monoclonal	α -cat-7A4	Invitrogen	IgG1-kappa	1:250
β -catenina	Monoclonal	CAT-5H10	Invitrogen	IgG1-kappa	1:250
p120-catenina	Monoclonal	6H11	Invitrogen	IgG1-kappa	1:250
PTEN	Policlonal	PN37	Invitrogen	IgG	1:100
Triptase	Monoclonal	AA1	DAKO	IgG1-kappa	1:50
<i>c-kit</i>	Policlonal	-	DAKO	IgG	1:100
<i>Cx43</i>	Policlonal	-	Invitrogen	IgG	1:100
<i>Cx32</i>	Policlonal	-	Invitrogen	IgG	1:100
<i>MMP7</i>	Policlonal	-	Abcam	IgG	1: 200
Vimentina	Policlonal	V9	DAKO	IgG	1:200
AC. Secundário FITC-488	Monoclonal	-	Vector		1:100
AC. Secundário FAM-568	Policlonal	-	Vector		1:100

4.6.1 Avaliação da expressão da E-caderina

As avaliações da expressão da E-caderina por imunoistoquímica foi realizada através da determinação da porcentagem de células com marcação citoplasmática positiva e negativa

em um mínimo de 1200 células. Quando analisamos as imunomarcações para o anticorpo anti-E-caderina clone HECD-1 (Invitrogen), foi realizada a contagem simultânea da porcentagem de núcleos com marcação positiva e negativa em um mínimo de 1200 células. Já para o anticorpo anti-E-caderina clone NCH-38 (Dako) avaliamos somente as marcações citoplasmáticas, pois com este anticorpo não observamos marcação nuclear da E-caderina. Foram realizadas contagens manuais com auxílio de software Image ProPlus 4.5[®] em 10 ou mais campos randomizados, em objetiva de 40x.

4.6.2 Avaliação da expressão das cateninas

As avaliações da expressão da β -catenina, α -catenina, p120-catenina, por imunoistoquímica foi realizada através da determinação da porcentagem de células com marcação citoplasmática positiva e negativa em um mínimo de 1000 células. Foi realizada a contagem simultânea da porcentagem de marcação nuclear positiva e negativa nas mesmas células. Foram realizadas contagens manuais com auxílio de software Image ProPlus 4.5[®] em 10 ou mais campos randomizados, em objetiva de 40x.

4.6.3 Avaliação da expressão do gene supressor de tumor PTEN

As avaliações da proteína PTEN por imunoistoquímica foram realizada através da determinação da porcentagem de células com marcação citoplasmática positiva e negativa em um mínimo de 1000 células. Foi realizada a contagem simultânea da porcentagem de marcação nuclear positiva e negativa nas mesmas células. Foram realizadas contagens manuais com auxílio de software Image ProPlus 4.5[®] em 10 ou mais campos randomizados, em objetiva de 40x.

4.6.4 Avaliação da expressão da Matrilisina (MMP-7)

As avaliações da expressão da MMP-7 por imunoistoquímica foi realizada através da determinação da porcentagem de células com marcação citoplasmática positiva e negativa em um mínimo de 1000 células. Foi realizada a contagem simultânea da porcentagem de marcação nuclear positiva e negativa nas mesmas células. Foram realizadas contagens manuais com auxílio de software Image ProPlus 4.5[®] em 10 ou mais campos randomizados, em objetiva de 40x.

4.6.5 Avaliação da expressão proto-oncogene c-Kit

As avaliações da expressão do c-Kit por imunoistoquímica foi realizada segundo a metodologia descrita por Kiupel et al. (2004): KIT I marcações predominantes em membrana celular com mínima marcação citoplasmática; KIT II marcações pontilhadas ou em focos predominantes em citoplasma; KIT III marcações difusas em citoplasma, encobrindo outras estruturas. Foram realizadas contagens manuais com auxílio de software Image ProPlus 4.5[®] em 10 ou mais campos randomizados, em objetiva de 40x. Para classificação final foi considerado o padrão de maior porcentagem.

4.7 CULTURA DE CÉLULAS

Em estudos envolvendo a expressão de marcadores moleculares se faz necessário uma população de células da mesma linhagem, então, nosso propósito é através dos fragmentos tumorais de mastocitomas, iniciar culturas primarias de mastócitos e estabelecer as linhagens para o estudo. Para célula de mastócito normal partiremos da medula óssea canina, que estimulada com fatores de crescimento se diferenciará em mastócitos normais.

4.7.1 Cultura de células primária de mastocitomas caninos

Foram coletadas 18 formações de mastocitomas cutâneos caninos de dezoito animais submetidos à cirurgia no Serviço de Cirurgia do Hospital Veterinário (FMVZ-USP), que receberam diagnóstico de mastocitoma por meio de citologia aspirativa ou biópsia. Os fragmentos foram mantidos em temperatura ambiente em solução de tampão PBS 1x com antibióticos (estreptomicina, penicilina, anfotericina-B) até no máximo 30 minutos antes do início da preparação dos cultivos. No laboratório, em condições assépticas, os fragmentos dos mastocitomas caninos foram mecanicamente separados em fragmentos de aproximadamente 1 mm, e então submetidos à digestão em solução de colagenase tipo IA de *Clostridium histolyticum* (100 U/ml) em meio AIM-V com antibiótico/antimicótico por cerca de 2 horas a 37 °C em banho-maria sob agitação. A suspensão celular resultante foi filtrada em gaze e posteriormente em filtro de 70 µM. Todo o conteúdo foi centrifugado a 1200 RPM por 10 minutos e o sobrenadante foi descartado. As células sedimentadas foram ressuspensas em 5 ml de AIM-V suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado(SFBI) com 1% de antibiótico (penicilina, estreptomicina, anfotericina-B) e mantidos em estufa umidificada com 5% de CO₂, a 37 °C. Os mastócitos tumorais foram mantidos em cultura até atingirem a confluência de 80-90%, então as células foram tripsinizadas, processo no qual ocorre à neutralização da adesão das células ao substrato (garrafas ou placas de cultura), possibilitando que se soltem para novo plaqueamento. O congelamento foi realizado segundo Conscience e Fischer, (1995) com algumas adaptações.

O processo de tripsinização consistiu na lavagem da cultura com PBS, para remoção do meio de cultura, incubação com dois ml de tripsina-EDTA (0,25% em PBS), sendo a liberação das células acompanhada em microscópio invertido de luz. Após o desprendimento das células, a tripsina-EDTA foi inativada pela adição de AIM-V com 10% de soro fetal bovino. As células foram centrifugadas a 1200 RPM, por 10 minutos, ressuspensas em meio de cultivo e contadas em câmara de Neubauer e a viabilidade celular determinada pelo método de exclusão do corante azul de tripan (0,01% em PBS). Este método auxilia na diferenciação entre as células vivas e mortas, por utilizar a propriedade deste corante em penetrar apenas em células mortas, as quais assumem coloração azul, possibilitando a determinação da concentração das células vivas, conforme a seguinte fórmula: $[\text{n}^\circ \text{ de células/ml} = (\text{n}^\circ \text{ de células} \times \text{diluição} \times 10^4) / \text{n}^\circ \text{ de quadrantes}]$. Foi considerada aceitável uma

viabilidade celular superior a 80%. Todo o procedimento de preparo da cultura de células foi realizado com condições de total assepsia em fluxo laminar Trox®.

4.7.2 Cultura de células provenientes de medula óssea canina

Para obtenção de mastócitos normais foi coletado medula óssea de um cão da raça Beagle com cinco anos de idade, saudável, o qual fazia parte de outros estudos dentro do Departamento de Patologia - FMVZ/USP. A medula óssea foi obtida da cabeça do fêmur. Lavadas em PBS 1x contendo antibiótico (penicilina, estreptomicina, anfotericina-B), centrifugadas 1200 RPM por 10 minutos, o sobrenadante foi descartando e as células ressuspensas em meio AIM-V acrescido de 10% SFBi, 1% antibiótico (penicilina, estreptomicina, anfotericina-B) e dos fatores de crescimento IL-3 (10 ng/ml) e SCF (100 ng/ml). As células (tronco) da medula óssea foram estimuladas com IL-3 somente na primeira semana de cultivo, seguindo o cultivo somente com meio suplementado com SCF (100 ng/ml). Todo o procedimento de preparo da cultura de células foi realizado com condições de total assepsia em fluxo laminar Trox®.

4.8 ANÁLISE DAS FASES DO CICLO CELULAR E PLOIDIA DE DNA

A distribuição das células pelas fases do ciclo celular foi estudada pela técnica da impregnação nuclear do Iodeto de propídio (IP). O IP é conhecido por intercalar-se entre as fitas de DNA, em células que foram previamente permeabilizadas pela fixação em etanol 70%. Para isto, 10^6 células de cada linhagem dos mastocitmas foram previamente permeabilizadas pela fixação em etanol 70% por até 3 dias (-20 °C). Então as células foram lavadas duas vezes com PBS (5 minutos, 1200 rpm) e incubadas com 200 µL de solução contendo 20 µg/ml de IP, 200 µg/ml RNase A e 0,1% de triton 100x em PBS. Após 30 minutos, de incubação no escuro, 10000 eventos foram adquiridos por citometria de fluxo no aparelho FACSCalibur (Becton & Dickinson) por meio do programa *CellQuestPro*. A análise dos dados de fluorescência (ploidia celular) e das porcentagens de células em cada fase do ciclo celular foi realizada através do programa *Flowjo* (Tree Star) versão 10 e *Flowjo* versão

7.6.1 (Tree Star Inc, Asland, EUA). Os resultados foram expressos em porcentagem de células nas fases G1, G0/G1, S ou G2/M. Os dados foram representados em histogramas.

4.9 ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR PELO CFSE

Para esta análise foram utilizadas 5×10^4 células tumorais de cada linhagem de mastocitoma em triplicata, para cada tempo analisado. Para avaliar a proliferação das células com marcação pelo CFSE, é importante conhecer a fluorescência das células antes da divisão (ou seja, máximo de fluorescência) e de células não marcadas (ou seja, a fluorescência mínima). Portanto, vamos usar esses controles. Então teremos as seguintes leituras das amostras: Células não marcadas (branco), células marcadas com o máximo de fluorescência (tempo zero), células marcadas com CFSE e após 24 hs em cultivo (tempo 24 hs), células marcadas com CFSE e após 48 hs (tempo 48 hs).

Para o tempo zero retiramos 5×10^4 células/ml e ressuspendemos em 300 μ L de PBS 1x. Partindo de uma solução estoque de 5 mM carboxifluoresceína succinimidyl éster (CFSE) preparamos uma solução de uso de 5 μ M (ou seja 1 μ L da solução estoque CFSE para cada ml de PBS). Então lavamos as células por três vezes com PBS, com a sedimentação por centrifugação a 300xg por 5 minutos a 20 °C e descartando o sobrenadante, e ao pellet de células foram adicionados 1 ml da solução de uso do CFSE (5 μ M), e os tubos com as células foram mantidos sob agitação no escuro por 10 minutos. A reação foi bloqueada pela adição de 2 ml de soro fetal bovino inativado (SFBi) e mantidas em temperatura ambiente por 2 minutos. As células foram centrifugadas e lavadas três vezes em PBS contendo 10% SFBi. As células tratadas foram plaqueadas 5×10^4 céls/ml em triplicata (placas 24 poços) em um ml de meio AIM-V. Em cada tempo proposto para análise, as células foram retidas dos poços através da tripsinização, lavadas, centrifugadas e ressuspensas em 300 μ L de PBS para a leitura da fluorescência. As células foram analisadas por FACS - contagem de 20.000 eventos.

4.10 IMUNOCITOQUIMICA

As células foram cultivadas sobre uma lamínula em placas de 6 poços. Após 2 semanas de cultivo em meio de cultura AIM-V este foi removido e as células lavadas com

PBS 1x e fixadas em etanol 70% por 20 minutos a -20 °C. As células foram submetidas ao bloqueio da peroxidase endógena em solução de H₂O₂ 5%, diluída em metanol, durante 15 minutos. Após lavagens, as células foram submetidas à exposição antigênica com EDTA pH 9,0 aquecido a 90 °C, por 5 minutos, o bloqueio antigênico foi realizado em 5% leite diluído em PBS contendo 0,2% Tween-20, durante 30 minutos. Em seguida, foram lavadas e incubadas em câmara úmida, *overnight* e a 4 °C, com os anticorpos primários listados na Quadro1. Posteriormente, as lamínulas foram incubadas com o anticorpo secundário biotinilado universal, durante 30 minutos, seguidas das incubações com o complexo estreptoavidina-peroxidase do *kit* LSAB+System-HRP (Dako, Carpinteria, CA, USA), durante 30 minutos. As células positivas foram evidenciadas após a coloração com diaminobenzidina (DAB + Chromogen Dako Carpinteria, CA, USA). Dos mesmos tumores em cultivo foram realizados os controles negativos das reações onde o anticorpo primário foi omitido. Em cada lamínula avaliamos a especificidade e intensidade das marcações positiva nas células. As lamínulas foram montadas sobre uma lâmina de vidro e fotografadas (ampliação 400x).

4.11 IMUNOFLUORESCÊNCIA

As células foram cultivadas sobre uma lamínula em placas de 6 poços. Após 2 semanas de cultivo em meio de cultura AIM-V este foi removido, e as células lavadas com PBS e fixadas em etanol 70% por 20 minutos a -20 °C. As células foram submetidas ao bloqueio da peroxidase endógena em solução de H₂O₂ 5%, diluído em metanol, durante 15 minutos. Após lavagens, o bloqueio antigênico das lâminas foi realizado em 5% leite diluído em PBS contendo 0,1% Triton X-100, durante 30 minutos. Em seguida, as lamínulas foram lavadas e incubadas em câmara úmida, *overnight* e a 4 °C, com anticorpos apresentados na Quadro 1. Posteriormente, as lâminas foram lavadas com PBS contendo 0,1% Triton X-100 e incubadas com os anticorpos secundários marcados ou com FITC ou FAM (Dako, Carpinteria, CA, USA, 1:100) durante 60 minutos, em câmara úmida. Posteriormente, as lâminas foram lavadas com PBS contendo 0,1% Triton X-100 e montadas com Vectashield para evitar o esgotamento da fluorescência (Vector Laboratories, Inc, Burlingame, CA, USA) e vedadas com esmalte.

4.12 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)

Os procedimentos para avaliação morfológica e ultraestrutural dos mastócitos tumorais foram realizados de acordo com a metodologia utilizada pelo laboratório de microscopia eletrônica de transmissão do Instituto Ciências Biomédicas I da USP.

Para a realização da análise ultraestrutural dos mastócitos tumorais e células provenientes da medula óssea de cão estimulada com fatores de crescimento para se diferenciarem em mastócitos (normais), essas células foram cultivadas em garrafas T75 contendo 8 ml meio de cultivo AIM-V contendo 10% soro fetal bovino inativado até atingirem a confluência. Somente as células provenientes da medula óssea canina receberam os fatores de crescimento IL-3 (10 ng/ml) e SCF (100 ng/ml). Um total de $1,2 \times 10^6$ células por ml, lavadas com PBS 1x e centrifugadas por 1200 rpm por 10 minutos. O pellet de cada linhagem celular e células provenientes da medula óssea foram fixados em glutaraldeído 2,5% em 0,1 M de tampão cacodilato de sódio (pH 7,2) por 10-12 horas a 4 °C, e estocado em solução tampão cacodilato de sódio 0,1 M/sucrose 0,2 M a 4 °C até o processamento das amostras. Na sequência, as amostras foram lavadas três vezes em solução salina 0,9% e pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7,2) por 24 horas. Em seguida foram novamente lavadas em solução salina 0,9%, coradas em acetato de uranila 0,5% “overnight” e transferidas para uma gota contendo agar. O material foi armazenado a 4 °C até a formação do “pellet”, o qual foi recortado e novamente colocado em acetato de uranila 0,5% “overnight”. Ao término desta etapa as amostras foram desidratadas em uma série graduada de acetona Merck® (30 - 100%) e incluídas em bloco de Spurr. Após a inclusão, o material foi levado para a estufa a 60 °C, onde permaneceram por 72 horas para polimerização da resina. Na sequência, os blocos foram removidos da forma de inclusão e trimados para retirada do excesso da resina. Em seguida foram feitos cortes semifinos e ultrafinos no ultramicrotomo. Os cortes semifinos foram realizados com navalha de vidro a uma espessura de 500 nm. A cada avanço de 5 µm realizava-se uma lâmina, corada com azul de toluidina a 0,25% em solução aquosa de borato de sódio a 1%, para verificação da região do corte. Assim que a região contendo os mastócitos era ultrapassada, a espessura do corte foi reduzida para 200 nm e a cada avanço de dois µm, os cortes foram colhidos e montados em lâminas de vidro, corados e observados para verificação das ultraestruturas celulares.

Quando a lâmina revelava a proximidade de muitas células, a espessura do corte foi novamente reduzida para 100 nm, trocava-se a navalha de vidro pela de diamante para realização de cortes ultrafinos (50 - 70 nm), os quais foram montados em grades de cobre oval de 300 *mesh*, revestidas com parlódio, impregnados em solução de metais pesados, acetato de uranila ($\text{UO}_2(\text{CH}_3\text{COO}) \cdot 2.2\text{H}_2\text{O}$) a 2%, em etanol a 50%, contendo 1% de ácido acético glacial, durante 7 min. Três passagens por etanol a 50%. Lavagem em água ultrapura. Solução de citrato de chumbo ($(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) a 0,4%, com 1% de uma solução de hidróxido de sódio (NaOH) 5 M, durante 7 min. Lavagem com água ultrapura. Secagem das grelhas à temperatura ambiente. Análise e documentação em microscópio eletrônico de transmissão JEOL.

4.13 ANÁLISE MUTACIONAL DO GENE c-Kit

O DNA das linhagens celulares dos mastocitoma, foram submetido à análise mutacional do gene c-Kit pelo sequenciamento gênico, realizamos a análise dos éxons 8, 10-11 e 17.

4.13.1 Extração do DNA genômico

A análise do gene KIT foi realizada através da extração de DNA genômico das células das 10 linhagens celulares estabelecidas neste estudo. As células foram lisadas com o acréscimo de 100 uL de tampão de lise (pH 8,0) acrescido de proteinase K (Life Technologies), na proporção de 1,5 mg/mL de solução. A composição do tampão de lise pode ser observada no quadro 2.

Quadro 2 - Composição do tampão de lise

Tampão de Lise
Tris HCl 50 mM pH 8,0
EDTA 10 mM pH 8,0
SDS 0,5%
H ₂ O MiliQ
Proteinase K 1,5 mg/mL

A solução foi mantida por 15 minutos em banho maria à 56 °C para otimizar a lise celular. Após esse período, adicionou-se 100 µL do tampão de lise sem proteinase K, o qual foi mantido em temperatura ambiente por 15 minutos. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 11.000 RPM e a 4 °C durante 20 minutos, para sedimentação dos *debris* celulares não digeridos. Para precipitação do DNA, cerca de 150 µL do sobrenadante foi transferido para outro tubo contendo 400 µL de etanol absoluto e 10 µL de acetato de sódio 3 M. As amostras foram novamente centrifugadas a 6.000 RPM à 4 °C por 10 minutos, o sobrenadante descartado e o precipitado lavado com etanol 70%. Após a lavagem e nova centrifugação com os mesmos parâmetros anteriores, o pellet foi diluído com 20 µL de TE pH 7,5 (Tris HCl 10 mM e EDTA 1 mM). A solubilização do DNA foi realizada em banho maria a 65 °C, por 10 minutos, e sua quantificação 260/280nm foi realizada no aparelho *BioPhotometer Eppendorf®* utilizando diluição de 1:20 em TE.

4.13.2 Reação em cadeia da polimerase - PCR

Uma alíquota do DNA de cada linhagem celular foi diluída para 100 ng de DNA/µL de solução. A amplificação das regiões de interesse do DNA genômico através da técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) foi realizada com os primers listados no quadro 3.

Quadro 3 - Desenhos dos Primers para análise mutacional do gene kit

Primers utilizadoa para análise do gene c-kit
Exon 8-F: 5'TTC ACT CAC TGG TTC CAG TGG3'
Exon 8-R: 5'CCT ATC TGA AGT TCA ACT ACC3'
Exon 10-11-F: 5'TTG AAT CCT GCC GTG GTC TG3'
Exon 10-11-R: 5'GGA CAA ATC CAG CTA AGG AC3'
Exon 17-F: 5'GTG ACA TAG CAG CAT TCT CG3'
Exon 17-R: 5'GCA TGG TAT CTC AAA GGT AGG3'

Para amplificação das regiões utilizou-se o produto comercial *Taq DNA Polimerase High Fidelity Acuprime* (Invitrogen, seguindo o protocolo recomendado pela empresa, no quadro 4, descrevemos a composição da reação de amplificação.

Quadro 4- Protocolo recomendado pelo *Taq Master Mix Eppendorf®*

Amplificação PCR
100 ng DNA genômico
0,2 ul Taq DNA polimerase High fidelity
5ul do tampão Acuprime II (5x)
1 ul Primer forward (10 pmol)
1 ul Primer reverse (10 pmol)
H ₂ O MiliQ q.s.p 50 uL

Para a amplificação simultânea dos 3 exons do gene c-kit foi montado um programa no termociclador com diferentes ciclos chamado de “*Touchdown*”. Neste programa o primeiro ciclo foi de 94 °C por 2 minutos, seguidos por mais um ciclo de três temperaturas 94 °C por 30s, 64 °C por 15s e 72 °C por 15s, nos ciclos seguintes a variável foi à temperatura de

anelamento dos primers que a cada dois ciclos foram decaindo 1 grau, às outras duas temperaturas a de denaturação (94 °C) e a de extensão (72 °C) permanecerão inalteradas. Então iniciamos a amplificação com a temperatura de anelamento de 64 °C e terminando em 47 °C, para aumentar os produtos amplificados às amostras foram cicladas por mais 30 ciclos com a temperatura de anelamento de 46 °C.

Após a amplificação das regiões de interesse o produto da PCR foi aplicado em um gel de agarose que foram preparados na concentração de 1,5%, diluído em tampão TAE (Tris HCl 40 mM, ácido acético e EDTA 1 mM) e submetido a eletroforese (60 V) por 70 minutos para o fracionamento dos produtos da amplificação. O material genético amplificado foi corado com o corante comercial *Blue Green Loading Dye* (LGB Biotecnologia), sendo adicionado 1 uL do corante para 20 uL de amplificado de PCR antes da aplicação no gel de agarose. A visualização foi feita através da luz ultravioleta no transluminador.

4.13.3 Purificação dos produtos de PCR

As reações de PCR foram submetidas a uma purificação com EDTA/Acetato de sódio 3 M, onde em cada tubo de PCR foi acrescentado 2 µL de EDTA (125 mM), 2 µL de acetato de sódio 3M, acrescido de 50 µL de etanol 100%, misturados por inversão e incubados por 15 minutos a temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas 6000 RPM por 45 minutos a 4 °C. Foi retirado o sobrenadante e adicionado 70 µL d etanol 70%, seguido de centrifugação 6000 RPM por 15 minutos. Após retirar o sobrenadante o pellet foi ressuspenso em 20 µL de água MILLIQ autoclavada. As amostras foram quantificadas no aparelho NonoDrop 2000.

4.13.4 Reação de sequenciamento gênico

As reações de sequenciamento foram realizadas utilizando os produtos de PCR purificados e quantificados no NanoDrop 2000. Analisamos três éxons do gene KIT (éxon 8, 10-11 e 17) para as linhagens T05, T06, T07, T10, T12, T13, T15, T16, T17 e T18. A reação

foi realizada segundo instruções do Kit BigDyeTerminator Cycle Sequencing, conforme ilustrado no quadro 5.

Quadro 5- Composição da reação sequenciamento

Reação sequenciamento
2 µL BigDyeTerminator Cycle Sequencing Kit
2 µL tampão
1 µL produto PCR (20ng/ µL)
2,5 µL primer forward ou reverse (5µM)
4 µL H ₂ O MiliQ
Volume final 10 µL

As análises das reações de sequenciamentos gênicos foram realizadas no aparelho ABI 3730 DNA Analyser, e as análises dos eletroferogramas foram através do Software *Chromas-Versão Lite 2.1.1*.

4.14. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A normalidade dos resultados foi verificada pelo teste de Shapiro-Wilk e comparações convenientes pelos testes t-Student ou análise de variância (ANOVA), de acordo com as características dos dados obtidos e considerando o nível de significância de 5%. Nos dados com diferença significativa, utilizamos o pós-teste de Tukey-Kramer. Para a análise do ciclo celular, foi utilizado ANOVA de duas vias seguida de pós-teste de Bonferroni.

Para os dados não paramétricos, utilizamos o teste de Kruskal-Wallis para comparações entre mais de dois grupos, e o teste Mann-Whitney para comparações pareadas. Na análise e comparação das curvas de sobrevivência foi realizada com o teste Log-rang. Os dados são apresentados graficamente com média $\pm$ desvio padrão.

Resultados

5 RESULTADOS

5.1 HISTÓRICO CLÍNICO

Entre os anos de 2004 a 2010 um total de 324 animais foram diagnosticado com tumores de mastocitomas cutâneos caninos (MCTs), estes dados foram obtidos nos registros anatomopatológicos do acervo do Serviço de Patologia Animal do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP. Destes 69 (21,29%) cães receberam o diagnóstico de mastcitoma de Grau 1, e 196 (60,49%) cães foram diagnosticados com mastocitoma de Grau 2 e somente 59 (18,21%) casos foram diagnosticados como portadores de mastocitoma de Grau 3, segundo a graduação de Patnaik et al., (1984). Realizamos uma classificação aleatoriamente de 18 casos de mastocitoma cutâneo canino emblocados em parafina, sendo 6 casos de cada graduação (1, 2 e 3), neste material realizamos as análises imunoistoquímicas.

O prontuário de cada caso foi consultado para o levantamento do histórico clínico. Das 18 amostras selecionadas 11 (61,11%) foram provenientes de machos e 7 (38,88) de fêmeas. Um total de 7 raças de cães foram representadas neste estudo, a raça mais freqüente foi o Boxer com 7 animais correspondendo a 38,89% dos cães. Os Golden Retrievers aparecem com 16,67% (3/18), o Doberman, Dachshund, cães sem raça definida aparecem com dois animais de cada raça (11,11%), o Labrador e o Shar pei com apenas um exemplar de cada (5,55%).

A idade média dos animais foi de 9,6 variando entre seis e treze anos de idade. Destes, 3 (16,66%) cães tinham entre seis e sete anos, outros 5 (27,78%) entre oito e nove anos, 7 (38,89%) entre dez e onze anos e 3 (16,66%) cães possuíam entre doze e treze anos. A maioria dos animais possuía apenas uma formação (9/18, 50%), enquanto que os outros 9 cães possuíam duas ou mais formações (50%). Dos 18 animais foram extraídas 40 formações de localizações variadas. A distribuição dos tumores quanto à sua localização anatômica foram às seguintes: O local mais comum foi em membros pélvicos compreendendo 12 formações (30%), seguida pela região de Tórax (11/40, 27,5%), Abdômen Lateral (7/40, 17,5%), Cabeça/Pescoço (4/40, 10%), Pavilhão Auricular (3/40, 7,5%), Bolsa Escrotal (2/40, 5%), Dígito (1/40, 2,5%), Os dados estão sumarizados na tabela 1.

Tabela 1 - Distribuição dos 18 casos de mastocitoma cutâneo canino do estudo retrospectivo em função graduação tumoral, raça, idade, gênero, número de formações, localização, linfonodos acometidos, tempo de evolução, intervalo para recidiva, óbito e tempo de sobrevida. Atendidos no serviço de Cirurgia de Pequenos animais- HOVET - FMVZ/USP - São Paulo, 2004 - 2010

Registro Pront.	Grau Tumor	Raça	Idade (anos)	Gênero	Numero lesoes	Local tumor	Linfonodo acometido	Tempo		Óbito	Tempo sobrevida (meses)
								Evolução (meses)	Intervalo recidiva		
166646	1	Labrador Retriever	8	M	2	B, AL	Não	1	Não	Não	26-Vivo
136959	1	Boxer	10	M	4	AL, T, M, PA	Não	8	Não	22-NR	22
165483	1	SRD	11	M	1	AL	Não	6	7	8-NR	8
208347	1	Golden Retriever	8	M	2	C, M	Não	3	Não	Não	12-Vivo
206994	1	Boxer	9	F	2	C, M	Não	6	2	2-R	2
1543R	1	Golden Retriever	8	M	1	PC	Não	20	Não	Não	20-Vivo
176974	2	Dachshund	11	F	1	M	Popliteo	24	10	12-R	12
181648	2	Boxer	10	F	9	AL, T, M, C	Sub-mandib.	24	Não	12-NR	12
210451	2	Golden Retriever	6	M	1	T	Não	6	Não	Não	14-Vivo
200793	2	Boxer	9	F	1	T	Não	2	5	9-R	9
152347	2	Boxer	12	F	5	LC, PC, Di	Não	6	Não	Não	22-Vivo
188996	2	Boxer	7	M	1	AL	Não	6	Não	Não	20- Vivo
142003	3	Doberman	7	F	2	PA	Pré-escapular	4	1	1-R	1
171888	3	Doberman	11	F	1	T	Não	30	2	7-R	7
175409	3	SRD	13	M	3	M, T	Inguinal	24	1	6-R	6
156473	3	Dachshund	13	M	2	AL, B	Não	1	2	4-R	4
209201	3	Boxer	10	M	1	T	Não	6	5	5-R	5
162739	3	Inguinal, Shar-Pei	11	M	1	T	sub-lombar	2	2	2-R	2

B - Bolsa Escrotal; AL - Abdomen Lateral; LC - Lateral da Coxa; PC - Posterior da Coxa; C - Cabeça/Pescoço; Di - Dígito; M - membros; T - Torácica; PA - Pavilhão Auricular; SRD - Sem Raça Definida. NR - Óbito Não Relacionado ao tumor; R - Óbito relacionado ao tumor

Analizamos também a distribuição dos mastocitomas em função dos linfonodos acometidos os quais foram observados durante o exame clínico. O tempo de evolução, intervalo para recidiva, óbito e o tempo de sobrevida também foram observados. A metástase para o linfonodo foi registrada em cinco animais, sendo dois portadores de Grau 2 e 3 do Grau 3. Todos os cães com metástase evoluíram para o óbito.

Houve recidiva em dois (33,33%, 2/6) animais acometidos por mastocitoma de Grau 1 sendo observada a mesma incidência de recidiva (33,33%, 2/6) nos os animais portadores de

mastocitoma de Grau 2, todos os animais portadores de mastocitoma de Grau 3 tiveram recidiva (100%, 6/6). Este diagnóstico está correlacionado com um prognóstico pobre de sobrevida. E o intervalo de recidiva para as três graduações variou de 1 - 10 meses.

Todos os animais diagnosticados com mastocitoma de grau 3 vieram a óbito em decorrência do desenvolvimento do tumor. Não houve diferenças significativas entre os mastocitomas quanto à duração do crescimento do tumor.

Os animais portadores de tumores de Grau 1 não exibiram quaisquer diferenças em termos de desenvolvimento do tumor, progressão, recorrência e morte, quando comparados aos portadores de tumores de Grau 2. No entanto, quando comparamos os animais portadores de mastocitomas de Graus 1 e 2 com os portadores de mastocitomas de Grau 3 houve uma diferença significativa entre os grupos, os animais portadores de tumores de Grau 3 tinha um mau prognóstico.

O tempo de sobrevida dos animais após a recidiva do tumor variou de dois a cinco meses, independentemente do grau tumoral. Os cães que morreram por outras causas não relacionadas aos mastocitomas foram considerados estatisticamente vivos, pois não morreram em decorrência da neoplasia. O tempo de sobrevida de cães com múltiplos tumores não foi significativamente diferente dos cães com mastocitomas solitários. No caso dos cães com diversos mastocitomas (isto é, nem metástases nem recorrência no local do tumor) cada tumor foi considerado como um evento separado, as análises posteriores foram realizadas apenas com um dos tumores.

A análise estatística não apresentou diferença significativa entre o tempo de sobrevida dos animais acometidos pelos mastocitomas de Grau 1 ou 2. Porém, uma diferença significativa no tempo de sobrevida dos animais portadores de mastocitoma de Grau 3 foi observada quando comparados aos portadores de mastocitomas de Grau 1 e 2, p-value = 0,0018 e p-value = 0,0008, respectivamente (Figura 12).

Figura 12 – Distribuição do tempo de sobrevida (meses) de acordo com o grau histológico

Fonte: Fonseca, I. I. M. da (2013)

Legenda: Diferença significativa, no tempo de sobrevida dos animais portadores de mastocitoma de Grau 3 quando comparados aos portadores de Grau 1 e 2, p-value = 0,0018 e p-value = 0,0008, respectivamente

5.2 GRADUAÇÃO HISTOPATOLÓGICA

A classificação histopatológica dos tumores foi realizada por três patologistas, tendo como referência os critérios preconizados por Patnaik (1994). Os mastocitomas foram classificados de acordo com o grau de anaplasia, para cada grau histológico foram utilizadas 6 amostras tumorais. As amostras foram examinadas utilizando-se as colorações de Hematoxilina e Eosina e confirmando o diagnóstico com a coloração de Azul de Toluidina.

Os mastocitomas de Grau 1 apresentaram-se compostos por mastócitos bem diferenciados, contendo elevada quantidade de grânulos intracitoplasmáticos típicos, citoplasmas com bordos bem definidos, nucléolos inconspícuos e núcleos excêntricos arredondados, são normalmente pequenos, circunscritos à derme e não encapsulados. A superfície da neoplasia muitas vezes não é ulcerada. As células neoplásicas se assemelham aos mastócitos normais e estão arranjadas em cordões e/ou camadas finas. Mitoses são raras ou ausentes. Eosinófilos são encontrados em um número significativo. Alguns tumores apresentam, ao redor de eosinófilos degenerados, pequenos focos de colagenólise; nessa condição é comum haver pouca quantidade de estroma de feixes de colágeno e com variado edema. A hialinização perivascular é comum. A necrose tumoral é rara, mas áreas enfartadas podem aparecer (Figura 13A).

As neoplasias classificadas como Grau 2 (Figura 13B) apresentaram uma celularidade que variou de moderada a intensa, com infiltração mais profunda. Sendo que em algumas amostras foi observada infiltração em musculatura esquelética subjacente. De modo geral, as células neoplásicas apresentaram pleomorfismo moderado, com citoplasmas ora escassos ora abundantes, contendo moderada quantidade de grânulos. Os núcleos variaram de ovais a arredondados, predominantemente excêntricos, com nucléolos ora conspicuos ora inconspicuos. Eosinófilos e figuras de mitose foram visualizadas com discreta a moderada frequência. As células neoplásicas ainda estão arranjadas em cordões e lâminas, embora mais desorganizadas e com padrão infiltrativo de crescimento. Algumas amostras revelaram focos de necrose e ulceração da superfície tumoral. Em dois casos foram observadas metástases.

As neoplasias classificadas como de Grau 3 (Figura 13C) revelaram predominantemente uma celularidade de moderada a elevada, e evidente infiltração em planos teciduais profundos. Em três casos foram observadas metástases, e frequentemente êmbolos neoplásicos foram observados no interior de vasos sanguíneos dessas amostras cutâneas. Foram observados 3 casos de metástases em linfonodo regional.

Figura 13 - Fotomicrografia representativa da coloração Hematoxilina/Eosina em amostras de tecido neoplásico de mastocitoma

Fonte: Fonseca, I. I. M. da (2013)

Legenda: mastocitoma de Grau 1 (A), Grau 2 (B) e Grau 3 (C). (Objetiva = 40x)

Essencialmente as células neoplásicas apresentaram organizadas em camadas sólidas e com poucas granulações, os núcleos variaram de arredondados a lobulados, com nucléolos conspicuos e múltiplos. Figuras de mitose atípicas foram visualizadas com frequência. Estroma escasso e em alguns casos ausente. Eosinófilos foram observados com rara a

moderada frequência. Foram visualizadas áreas de necrose associadas a um infiltrado inflamatório marcante.

5.2.1 Coloração Azul de Toluidina

Observamos uma coloração de azul intenso no citoplasma das células em tumores bem diferenciados (Grau 1) (Figura 14A) devido ao conteúdo de seus grânulos (metacromáticos), composto de heparina e histamina. E a coloração pelo Azul de Toluidina cora estes grânulos de vermelho-púrpura (coloração metacromática) e o fundo em azul (coloração ortocromática). Nos tumores intermediários (Grau 2) houve diminuição na intensidade da coloração, devido à redução no número de grânulos no citoplasma destas células (Figura 14B). Nos tumores indiferenciados (Grau 3), os mastócitos tiveram a mesma coloração que as outras células do tecido e do fundo (Figura 14C).

Figura 14 - Fotomicrografia representativa da coloração Azul Toluidina nas amostras de tecido neoplásico de mastocitoma

Fonte: Fonseca, I. I. M. da (2013)

Legenda: mastocitoma de Grau 1 (A), Grau 2 (B) e Grau 3 (C), (Objetiva = 40x)

5.3 IMUNOMARCAÇÃO PARA E-CADERINA (Clone NCH38)

Usando imunoistoquímica, nós localizamos as proteínas de adesão E-caderina nos tecidos tumorais dos mastocitomas cutâneos caninos. A E-caderina foi detectada em alta

densidade na membrana das células epiteliais caninas quando utilizamos o anticorpo anti-E-caderina humana (clone NCH-38) nosso controle positivo da reação, (Figura 15A). Controle negativo da reação (Figura 15B). Este anticorpo revelou uma marcação de membrana em algumas células do mastocitoma de Grau 1 (Figura 15C). No entanto, a prevalência das imunomarcações para a E-caderina nas amostras tumorais de mastócitos bem diferenciados (Grau 1) foram citoplasmáticas fortes e difusas (Figura 15D), já para os tumores de grau intermediário de diferenciação (Grau 2) foram detectadas imunomarcações citoplasmáticas difusas e reduzidas quando comparados com as marcações dos tumores de Grau 1 (Figura 15E), nos tumores indiferenciados (Grau 3) foram detectadas imunomarcações citoplasmáticas fracas ou ausência de marcação em algumas porções tumorais (Figura 15F), quando comparados com os tumores bem diferenciados. Constatou-se que a expressão da E-caderina foi predominantemente citoplasmática nas três graduações do tumor, quando foi utilizado o anticorpo anti-E-caderina humana (clone NCH-38), as quais foram aparentemente diminuindo conforme a graduação tumoral do mastocitomas caninos.

Figura 15 - Fotomicrografia da imunomarcção com E-caderina (clone NCH-38), com contra-coloração por hematoxilina

Fonte: Fonseca, I. I. M. da (2013)

Legenda: Controle positivo (A); controle negativo (B); bordo tumor mastocitoma de Grau 1 (C) mastocitoma de Grau 1 (D); mastocitoma de Grau 2 (E); mastocitoma de Grau 3 (F), graduados segundo (Patnaik). Objetiva = 40x

Realizamos uma contagem das imunomarcações citoplasmáticas E-caderina (clone NCH-38) nas três graduações tumorais e submetemos a análise estatística (Figura16). As análises revelaram uma diferença significativa quando comparados com os resultados obtidos para os tumores de Grau 1 versus os de Grau 3 (p-value = 0,021). A mesma diferença foi encontrada quando comparamos os resultados obtidos para os tumores de Grau 2 versus os de Grau 3 (p-value = 0,021).

Figura 16 - Análise comparativa da imunomarcção citoplasmática da E-caderina (NCH-38) em todas as classes MCTs

Fonte: Fonseca, I. I. M. da (2013)

Legenda: Barras de erro mostram os desvios padrão

5.4 IMUNOMARCAÇÃO PARA E-CADERINA (Clone HECD-1)

Usando outro anticorpo para anti-E-caderina humana (clone HECD-1), nós localizamos pela imunoistoquímica as proteínas de adesão E-caderina nos tecidos tumorais dos mastocitomas cutâneos caninos. Com este anticorpo não detectamos a marcação da E-caderina na membrana das células do epitélio canino, porém observamos uma imunomarcção citoplasmática e nuclear forte (controle positivo) (Figura 17A). Controle negativo da reação (Figura 17B). Porém, em algumas regiões na margem dos mastocitomas de Grau 1, este anticorpo revelou uma marcação na membrana nos mastócitos tumorais bem diferenciados (Grau 1) (Figura 17C). No entanto, a prevalência das imunomarcações para a E-caderina nas amostras tumorais de mastócitos bem diferenciados (Grau 1) foram citoplasmáticas fortes e difusas como também marcações nucleares (Figuras 17D), para os tumores de grau intermediário de diferenciação (Grau 2) foram detectadas imunomarcações citoplasmáticas médias e difusas juntamente com as marcações nucleares que se salientaram devido a redução da marcação citoplasmática (Figura 17E), já para os tumores indiferenciados (Grau 3) tanto as imunomarcações citoplasmáticas quanto as nucleares se apresentaram fracas ou ausentes em um número maior de células (Figura 17F), quando comparamos com as marcações dos tumores bem diferenciados.

Figura 17 - Fotomicrografia da imunomarcação da expressão da E-caderina utilizando o anticorpo anti-E-caderina humana (clone HECD-1)

Fonte: Fonseca, I. I. M. da (2013)

Legenda: Controle positivo (A); controle negativo (B); bordo tumor mastocitoma de Grau 1 (C) mastocitoma de Grau 1 (D); mastocitoma de Grau 2 (E); mastocitoma de Grau 3 (F), graduados segundo (Patnaik). Objetiva = 40x

Realizamos análise estatística das contagens das imunomarcações citoplasmáticas e nucleares da E-caderina (clone HECD-1) nas três graduações tumorais (Figura 18). As análises revelaram uma diferença significativa quando comparamos os resultados obtidos para as marcações citoplasmáticas dos tumores Grau 1 versus as obtidas para os de Grau 3 (p-value = 0,028). Ao analisarmos as marcações nucleares dos tumores de Graus 1 versus as marcações nos de Grau 3, observamos uma diferença significativa (p-value = 0,001).

Mas ao compararmos as marcações dentro da mesma graduação tumoral, não houve diferença entre as marcações citoplasmáticas versus marcações nucleares nos tumores de Grau 1 (p-value = 0,07); resultados similares foram observados para os tumores de Grau 2, não há

diferença entre as marcações citoplasmáticas versus marcações nucleares nos tumores de Grau 2 (p-value = 0,12); como também não houve diferença nas marcações citoplasmáticas versus marcações nucleares nos tumores de Grau 3 (p-value = 0,43).

Figura 18 – Análise comparativa da imunomarcacão citoplasmáticas e nucleares para a E-caderina (clone HECD-1) em todos os graus dos mastocitomas

Fonte: Fonseca, I. I. M. da (2013)

Legenda: Barras de erro mostram os desvios padrão

5.5 IMUNOMARCAÇÃO PARA β -CATENINA

Verificou-se a expressão da β -catenina nos diferentes graus do mastocitoma canino usando imunoistoquímica. As imunomarcações para β -catenina foram detectadas em alta densidade na membrana das células epiteliais caninas (Figura 19A), nosso controle positivo da reação. Controle negativo da reação (Figura 19B). Nos tecidos tumorais dos mastocitomas cutâneos caninos graduados como bem diferenciados (Grau 1) foram observadas marcações na membrana, citoplasma e núcleo em algumas células da margem tumoral (Figura 19C), porém, em outras porções do mesmo tumor observamos marcação citoplasmática forte e difusa como também marcação nuclear nas mesmas células (Figura 19D), para os tumores graduados como intermediários (Grau 2) foi observado uma marcação citoplasmática fraca, mas com uma marcação nuclear forte nas mesmas células (Figura 19E), e para os tumores

graduados como indiferenciados (Grau 3) foi observado uma marcação citoplasmática fraca mas com uma marcação nuclear forte na mesma célula, ((Figura 19F).

Figura 19 - Fotomicrografia da imunomarcção da proteína β -catenina, em todos os graus dos mastocitomas

Fonte: Fonseca, I. I. M. da (2013)

Legenda: Controle positivo (A); controle negativo (B); margem do tumor mastocitoma de Grau 1 (C) mastocitoma de Grau 1 (D); mastocitoma de Grau 2 (E); mastocitoma de Grau 3 (F), graduados segundo (Patnaik). Objetiva = 40x

Realizamos análise estatística das contagens das marcações citoplasmáticas e nucleares das três graduações tumorais (Figura 20). As análises comparativas das imunomarcações para β -catenina revelaram uma diferença significativa quando comparamos as marcações citoplasmáticas dos tumores Grau 3 versus as marcações citoplasmáticas dos tumores de Grau 1 (p-value = 0,0091). As marcações nucleares não apresentaram diferenças significativas.

Figura 20 - Análises comparativas das imunomarcações citoplasmáticas e nucleares da β -catenina em todos os graus do mastocitoma canino

Fonte: Fonseca, I. I. M. da (2013)

Legenda: Barras de erro mostram os desvios padrão

5.6 IMUNOMARCAÇÃO PARA α -CATENINA

A α -catenina foi localizada tanto no citoplasma quanto no núcleo das células epiteliais caninas (pele) a qual serviu como nosso controle positivo da reação (Figura 21A). Controle negativo da reação (Figura 21B). Para os mastocitomas bem diferenciados (Grau 1) foi observado em algumas células na margem destes tumores marcações na membrana celular, citoplasma e núcleo (Figura 21C), porém, na região mais interna deste mesmo tumor foi observado marcação citoplasmática média difusa e marcação nuclear forte nas mesmas células (Figura 21D), para os tumores graduados como intermediários (Grau 2) em algumas células tumorais foi observado marcação citoplasmática fraca e com uma marcação nuclear forte (Figura 21E), e para os tumores graduados como indiferenciados (Grau 3) foi observado ausência de marcação citoplasmática e redução da marcação nuclear em algumas células tumorais (Figura 21F).

Figura 21 - Fotomicrografia da imunomarcção da molécula de α -catenina, em todos os graus do mastocitoma

Fonte: Fonseca, I. I. M. da (2013)

Legenda: controle positivo (A); controle negativo (B); bordo tumor mastocitoma de Grau 1 (C) mastocitoma de grau 1 (D); mastocitoma de Grau 2 (E); mastocitoma de Grau 3 (F), graduados segundo (Patnaik). Objetiva = 40x

Realizamos análise estatística das contagens das imunomarcações citoplasmáticas e nucleares para as α -cateninas nas três graduações tumorais (Figura 22). As análises comparativas das imunomarcações para α -catenina revelaram diferença significativa quando comparamos as marcações citoplasmáticas dos tumores Grau 3 versus as marcações citoplasmáticas dos tumores de Grau 1 (p-value = 0,009). As marcações nucleares não apresentaram resultados estatísticos significantes.

Figura 22 - Análises comparativas das imunomarcações citoplasmáticas e nucleares para α -catenina em todas as classes dos mastocitomas

Fonte: Fonseca, I. I. M. da (2013)

Legenda: Barras de erro mostram os desvios padrão

5.7 IMUNOMARCAÇÃO PARA P120-CATENINA

A imunomarcação para p120-catenina nos tumores mastocitoma canino apresentou diferença em sua localização que é tanto citoplasmática quanto nuclear nas células epiteliais como demonstrado em nosso controle positivo da reação (Figura 23A). Controle negativo da reação (Figura 23B). Nossos resultados para os tumores mastocitoma bem diferenciados (Grau 1) foi observado marcação citoplasmática forte e difusa como também marcação nuclear forte em células na margem tumoral (Figura 23C), porém na região mais interna do tumor foi observado marcação citoplasmática média e difusa com marcação nuclear forte (Figura 23D), para os tumores de grau intermediário (Grau 2) foi observado marcação citoplasmática fraca e difusa com marcação nuclear forte (Figura 23E) e para os tumores indiferenciados (Grau 3) observamos uma ausência de marcação citoplasmática com redução da marcação nuclear forte nas células tumorais (Figura 23F).

Figura 23 - Fotomicrografia da imunomarcação da molécula de p120-catenina, em todos os graus do mastocitoma

Fonte: Fonseca, I. I. M. da (2013)

Legenda: Controle positivo (A); controle negativo (B); bordo tumor mastocitoma de Grau 1 (C) mastocitoma de Grau 1 (D); mastocitoma de Grau 2 (E); mastocitoma de Grau 3 (F), graduados segundo (Patnaik). Objetiva = 40x

Realizamos a análise estatística das contagens das imunomarcações citoplasmáticas e nucleares para p120-catenina nas três graduações tumorais (Figura 24). As análises comparativas das imunomarcações para p120-catenina revelou uma diferença significativa quando comparamos as marcações citoplasmáticas dos tumores de Grau 3 versus as marcações citoplasmáticas dos tumores de Grau 1 ($p\text{-value} = 0,01$). As marcações nucleares não apresentaram resultados significativos.

Figura 24 - Análises comparativas das imunomarcações citoplasmáticas e nucleares para p120-catenina em todas as classes mastocitomas

Fonte: Fonseca, I. I. M. da (2013)

Legenda: Barras de erro mostram os desvios padrão

5.8 IMUNOMARCAÇÃO PARA PTEN

Usando imunoistoquímica, nós localizamos a proteína PTEN nos tecidos tumorais dos mastocitomas cutâneos caninos. O PTEN foi detectado de forma difusa no citoplasma das células epiteliais caninas, nosso controle positivo da reação. (Figura 25A). Controle negativo (Figura 25B). A imunomarcacão com este anticorpo revelou uma marcação de membrana, citoplasma e núcleo em algumas células que margeavam a formação neoplásica, (Figura 25C). No entanto, a prevalência das imunomarcações para o PTEN nas amostras tumorais de mastócitos bem diferenciados (Grau 1) foram citoplasmáticas fortes e difusas com marcação nuclear (Figura 25D), já para os tumores de grau intermediário de diferenciação (Grau 2) foram detectadas imunomarcações citoplasmáticas difusas e reduzidas quando comparados com as marcações dos tumores de grau 1, algumas células apresentavam ausência de marcação nuclear (Figura 25E), nos tumores indiferenciados (Grau 3) foram detectadas imunomarcações citoplasmáticas fracas ou ausência de marcação como também marcação nuclear em algumas células tumorais (Figura 25F), quando comparados com os tumores bem diferenciados.

Figura 25 - Fotomicrografia da imunomarcação do PTEN, em todos os graus do mastocitoma

Fonte: Fonseca, I. I. M. da (2013)

Legenda: controle positivo derme canina (A); controle negativo (B); bordo tumor mastocitoma de Grau 1 (C) mastocitoma de Grau 1 (D); mastocitoma de Grau 2 (E); mastocitoma de Grau 3 (F). Objetiva = 40x

A análise comparativa da marcação para a proteína PTEN nas três graduações tumorais nos mostrou que tanto as marcações citoplasmáticas quanto as nucleares não apresentaram diferenças estatísticas significativas. Para a marcação citoplasmática o valor obtido foi de $p\text{-value} = 0,082$ e para a marcação nuclear foi $p\text{-value} = 0,086$, (Figura 26).

Figura 26 - Análises comparativas das imunomarcações citoplasmáticas e nucleares para o PTEN em todos os graus do mastocitomas

Fonte: Fonseca, I. I. M. da (2013)

Legenda: Barras de erro mostram os desvios padrão.

5.9 IMUNOMARCAÇÃO PARA *MMP-7*

Usando imunoistoquímica, nós localizamos as matrilisinas nas células tumorais dos mastocitomas cutâneos caninos. A marcação para a *MMP-7* foi detectada de forma difusa no citoplasma das células epiteliais caninas, nosso controle positivo da reação (Figura 27A). Controle negativo (Figura 27B). A marcação para a *MMP-7* foi detectada nos mastocitomas caninos de (Grau 1) como uma marcação forte na região membrana proximal em algumas células (Figura 27C), no entanto, a prevalência das imunomarcações para a *MMP-7* nestas amostras foram citoplasmáticas e nucleares (Figura 27D), nos tumores de grau intermediário de diferenciação (Grau 2) foram detectadas raras marcações nucleares, com predomínio das marcações citoplasmáticas, que eram de intensidade média com um localização mais membrana proximal (Figura 27E), nos tumores indiferenciados (Grau 3) foram detectadas imunomarcações citoplasmáticas mais fracas e raras marcações nucleares (Figura 27F), em algumas porções do tumor quando comparados com os tumores bem diferenciados.

Figura 27 - Fotomicrografia da imunomarcação da metaloproteinase 7 (MMP-7), em todos os graus do mastocitoma

Fonte: Fonseca, I. I. M. da (2013)

Legenda: Controle positivo derme canina (A); controle negativo (B); bordo tumor mastocitoma de Grau 1 (C) mastocitoma de Grau 1 (D); mastocitoma de Grau 2 (E); mastocitoma de grau 3 (F). Objetiva = 40x

A análise comparativa das marcações para a proteína MMP-7 nas três graduações tumorais nos mostrou que tanto as marcações citoplasmáticas quanto as nucleares apresentaram diferenças estatísticas significativas. Para a imunomarcação citoplasmática a diferença foi de $p\text{-value} = 0,0008$ versus mastocitomas de Grau 1, e para a imunomarcação nuclear a diferença foi de $p\text{-value} = 0,0005$ versus mastocitomas de Grau 1 (Figura 28).

Figura 28 - Análises comparativas das imunomarcações citoplasmáticas e nucleares para a MMP-7 em todos os graus do mastocitomas

Fonte: Fonseca, I. I. M. da (2013)

Legenda: Barras de erro mostram os desvios padrão.

5.10 IMUNOMARCAÇÃO PARA C-KIT

Realizamos a análise das marcações para o c-Kit e adotamos os padrões descritos por Kiupel et al (2004). Cada mastocitoma foi classificado com base no padrão de coloração mais elevado apresentado em pelo menos 10% (calculado com base em 100 células neoplásicas num campo de alta potência) da população de células neoplásicas ou estar presente em grandes aglomerados. Usando imunoistoquímica, nós localizamos a proteína c-kit nos tecidos tumorais dos mastocitomas cutâneos caninos. Verificou-se a expressão dos padrões KIT-I em 4 tumores (4/18, 22,22%), KIT-II em 8 tumores (8/18, 44,44%), KIT-III em 6 tumores (6/18, 33,33%). Os padrões de marcação podem ser observados na figura 29. As amostras tumorais que expressavam KIT-I, três pertenciam ao grau 1 do histopatológico, e uma pertencia ao grau 2. As amostras que expressavam KIT-II, dois estavam incluídos nas amostras classificadas como grau 1, e seis pertenciam às classificadas como grau 2. Enquanto que as amostras que expressavam KIT-III todas pertenciam ao grau 3.

Os animais que apresentaram óbito relacionado ao tumor um (1/18, 5,55%), apresentou padrão KIT-I, dois (2/18, 11,11%), padrão KIT-II de marcação, enquanto seis

(6/18, 33,33%), apresentaram padrão KIT-III. Dos quatro animais que demonstraram padrão KIT-I nenhuma evoluiu a óbito relacionado ao tumor, enquanto que os que mostraram padrão KIT-II foram somente 25% (2/8). O óbito relacionado ao mastocitoma ocorreu em 100% (6/6) dos pacientes com padrão de marcação KIT-III (Tabela 2).

Tabela 2— Distribuição das taxas de mortalidade, relacionadas ou não aos mastocitomas, em função dos padrões de marcação pela imunoistoquímica para o c-kit (segundo Kiupel et al., 2004). Porcentagens em relação ao total de casos para cada padrão de marcação. FMVZUSP- São Paulo, 2004 - 2010.

	Morte relacionada ao tumor	Morte não relacionada ao tumor	Vivos ao final do estudo	Total
KIT I	0 (0,0%)	2 (11,11%)	2 (11,11%)	4 (22,22%)
KIT II	3 (16,67%)	1 (5,56%)	4 (22,22%)	8 (44,45%)
KIT III	6 (33,33%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	6 (33,33%)
TOTAL	9 (50%)	3 (16,67%)	6 (33,33%)	18 (100%)

Figura 29 - Fotomicrografia da imunomarcção para o c-kit, nos diferentes graus do mastocitoma canino

Fonte: Fonseca, I. I. M. da (2013)

Legenda: Controle positivo (A); controle negativo (B); bordo tumor mastocitoma de Grau 1(Padrão KIT-I) (C) mastocitoma de Grau 1 (Padrão KIT-I) (D); mastocitoma de Grau 2 (Padrão KIT-II) (E); mastocitoma de Grau 3 (Padrão KIT-III) (F). Objetiva = 40x

5.11 ESTABELECIMENTO CULTIVO CELULAR DOS MASTOCITOMAS

Um total de 18 amostras de mastocitoma cutâneo canino foi coletado para este estudo. Analisamos os prontuários médicos e coletamos o histórico clínico dos pacientes. E analisamos a distribuição em função da graduação tumoral, raça, idade, gênero, localização, tempo de sobrevivência. Quanto ao gênero tivemos 14 (77,77%) animais machos e quatro (22,22%) fêmeas. A idade média dos pacientes foi de 7,5 anos, variando entre três e dez anos de idade. Um total de sete raças de cães foi representado nesta parte do estudo, a raça mais frequente foi o Pit Bull com cinco animais correspondendo a 27,78% dos cães. As raças

Golden Retrievers, Boxer e Labrador estão representadas por 3 animais, perfazendo um total de 16,67% (3/18), o Cocker (11,11%, 2/18), o Dachshund e cães sem raça definida apenas com um exemplar cada (5,56%, 1/18). Somente um dos cães tinha duas formações, os demais tinham somente uma formação tumoral. A distribuição dos tumores quanto à localização anatômica foram às seguintes: A região mais incidente foi os Membros (42,10%, 8/19), Tórax (21,05%, 4/19), Abdômen Lateral (10,52%, 2/19), Bolsa Escrotal (5,26%, 1/19), Dígito (5,26%, 1/19), Cauda (5,26%, 1/19), Linfonodo (5,26%, 1/19), Prepúcio (5,26%, 1/19). Os animais portadores de mastocitoma de grau 1 estão todos vivos. Os que receberam diagnóstico de mastocitoma de grau 2 também estavam vivos ao final do estudo. Dos animais portadores de mastocitoma de grau 3, dois continuam vivos e 3 vieram a óbito em decorrência da neoplasia.

Os tumores classificados como Grau 1 foram (T3, T5, T8, T9, T10, T12), e como Grau 2 (T1, T11, T13, T15, T16, T17, T18) e Grau 3 (T2, T4, T6, T07, T14). Desses 18 tumores coletados infelizmente perdemos oito amostras ou por contaminação com bactérias/fungos ou por não se proliferarem após o descongelamento (**T1, T2, T3, T4, T8, T9, T11 e T14**). Os dados estão sumarizados na tabela 3.

Tabela 3 - Distribuição dos 18 casos de mastocitoma cutâneo canino, mantidos a cultura celular, em função da raça, idade, gênero, localização, tempo de sobrevida. Atendidos no serviço de Cirurgia de Pequenos animais- HOVET- FMVZ/USP - São Paulo, 2010 – 2012

Número cão	Número tumor	Registro clínico	Graduação	Raça	Idade (anos)	Gênero	Localização anatômica	Tempo sobrevida (meses)
1	T1	171140	2	Cocker	6	Fêmea	C	40-Vivo
2	T2	-	3	Golden	10	Macho	M	Obito
3	T3	-	1	Golden	8	Macho	LC	38-Vivo
4	T4	-	3	Pit Bull	7	Macho	LC	38-Vivo
5	T5	-	1	Labrador	7	Fêmea	T	37-Vivo
6	T6	-	3	Boxer	3	Fêmea	T	37-Vivo
7	T7	213142	3	SRD	10	Fêmea	LC	Obito
8	T8	214971	1	Dachshund	7	Macho	M	31-Vivo
9	T9	216723	1	Boxer	10	Macho	M	31-Vivo
10	T10	214530	1	Labrador	5	Macho	M	28-Vivo
11	T11	163940	2	Labrador	7	Macho	P, BE	38-Vivo
12	T12	-	1	Golden	10	Macho	Di	27-Vivo
13	T13	214822	2	Boxer	4	Macho	AL	26-Vivo
14	T14	19247	3	Pit Bull	7	Macho	L	Obito
15	T15	177983	2	Cocker	7	Macho	T	26-Vivo
16	T16	215070	2	Pit Bull	11	Macho	LC	26-Vivo
17	T17	180651	2	Pit Bull	7	Macho	T	13-Vivo
18	T18	230717	2	Pit bull	9	Macho	AL	38-Vivo

C - Cabeça e pescoço, Di - dígito; T - Toráx; M - membros, BE - Bolsa escrotal, L - Linfonodo, LC - Lateral da coxa, AL - Abdomen Lateral, P - Prepúcio, SRD - Sem Raça Definida

5.11.1 Cultivo celular de Mastócitos a partir da medula óssea canina

Realizamos com sucesso o estímulo das células tronco da medula óssea canina a se diferenciarem em mastócitos normais. No começo do cultivo as células se apresentavam soltas ou em cachos e em suspensão, a partir de um mês de cultivo começaram a se aderir a garrafa de cultivo, foram mantidas em cultivo em meio condicionado com 100mg/ml de SCF. Mastócitos caninos normais se aderem à garrafa de cultivo celular e apresentam uma morfologia similar a um fibroblasto, como ilustrado nas figuras 30 e 31.

Figura 30 - Fotomicrografia das células da medula óssea estimulada com IL-3 e SCF (mastócitos) em cultura

Fonte: Fonseca, I. I. M. da (2013)

Legenda: (A) primeira semana de cultivo - objetiva 10x. (B) primeira semana de cultivo - objetiva 40x. (C) 30 dias de cultivo - objetiva 20x. (D) 30 dias de cultivo - objetiva 40x. Visualização em microscópio invertido Motic

Figura 31 - Fotomicrografia das células da medula óssea após 30 dias de estímulo com IL-3 e SCF (mastócitos) em cultura

Fonte: Fonseca, I. I. M. da (2013)

Legenda: (A) 50 dias de cultivo - objetiva 20x. (B) 60 dias de cultivo - objetiva 20x. (C) 60 dias de cultivo - objetiva 20x. (D) 60 dias de cultivo - objetiva 40x. Visualização em microscópio invertido Motic

5.11.2 Estabelecimento das linhagens celulares dos tumores de mastocitomas

Para o estabelecimento das linhagens celulares foram utilizados fragmentos das três graduações dos tumores de mastocitomas, estas amostras foram coletadas de cães que foram submetidos ao procedimento cirúrgico para retirada do tumor, a maioria das amostras foi coletada no centro cirúrgico do Hospital Veterinário – HOVET – FMVZ – USP. Foram realizadas análises das células por citologia aspirativa para confirmação dos casos de mastocitoma cutâneo canino. Coletamos um total de 18 fragmentos tumorais de 18 cães acometidos pela neoplasia.

Para cada fragmento de tumor coletado foi estabelecida uma linhagem celular, após a coleta estes fragmentos foram submetidos a cortes de mais ou menos 2 mm e foram mantidos em cultivo por 4 dias, após este período o meio de cultivo foi centrifugado e o pellet das células que ainda permaneciam em suspensão foi devolvido para a garrafa de origem, acrescentamos as garrafas de cultivo uma mistura de 50% do meio condicionado (meio que estava em contato com as células) mais 50% meio de cultivo AIM-V novo, contendo 10% de soro fetal bovino inativo. Quando a monocamada de células aderidas atingia a confluência de mais ou menos 90%, as garrafas de cultivo foram tripsinizadas e as culturas celulares expandidas.

Apesar de inúmeros estudos afirmarem que os mastócitos crescem em suspensão no meio de cultivo, em nossos experimentos observamos que o número de células em suspensão diminuía com o passar do tempo de cultivo (30 dias), e que as células que cresciam aderidas à garrafa apresentavam em seu citoplasma uma quantidade significativa de grânulos, deduzimos então que não se tratava de uma monocamada de fibroblastos e sim de mastócitos tumorais aderidos, então submetemos estas células a uma tripsinização, fixação em formol 4% e em seguida a uma coloração com Azul de Toluidina, e assim constatamos uma fraca coloração púrpura no citoplasma dos mastócitos tumorais em cultivo (Figura 32).

As linhagens foram mantidas em cultivo até se conseguir um número significativo de células para o congelamento, então foram tripsinizadas e congeladas no mesmo tubo tanto células em suspensão quanto aderentes. O tempo de congelamento não interferiu na viabilidade das células, pois tumores congelados por até um ano, em meio AIM-V contendo PVP-40 e glicerol tiveram uma viabilidade de mais de 80% a 90% após o descongelamento como ilustramos nas figuras 33 a 42.

Figura 32 - Fotomicrografia representativa da coloração Azul Toluidina nas amostras de mastócitos neoplásicos em cultura que cresceram de forma aderente as garrafas de cultivo

Fonte: Fonseca, I. I. M. da (2013)

Legenda: Mastocitoma Grau 1 (A), Grau 2 (B) e Grau 3 (C). (Objetiva = 100x)

Figura 33 - Fotomicrografia das células da linhagem T05, fusiforme e aderidas à garrafa de cultura. Sem adição dos fatores de crescimento no meio de cultivo (SCF e IL-3)

Fonte: Fonseca, I. I. M. da (2013)

Legenda: (A) objetiva 4x, (B) objetiva 10x, (C) objetiva 20x, (D) objetiva 40x. Visualização em microscópio invertido Motic

Figura 34 - Fotomicrografia das células da linhagem T06, fusiforme e aderidas à garrafa de cultura. Sem adição dos fatores de crescimento no meio de cultivo (SCF e IL-3)

Fonte: Fonseca, I. I. M. da (2013)

Legenda: (A) objetiva 4x, (B) objetiva 10x, (C) objetiva 20x, (D) objetiva 20x. Visualização em microscópio invertido Motic

Figura 35 - Fotomicrografia das células da linhagem T07, fusiforme e aderidas à garrafa de cultura. Sem adição dos fatores de crescimento no meio de cultivo (SCF e IL-3)

Fonte: Fonseca, I. I. M. da (2013)

Legenda: (A) objetiva 10x, (B) objetiva 10x, (C) objetiva 20x, (D) objetiva 40x. Visualização em microscópio invertido Motic

Figura 36 - Fotomicrografia das células da linhagem T10. Presença de mastócitos em cachos ou colônias com 60 dias em cultivo sem os fatores de crescimento (SCF e IL-3)

Fonte: Fonseca, I. I. M. da (2013)

Legenda: (A) objetiva 4x, (B) objetiva 10x, (C) objetiva 20x, (D) objetiva 40x. Visualização em microscópio invertido Motic

Figura 37 - Fotomicrografia das células da linhagem T12, células fusiformes e aderidas à garrafa de cultura e alguns ninhos celulares sobre a monocamada. Sem adição dos fatores de crescimento (SCF e IL-3)

Fonte: Fonseca, I. I. M. da (2013)

Legenda: (A) objetiva 4x, (B) objetiva 20x, (C) objetiva 20x, (D) objetiva 40x. Visualização em microscópio invertido Motic

Figura 38 - Fotomicrografia mastócitos tumorais linhagem T13. Presença de mastócitos em colônias após 60 dias em cultivo sem os fatores de crescimento (SCF e IL-3)

Fonte: Fonseca, I. I. M. da (2013)

Legenda: (A) objetiva 4x, (B) objetiva 10x, (C) objetiva 40x, D) objetiva 40x. Visualização em microscópio invertido Motic

Figura 39 - Fotomicrografia das células da linhagem T15, células redondas e fusiformes e aderidas à garrafa de cultura e alguns ninhos celulares sobre a monocamada, sem adição dos fatores de crescimento (SCF e IL-3)

Fonte: Fonseca, I. I. M. da (2013)

Legenda: (A) objetiva 4x, (B) objetiva 10x, (C) objetiva 20x, (D) objetiva 40x, Visualização em microscópio invertido Motic

Figura 40 - Fotomicrografia das células da linhagem T16, células fusiformes e aderidas à garrafa de cultura e alguns ninhos celulares sobre a monocamada, sem adição dos fatores de crescimento (SCF e IL-3)

Fonte: Fonseca, I. I. M. da (2013)

Legenda: (A) objetiva 4x, (B) objetiva 10x, (C) objetiva 20x, (D) objetiva 40x. Visualização em microscópio invertido Motic

Figura 41 - Fotomicrografia das células da linhagem T17, células redondas e fusiformes aderidas à garrafa de cultura, sem adição dos fatores de crescimento (SCF e IL-3)

Fonte: Fonseca, I. I. M. da (2013)

Legenda: (A) objetiva 4x, (B) objetiva 10x, (C) objetiva 20x, (D) objetiva 40x. Visualização em microscópio invertido Motic

Figura 42 - Fotomicrografia das células mastócitos tumorais recém-coletados (linhagem T18) em cultura, sem adição dos fatores de crescimento (SCF e IL-3)

Fonte: Fonseca, I. I. M. da (2013)

Legenda: (A) 24 h após coleta - objetiva 4x, (B) 4 dias de cultivo - objetiva 10x, (C) 6 dias de cultivo - objetiva 20x, (D) 6 dias de cultivo - objetiva 40x. Visualização em microscópio invertido Motich

5.12 CICLO CELULAR E PLOIDIA DE DNA

As fases do ciclo celular e ploidia de DNA foram avaliadas pela técnica da impregnação nuclear do iodeto de propídio (PI), 10000 eventos foram adquiridos por citometria de fluxo. Após a aquisição os dados da fluorescência (ploidia celular) e das porcentagens de células em cada fase do ciclo celular foram analisados no programa *Flowjo*. Linfócitos caninos foram usados como controle externo e como calibradores do conteúdo de DNA de células diploide e como referência do pico G0/G1 (Figura 43). Os resultados das análises mostram que as oito linhagens do mastocitoma apresentam o pico G0/G1 na posição semelhante à observada em linfócitos normais de referência, então classificamos todas as linhagens como diplóides. Abaixo ilustramos os gráficos padrões das fases G0/G1, G2 e S para os linfócitos caninos, a figura 44 ilustra os padrões de eventos durante a leitura, como a dispersão sem gate e com gate e população de células analisadas excluindo os dublets, como também o histograma da análise do ciclo celular, este padrão foi observado nas oito linhagens de mastocitomas.

Figura 43- Ilustra o padrão dos gráficos para as fases G0/G1, G2 e fase S do ciclo celular dos linfócitos caninos

Fonte: Fonseca, I. I. M. da (2013)

Figura 44 - Figura ilustra o padrão de dispersão das células de uma das linhagens de mastocitoma e o histograma das fases do ciclo celular

Fonte: Fonseca, I. I. M. da (2013)

Legenda: (A) sem *gate*, (B) com *gate*, (C) população de células analisadas excluindo os *dublets*, (D) o histograma da análise do ciclo celular

Alguns valores descritos na tabela 4 nos mostram que existe uma diferença sutil nos índices de proliferação das linhagens tumorais, para a fase GO/G1 foram entre 70,57% a 92,95%. Sendo que a maior porcentagem foi vista na linhagem T12 com 92,95%. E a menor frequência foi vista na linhagem T10 com 70,57%. As demais linhagens ficaram com valores muito próximos e estão representados na tabela 4.

O índice de frequência da fase S nas linhagens tumorais foi de 1,71% a 11,02%. Sendo que a maior porcentagem foi vista na linhagem T10 com 11,02%. Outras duas linhagens tiveram uma frequência alta de 7,53% para a linhagem T15 e de 7,42% para a linhagem T07. As demais ficaram com uma frequência abaixo de 5,74%.

A frequência de G2 para as linhagens tumorais foi de 1,75% a 12,74%. Duas linhagens a T10 com 12,74% e a T05 com 11,73% tiveram os valores mais altos, a menor frequência para G2 foi vista na linhagem T12, as demais ficaram com valores muito próximos.

O que demonstra que alguns tumores podem ter mais células em divisão do que outros, lembrando que o crescimento de todos os tumores das linhagens dos mastocitomas caninos mantidos em cultivo “*in vitro*” tem se mostrado mais lento quando comparados a outros tumores cultivados, podem levar alguns dias para confluir uma garrafa de tamanho médio. A análise do ciclo celular nos mostra que todas as linhagens celulares estavam na fase G1 do ciclo celular no momento em que realizamos o experimento. Os resultados estão representados na tabela 4 e na figura 45.

Tabela 4 - Na tabela estão representados os valores obtidos da análise do ciclo celular para 8 linhagens tumorais e um exemplo da leitura realizada para os linfócitos caninos

	Linfócitos caninos	T05	T06	T07	T10	T12	T15	T16	T17
RMS =	1,09	4,47	7,48	7,81	5,82	18,53	11,22	10,02	14,45
Freq. G1 =	23,34	80,82	82,15	84,85	70,57	92,95	84,23	86,92	84,43
Freq. S =	1,58	4,93	5,45	7,42	11,02	1,71	7,53	3,7	5,74
Freq. G2 =	1,67	11,73	6,46	3,89	12,74	1,75	3,81	3,15	3,89
G1 Mean =	206,81	223,9	211,31	218,99	213,93	203,75	218,18	225,8	219,95
G2 Mean =	416,16	426,71	409,62	419,92	418,52	397,08	423,93	437,78	429
G1 cv =	4,37	6,1	4,99	5,33	5,24	5,13	5,38	6,98	5,47
G2 cv =	1,99	6,05	6,08	4,44	4,99	5,92	5,39	7,88	6,03
Freq. sub-G1 =	5,51	0,51	3,24	2,06	3,17	4,63	3,66	5,8	5,35
Freq. super-G2 =	0,4	0,21	-0,12	0,09	0,95	0,07	0,18	0,09	0,43

Fonte: Fonseca, I. I. M. da (2013)

Legenda: (T05) linhagem do tumor número 5; (T06) linhagem do tumor número 6; (T07) linhagem do tumor número 7; (T05) linhagem do tumor número 10; (T12) linhagem do tumor número 12; (T15) linhagem do tumor número 15; (T16) linhagem do tumor número 16; (T17) linhagem do tumor número 17. ID - Índice de DNA; G2/M - fase G2/M do ciclo celular; S - fase S do ciclo celular; G1 - fase G1 do ciclo celular; Sub G1 = fase que revela nível de apoptose celular. Resultados expressos em porcentagem

Figura 45 - Análise comparativa das fases do ciclo celular nas oito linhagens de mastocitoma em cultivo e seus respectivos índices de proliferação

Fonte: Fonseca, I. I. M. da (2013)

Legenda: (T05) linhagem do tumor número 5; (T06) linhagem do tumor número 6; (T07) linhagem do tumor número 7; (T10) linhagem do tumor número 10; (T12) linhagem do tumor número 12; (T15) linhagem do tumor número 15; (T16) linhagem do tumor número 16; (T17) linhagem do tumor número 17. ID - Índice de DNA; G2/M - fase G2/M do ciclo celular; S - fase S do ciclo celular; G1 - fase G1 do ciclo celular; Sub G1 - fase que revela nível de apoptose celular

O índice de DNA (ID) foi representado por histogramas com uma escala logarítmica, e o conteúdo em DNA nuclear (ploídia) baseou-se na seguinte classificação: diplóide (ID = 0,90-1,1); tetraplóide (ID = 1,8-2,2); aneuploidia (ID= índices diferente das anteriores).

Realizamos a análise da média do índice de proliferação das amostras tumorais versus a média de proliferação dos linfócitos caninos através da fórmula abaixo.

$$\frac{\text{Média da fluorescência do canal do pico G1 células tumorais}}{\text{Média da fluorescência do canal do pico G1 células controle}} = \text{Índice de Proliferação}$$

Os valores da média do índice de proliferação confirmam que as células das linhagens dos mastocitomas são diplóides, pois todas as linhagens apresentaram valores similares em torno de 1,03 a 1,093 (Figura 45). Nossos resultados demonstram que independente de sua graduação tumoral, os mastocitomas em cultivo tem um comportamento muito semelhante. Nenhum deles apresentou diferença significativa no crescimento.

5.13 PROLIFERAÇÃO CELULAR PELO METODO CFSE

Todas as linhagens celulares apresentaram uma taxa de proliferação celular acima de 50% após 24 horas de cultivo. Observamos que a linhagem T15 foi a que menos se proliferou com uma taxa de proliferação de 55,6%. As linhagens T06 (61,1%) e T16 (59,6%) tiveram aproximadamente a mesma taxa de proliferação. As linhagens T12 (64,9%) e T18 (69,5%) ficaram com valores muito próximos. As maiores taxas de proliferação foram observadas para as linhagens T10 (75,8%) e T17 (74%). No quadro 6 abaixo estão representados valores referentes ao basal e 24 horas de cultivo.

Quadro 6 - Representação dos valores obtidos nas leituras da fluorescência do CFSE nas diferentes linhagens tumorais dos mastocitomas

Tempos	% Proliferação
T06 basal	8,42
T06 24h	61,1
T10 basal	13,2
T10 24h	75,8
T12 basal	10,7
T12 24h	64,9
T15 basal	9,1
T15 24h	55,6
T16 basal	9,72
T16 24h	59,6
T17 basal	10,2
T17 24h	74
T18 basal	10
T18 24h	69,5

Os histogramas abaixo ilustram os padrões de leitura de uma das linhagens de mastócitos tumorais mantidos em cultivo (Figura 46). Devido à rápida multiplicação das células em 24hs, se fez necessário à leitura de um segundo basal, para que os valores para os tempos de 48hs estivessem dentro da margem de leitura. Na figura 47 ilustramos a proliferação celular de sete linhagens.

Figura 46 - Os histogramas ilustram a proliferação celular pelo CFSE, em uma das linhagens de mastocitoma em cultivo, nos tempos basal, 24 e 48 hs

Fonte: Fonseca, I. I. M. da (2013)

Figura 47 - O gráfico ilustra a porcentagem de proliferação das sete linhagens tumorais de mastocitoma analisadas pelo método CSFE

Fonte: Fonseca, I. I. M. da (2013)

Legenda: linhagem do tumor número 6 (T06); linhagem do tumor número 10 (T10); linhagem do tumor número 12 (T12); linhagem do tumor número 15 (T15); linhagem do tumor número 16 (T16); linhagem do tumor número 17 (T17); linhagem do tumor número 18 (T18)

5.14 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)

As células provenientes de medula óssea canina após estímulo com os fatores de crescimento específicos (IL-3 e SCF) se diferenciaram em mastócitos normais, foram fixadas

em glutaraldeído 2,5%, e submetidas ao protocolo de microscopia eletrônica de transmissão. Secção corte fino foi submetida à coloração com Azul de Toluidina para monitorar a área de corte da amostra, e a figura 48 ilustra mastócitos provenientes de medula óssea, com conteúdo granular ainda imaturo, corados pelo Azul de Toluidina.

Após dois meses de cultivo e de estímulo com SCF às células provenientes de medula óssea canina e que se encontravam aderidas à garrafa de cultivo foram submetidas à análise em microscopia eletrônica de transmissão. Podemos observar uma grande quantidade de grânulos presente no citoplasma celular, sendo que a maioria deles é imatura, mas, alguns apresentam conteúdo em seu interior. As setas indicam os grânulos imaturos com pouco ou nenhum material eletro denso em seu interior. Na figura 49 E e F é possível identificar a formação de figuras de mielina no interior das vesículas secretórias. Estas imagens foram fotografadas no microscópio eletrônico de transmissão JEOL.

Figura 48 - Fotomicrografia das células provenientes da medula óssea estimulada com IL-3 e SCF (Mastócitos normais) fixadas com glutaraldeído e coradas com Azul da toluidina

Fonte: Fonseca, I. I. M. da (2013)

Legenda: As setas indicam os grânulos corados pelo Azul de Toluidina (fotografado em objetiva 100x)

Figura 49 - Eletromicrografia das células provenientes da medula óssea canina estimulada com fatores de crescimento IL-3 e SCF, fixadas em resina e analisadas pela microscopia eletrônica de transmissão

Fonte: Fonseca, I. I. M. da (2013)

Legenda: (A - 2000 K), (B - 6000 K), (C - 10000 K), (D - 15000 K), (E - 50000 K), (F - 75000 K). Estas imagens obtidas no microscópio eletrônico de transmissão JEOL. As figuras são representativas de uma amostragem de células contidas em pelo menos 3 eletromicrografias diferentes

Após 5 meses da coleta e inúmeras fases de cultivo e congelamentos consecutivos os mastócitos aderentes provenientes do tumor T05 (Grau 1) foram submetidas a fixação com glutaraldeído 2,5% e então submetidas ao protocolo de microscopia eletrônica de transmissão. Secção corte fino foi submetida à coloração com Azul de Toluidina para monitorar a área de corte da amostra, podemos notar inúmeros grânulos com um certo grau de maturidade no citoplasma destas células como ilustra a figura 50. Através da eletromicrografia comprovamos que a maioria das células contém muitos grânulos, com um conteúdo eletro denso em seu interior, mas a maioria dos grânulos é imatura e apresentam uma grande quantidade de figuras de mielina no interior das vesículas secretórias, como ilustra a figura 51. Estas células apresentam um nucléolo bem evidente. Estas imagens foram obtidas no microscópio eletrônico de transmissão JEOL.

Figura 50 - Fotomicrografia das células provenientes da linhagem T05 fixadas com glutaraldeído e coradas com Azul da toluidina

Fonte: Fonseca, I. I. M. da (2013)

Legenda: As setas indicam os grânulos corados pelo Azul de Toluidina (fotografado em objetiva 100x). A figura é representativa de uma amostragem de células contidas em pelo menos 3 eletromicrografias diferentes

Figura 51 - Eletromicrografia das células provenientes da linhagem T05, fixadas em resina e submetidas a análise pela microscopia eletrônica de transmissão

Fonte: Fonseca, I. I. M. da (2013)

Legenda: As setas indicam os grânulos, alguns apresentam um material eletro denso em seu interior. Na figura 51 E e F é possível identificar a formação de figuras de mielina no interior das vesículas secretórias. (A - 3000 K), (B - 6000 K), (C - 10000 K), (D - 15000 K), (E - 50000 K), (F - 50000 K). Estas imagens obtidas no microscópio eletrônico de transmissão JEOL

As células do tumor T06 (grau 3) apresentam a maioria de seus grânulos vazios ou com pouquíssimo conteúdo em seu interior, mas ainda preservam algumas características morfológicas de mastócitos, como por exemplo o núcleo bi lobulado e os grânulos secretórios com pouco material em seu interior. Secção corte fino foi submetida à coloração com Azul de Toluidina para monitorar a área de corte da amostra como visualizados na figura 52. Na eletromicrografia podemos observar uma pequena quantidade de grânulos presente no citoplasma celular, sendo que a maioria é imatura. As setas indicam os grânulos imaturos com pouco ou nenhum material eletro denso em seu interior (Figura 53). Estas imagens foram obtidas no microscópio eletrônico de transmissão JEOL.

Figura 52 - Fotomicrografia das células provenientes da linhagem T06 fixadas com glutaraldeído e coradas com Azul da toluidina

Fonte: Fonseca, I. I. M. da (2013)

Legenda: as setas indicam os grânulos corados pelo Azul de Toluidina (fotografado em objetiva 100x)

Figura 53 - Eletromicrografia das células provenientes da linhagem T06, fixadas em resina e submetidas à análise pela microscopia eletrônica de transmissão

Fonte: Fonseca, I. I. M. da (2013)

Legenda: As setas em A, B e C indicam a interação de duas células, possivelmente através de moléculas de adesão. As setas em E e F indicam os grânulos imaturos com pouco ou nenhum material eletro denso em seu interior. (A - 3000 K), (B - 6000 K), (C - 10000 K), (D - 15000 K), (E - 50000 K), (F - 50000 K). Estas imagens foram obtidas no microscópio eletrônico de transmissão JEOL

As células do tumor T07 (grau 3) também apresentam a maioria de seus grânulos vazios ou com pouquíssimo conteúdo em seu interior, mas ainda preservam algumas características morfológicas de mastócitos, como por exemplo o núcleo bi lobulado e os grânulos com material em seu interior. Secção corte fino foi submetida à coloração com Azul de Toluidina para monitorar a área de corte da amostra como visualizados na figura 54. Na eletromicrografia podemos observar uma pequena quantidade de grânulos presente no citoplasma celular, sendo que a maioria é imatura. A maioria das células apresenta o nucléolo bem evidente, (Figura 55A e B) além de inúmeras mitocôndrias indicadas pelas setas vermelhas (Figura 55D e F). As setas azuis indicam os grânulos imaturos com pouco ou nenhum material eletro denso em seu interior, com ilustrado na figura 55. Estas imagens foram obtidas no microscópio eletrônico de transmissão JEOL.

Figura 54 - Fotomicrografia das células provenientes da linhagem T07 fixadas com glutaraldeído e coradas com Azul da toluidina

Fonte: Fonseca, I. I. M. da (2013)

Legenda: As setas indicam os grânulos corados pelo Azul de Toluidina e um nucléolo bem evidente (fotografado em objetiva 100x)

Figura 55 - Eletromicrografia das células provenientes da linhagem T07, fixadas em resina e submetidas à análise pela microscopia eletrônica de transmissão

Fonte: Fonseca, I. I. M. da (2013)

Legenda: As setas azuis indicam os grânulos imaturos com pouco ou nenhum material eletro denso em seu interior e as vermelhas as mitocôndrias. Na figura 55 E e F é possível identificar a formação de figuras de mielina no interior das vesículas secretórias (A - 3000 K), (B - 6000 K), (C - 10000 K), (D - 15000 K), (E - 50000 K), (F - 50000 K). Estas imagens obtidas no microscópio eletrônico de transmissão JEOL

Algumas células do tumor T10 (Grau 1) apresentam suas vesículas secretórias com muito material eletro denso em seu interior, esta linhagem permaneceu por mais de 60 dias consecutivos em cultivo. Secção corte fino foi submetida à coloração com Azul de Toluidina para monitorar a área de corte da amostra como visualizados na figura 56.

Na eletromicrografia podemos observar uma pequena quantidade de grânulos presente no citoplasma celular, sendo que a maioria é imatura. A maioria das células apresenta o nucléolo bem evidente, (Figura 56B) As setas azuis indicam os grânulos imaturos com pouco ou nenhum material eletro denso em seu interior, com ilustrado na figura 57. Estas imagens foram obtidas no microscópio eletrônico de transmissão JEOL.

Figura 56 - Fotomicrografia das células provenientes da linhagem T10 fixadas com glutaraldeído e coradas com Azul da toluidina

Fonte: Fonseca, I. I. M. da (2013)

Legenda: as setas indicam os grânulos corados pelo Azul de Toluidina (fotografado em objetiva 100x)

Figura 57 - Eletromicrografia das células provenientes da linhagem T10, fixadas em resina e submetidas à análise pela microscopia eletrônica de transmissão

Fonte: Fonseca, I. I. M. da (2013)

Legenda As setas azuis indicam os grânulos imaturos com pouco ou nenhum material eletro denso em seu interior. A seta vermelha indica uma mitocôndria e a verde esta indicando reticulo endoplasmático rugoso. Na figura 57 F é possível identificar a formação de figuras de mielina no interior das vesículas secretórias (A - 3000 K), (B - 6000 K), (C - 10000 K), (D - 15000 K), (E - 50000 K), (F - 50000 K). Estas imagens foram obtidas no microscópio eletrônico de transmissão JEOL

Algumas células do tumor T12 (Grau 1) apresentam algumas de suas vesículas secretórias com muito material eletro denso em seu interior. Secção corte fino foi submetida à coloração com Azul de Toluidina para monitorar a área de corte da amostra como visualizados na figura 58. Na eletromicrografia podemos observar os grânulos com certo grau de maturidade apresentando conteúdo preenchendo totalmente suas vesículas secretórias. Estas células não apresentam um nucléolo tão evidente. As setas azuis indicam os grânulos bem formados e os imaturos com pouco ou nenhum material eletro denso em seu interior, com ilustrado na figura 59. Estas imagens foram obtidas no microscópio eletrônico de transmissão JEOL.

Figura 58 - Fotomicrografia das células provenientes da linhagem T12 fixadas com glutaraldeído e coradas com Azul da toluidina

Fonte: Fonseca, I. I. M. da (2013)

Legenda: as setas indicam os grânulos corados pelo Azul de Toluidina (fotografado em objetiva 100x)

Figura 59 - Eletromicrografia das células provenientes da linhagem T12, fixadas em resina e submetidas à análise pela microscopia eletrônica de transmissão

Fonte: Fonseca, I. I. M. da (2013)

Legenda: As setas azuis indicam os grânulos imaturos com pouco ou nenhum material eletro denso em seu interior. Na figura 59D, E e F é possível identificar a formação de figuras de mielina no interior das vesículas secretórias. As setas verdes indicam retículo endoplasmático rugoso. Em F a seta vermelha está indicando uma mitocôndria. (A - 3000 K), (B - 6000 K), (C - 10000 K), (D - 15000 K), (E - 50000 K), (F - 50000 K). Estas imagens foram obtidas no microscópio eletrônico de transmissão JEOL

O tumor T13 primeiramente foi classificado como mastocitoma de grau 2, mas seu aspecto é mais encontrado nos tumores bem diferenciados ou grau 1. Algumas células do tumor T13 apresentam a maioria de suas vesículas secretórias com muito material eletro denso em seu interior. Secção corte fino foi submetida à coloração com Azul de Toluidina para monitorar a área de corte da amostra como visualizados na figura 60. Na eletromicrografia podemos observar os grânulos com conteúdo preenchendo totalmente suas vesículas secretórias. As setas azuis indicam os grânulos bem formados e outros imaturos com pouco ou nenhum material eletro denso em seu interior, com ilustrado na figura 61. Estas imagens foram obtidas no microscópio eletrônico de transmissão JEOL.

Figura 60 - Fotomicrografia das células provenientes da linhagem T13 fixadas com glutaraldeído e coradas com Azul da toluidina

Fonte: Fonseca, I. I. M. da (2013)

Legenda: as setas indicam os grânulos corados pelo Azul de Toluidina (fotografado em objetiva 100x)

Figura 61 - Eletromicrografia das células provenientes da linhagem T13, fixadas em resina e submetidas à análise pela microscopia eletrônica de transmissão

Fonte: Fonseca, I. I. M. da (2013)

Legenda: As setas azuis indicam os grânulos imaturos com pouco ou nenhum material eletrodenso em seu interior. Na figura 61 E e F é possível identificar a formação de figuras de mielina no interior das vesículas secretórias. (A - 3000 K), (B - 6000 K), (C - 10000 K), (D - 15000 K), (E - 50000 K), (F - 50000 K). Estas imagens foram obtidas no microscópio eletrônico de transmissão JEOL

Algumas células do tumor T15 (Grau 2), apesar de ter sido diagnosticado como um tumor de grau 2 as células apresentam um grau de diferenciação similar aos encontrados para os tumores que grau 1, pois a maioria de suas vesículas secretórias apresentaram muito material eletro denso em seu interior. Secção corte fino foi submetida à coloração com Azul de Toluidina para monitorar a área de corte da amostra como visualizados na figura 62. Na eletromicrografia podemos observar os grânulos com conteúdo preenchendo totalmente suas vesículas secretórias. As setas azuis indicam os grânulos bem formados como ilustra as figura 63 E e F. Estas imagens foram obtidas no microscópio eletrônico de transmissão JEOL.

Figura 62 - Fotomicrografia das células provenientes da linhagem T15 fixadas com glutaraldeído e coradas com Azul da toluidina

Fonte: Fonseca, I. I. M. da (2013)

Legenda: as setas brancas indicam os grânulos corados pelo Azul de Toluidina (fotografado em objetiva 100x)

Figura 63 - Eletromicrografia das células provenientes da linhagem T15, fixadas em resina e submetidas à análise pela microscopia eletrônica de transmissão

Fonte: Fonseca, I. I. M. da (2013)

Legenda: As setas azuis indicam os grânulos imaturos com pouco ou nenhum material eletro denso em seu interior. A seta verde indica o retículo endoplasmático rugoso. Na figura 63 E e F é possível identificar uma vesícula com conteúdo eletro denso e o início da formação de figuras de mielina no interior desta mesma vesícula secretória. (A - 3000 K), (B - 6000 K), (C - 10000 K), (D - 15000 K), (E - 50000 K), (F - 50000 K). Estas imagens foram obtidas no microscópio eletrônico de transmissão JEOL

As células do tumor T16 (grau 2) apresentam a maioria de seus grânulos vazios ou com pouquíssimo conteúdo em seu interior, mas ainda preservam algumas características morfológicas de mastócitos, como por exemplo o núcleo bi lobulado e os grânulos secretórios com pouco material em seu interior. Secção corte fino foi submetida à coloração com Azul de Toluidina para monitorar a área de corte da amostra como visualizados na figura 64. Na eletromicrografia podemos observar uma pequena quantidade de grânulos presente no citoplasma celular, sendo que a maioria é imatura. As setas indicam os grânulos imaturos com pouco ou nenhum material eletro denso em seu interior (Figura 65). Estas imagens foram obtidas no microscópio eletrônico de transmissão JEOL.

Figura 64 - Fotomicrografia das células provenientes da linhagem T16 fixadas com glutaraldeído e coradas com Azul da toluidina

Fonte: Fonseca, I. I. M. da (2013)

Legenda: as setas indicam os grânulos corados pelo Azul de Toluidina (fotografado em objetiva 100x)

Figura 65- Eletromicrografia das células provenientes da linhagem T16, fixadas em resina e submetidas à análise pela microscopia eletrônica de transmissão

Fonte: Fonseca, I. I. M. da (2013)

Legenda: As setas azuis indicam os grânulos imaturos com pouco ou nenhum material eletrodenso em seu interior. A seta verde indica o retículo endoplasmático rugoso. A seta vermelha indica uma mitocôndria. Na figura 65 E e F é possível identificar a formação de figuras de mielina no interior das vesículas secretórias. (A - 2000 K), (B - 6000 K), (C - 10000 K), (D - 15000 K), (E - 50000 K), (F - 50000 K). Estas imagens foram obtidas no microscópio eletrônico de transmissão JEOL

Após dois meses de cultivo as células do tumor T17 (grau 1 - 2) apresentam-se de três formas distintas, uma delas se apresenta aderida mais em formato fibroblastóide que nomeamos de T17-1, a outra em formato arredondado foi nomeada como T17-2, e as outras células permaneciam em suspensão foram nomeadas como T17-suspensão. Resolvemos submeter os três tipos celulares a análise pela microscopia eletrônica para saber se de fato eram todos mastócitos. Através da microscopia eletrônica de transmissão foi possível confirmar que todas as formas eram mastócitos em cultivo. As células denominadas como T17-1 tem características de mastócitos bem diferenciados, mas apresentavam sinais de que estavam sob um estímulo de ativação, levando a uma degranulação massiva, mesmo assim foi possível observar as vesículas secretórias parcialmente preenchidas com um conteúdo granular muito bem formado como ilustramos na figura 66 e 67 D, E e F.

Figura 66 - Fotomicrografia das células provenientes da linhagem T17-1 fixadas com glutaraldeído e coradas com Azul da toluidina

Fonte: Fonseca, I. I. M. da (2013)

Legenda: as setas indicam os grânulos corados pelo Azul de Toluidina (fotografado em objetiva 100x)

Figura 67 - Eletromicrografia das células provenientes da linhagem T17-1, fixadas em resina e submetidas à análise pela microscopia eletrônica de transmissão

Fonte: Fonseca, I. I. M. da (2013)

Legenda: As setas azuis indicam as vesículas com grânulos maduros em seu interior sendo que algumas já estão sem nenhum material eletro denso em seu interior. Na figura 67 E e F é possível identificar uma formação em formato de favinhos no interior de algumas vesículas secretórias. Podemos notar também inúmeras mitocôndrias margeando uma vesícula secretória vazia em F (seta vermelha). A seta verde indica retículo endoplasmático rugoso. (A - 2000 K), (B - 6000 K), (C - 10000 K), (D - 15000 K), (E - 50000 K), (F - 75000 K). Estas imagens foram obtidas no microscópio eletrônico de transmissão JEOL

As células denominadas como T17-2 têm características de mastócitos bem diferenciados. Secção corte fino foi submetida à coloração com Azul de Toluidina para monitorar a área de corte da amostra como visualizados na figura 68. Na eletromicrografia podemos observar uma grande quantidade de grânulos presente no citoplasma celular, sendo que a maioria se encontra vazia. E seu conteúdo granular não é tão diferenciado como das células denominadas T17-1, parece haver mais atividade no citoplasma destas células, pois o número de mitocôndrias é mais representativo que nas T17-1, como ilustrado na figura 69C. Estas imagens foram obtidas no microscópio eletrônico de transmissão JEOL.

Figura 68 - Fotomicrografia das células provenientes da linhagem T17 - 2 fixadas com glutaraldeído e coradas com Azul da toluidina

Fonte: Fonseca, I. I. M. da (2013)

Legenda: as setas indicam os grânulos corados pelo Azul de Toluidina (fotografado em objetiva 100x)

Figura 69 - Eletromicrografia das células provenientes da linhagem T17-2, fixadas em resina e submetidas à análise pela microscopia eletrônica de transmissão

Fonte: Fonseca, I. I. M. da (2013)

Legenda: As setas azuis indicam as vesículas com um material eletro denso em seu interior. Na figura 69 D e E foi possível observar um conteúdo bem formado no interior das vesículas secretórias. Na figura 69 F identificamos a formação de figuras de mielina no interior das vesículas secretórias. As setas vermelhas indicam mitocôndrias e as setas verdes o retículo endoplasmático rugoso. (A - 3000 K), (B - 10000 K), (C - 15000 K), (D - 20000 K), (E - 50000 K), (F - 75000 K). Estas imagens foram obtidas no microscópio eletrônico de transmissão JEOL

As células denominadas como T17-suspensão tem características de mastócitos bem diferenciados, mas apresentavam em seu citoplasma inúmeros vacúolos. As células foram submetidas à coloração com Azul de Toluidina como ilustra a figura 70, onde observamos algumas características de degeneração. Na eletromicrografia podemos observar uma grande quantidade de grânulos presente no citoplasma celular, com conteúdo em seu interior. Parece haver mais atividade no citoplasma destas células, pois o número de mitocôndrias é mais representativo que nas T17-1, como ilustrado na figura 71. Estas imagens foram obtidas no microscópio eletrônico de transmissão JEOL.

Figura 70 - Fotomicrografia das células provenientes da linhagem T17 - suspensão fixadas com glutaraldeído e coradas com Azul da toluidina

Fonte: Fonseca, I. I. M. da (2013)

Legenda: as setas brancas indicam os vacúolos. (fotografado em objetiva 100x)

Figura 71 - Eletromicrografia das células provenientes da linhagem T17-suspensão, fixadas em resina e submetidas à análise pela microscopia eletrônica de transmissão

Fonte: Fonseca, I. I. M. da (2013)

Legenda: As setas azuis indicam algumas vesículas com grânulos maduros e outras com pouco ou nenhum material eletro denso em seu interior. Na figura 71 E a seta vermelha está indicando uma mitocôndria margeando as vesículas secretórias. (A - 3000 K), (B - 10000 K), (C - 15000 K), (D- 25000 K), (E- 50000 K), (F- 75000 K). Estas imagens foram obtidas no microscópio eletrônico de transmissão JEOL

Realizamos a coleta de outro fragmento de mastocitoma e denominamos de T18. E o submetemos imediatamente a análise por microscopia eletrônica de transmissão. São células bem diferenciadas contendo grânulos bem formados. As células foram submetidas à coloração com Azul de Toluidina como ilustra a figura 72, onde observamos vasos e estroma ainda presentes, as células apresentam uma morfologia uniforme, as setas indicam o núcleo e a presença de um nucléolo bem evidente. Na eletromicrografia podemos observar uma grande quantidade de grânulos presente no citoplasma celular, com muito conteúdo eletro denso em seu interior. Estas imagens foram obtidas no microscópio eletrônico de transmissão JEOL.

Figura 72 - Fotomicrografia das células provenientes do tumor T18 recém-coletado fixado com glutaraldeído e coradas com Azul da toluidina

Fonte: Fonseca, I. I. M. da (2013)

Legenda: A figura 72 A (40x aumento) ilustra área de estroma e um vaso sanguíneo (seta vermelha), na figura 72 B (100x aumento) a seta branca indica alguns mastócitos bem granulosos, com núcleo e nucléolos bem evidentes

Figura 73 - Eletromicrografia das células provenientes do tumor T18 recém-coletado, fixadas em resina e submetidas à análise pela microscopia eletrônica de transmissão

Fonte: Fonseca, I. I. M. da (2013)

Legenda: As setas azuis indicam as vesículas com grânulos maduros em seu interior. Na figura 73 E é possível identificar a formação de uma protrusão de uma vesícula contendo material eletro denso para dentro de outra vesícula vazia. (A - 3000 K), (B - 10000 K), (C - 15000 K), (D - 25000 K) (E - 50000 K) (F - 75000 K). Imagens obtidas no microscópio eletrônico de transmissão JEOL

5.15 IMUNOCITOQUIMICA

Na imunocitoquímica analisamos também a expressão da vimentina e da triptase, que são marcadores de células mesenquimais e de mastócitos, respectivamente. Além dos marcadores descritos neste estudo. Analisamos nas células provenientes da medula óssea, em todas as linhagens tumorais, como também em células da linhagem MCF10A, nosso controle da expressão destes marcadores epiteliais.

5.15.1 Avaliação dos mastócitos da medula óssea

Através da análise imunocitoquímica foi possível observar a marcação para E caderina triptase, c-kit e vimentina nas células de mastócitos normais provenientes do estímulo das

células tronco de medula óssea. A E-caderina foi localizada no citoplasma dos mastócitos normais (Figura 74A), para a triptase foi observada uma imunomarcaco fraca difusa no citoplasma das clulas (Figura 74B), uma imunomarcaco forte para a protena c-kit foi visualizado no citoplasma, com predominncia nas regies perinucleares e nucleares (Figura 74C), foi observado marcao citoplasmtica forte e difusa, e marcao nuclear para vimentina (Figura 74D).

Figura 74 - Fotomicrografia das clulas provenientes da medula ssea estimuladas com IL-3 e SCF, caracterizadas pela imunocitoqumica para E-caderina, triptase, c-Kit e vimentina

Fonte: Fonseca, I. I. M. da (2013)

Legenda: A figura ilustra a marcao para (A - E-caderina), (B - triptase), (C - c-kit), (D - vimentina), (Objetiva 40x)

5.15.2 Avaliao da expresso da E-caderina nas linhagens tumorais

A E-caderina foi localizada tanto no citoplasma quanto na membrana das clulas mamrias humanas (MCF10A) controle positivo da reaco (Figura 75A). Controle negativo da reaco (Figura 75B). Para os mastocitomas bem diferenciados (Grau 1) foi observado marcaes citoplasma forte e difusas (Figura 75C e D), para os tumores graduados como intermedirios (Grau 2) foi observado marcao citoplasmtica mdia com um predomnio na regio perinuclear (Figura 75E), e para os tumores graduados como indiferenciados (Grau 3) foi observado marcao citoplasmtica puntiforme com um predomnio na regio perinuclear (Figura 75F).

Figura 75 - Fotomicrografia representativa da imunocitoquímica para E-caderina nas células controle e nas diferentes linhagens celulares do mastocitoma canino

Fonte: Fonseca, I. I. M. da (2013)

Legenda: (A - MCF10A), (B - controle negativo), (C - Grau 1), (D - Grau 1), (E - Grau 2), (F - Grau 3), (Objetiva 40x)

5.15.3 Avaliação da expressão da β -catenina nas linhagens tumorais

A β -catenina foi localizada tanto na membrana quanto no citoplasma e núcleo das células mamárias humanas (MCF10A) controle positivo da reação (Figura 76A). Controle negativo da reação (Figura 76B). Nos mastocitomas bem diferenciados (Grau 1) foi observado marcações membrana, citoplasma e núcleo (Figura 76C), também foram observadas marcações concentradas em uma região do citoplasma juntamente com marcação nuclear puntiforme média (Figura 76D), para os tumores graduados como intermediários (Grau 2) foi observado marcação citoplasmática média com um predomínio na região perinuclear juntamente com a marcação nuclear forte e difusa (Figura 76E), e para os tumores graduados como indiferenciados (Grau 3) foi observado marcação citoplasmática fraca e marcação nuclear forte (Figura 76F).

Figura 76 - Fotomicrografia representativa da imunocitoquímica para β -catenina nas células controle e nas diferentes linhagens mastocitomas

Fonte: Fonseca, I. I. M. da (2013)

Legenda: (A - MCF10A), (B - controle negativo), (C - Grau 1), (D - Grau 1), (E - Grau 2), (F - Grau 3), (Objetiva 40x)

5.15.4 Avaliação da expressão da p120-catenina nas linhagens tumorais

A p120-catenina foi localizada na membrana, citoplasma e núcleo das células mamárias humanas (MCF10A) controle positivo da reação (Figura 77A). Controle negativo da reação (Figura 77B). Para as linhagens de mastocitomas bem diferenciados (Grau 1) foram observadas em algumas células marcações de membranas na região de junção célula-célula, (Figura 77C), mas a maioria das células tiveram uma marcação citoplasmática forte e difusa (Figura 77D), para os tumores graduados como intermediários (Grau 2) foi observado marcação citoplasmática forte difusa, em algumas células marcações citoplasmáticas puntiformes também foram observadas, todas as células tiveram marcação nuclear forte (Figura 77E), e para os tumores graduados como indiferenciados (Grau 3) foi observado marcação citoplasmática média e marcação nuclear forte (Figura 77F).

Figura 77 - Fotomicrografia representativa da imunocitoquímica para p120-catenina nas células controle e nas linhagens mastocitomas

Fonte: Fonseca, I. I. M. da (2013)

Legenda: (A - MCF10A), (B - controle negativo), (C - Grau 1), (D - Grau 1), (E - Grau 2), (F - Grau 3), (Objetiva 40x)

5.15.5 Avaliação da expressão do PTEN nas linhagens tumorais

Observamos marcações citoplasmáticas fortes e difusas no citoplasma das células mamárias humanas (MCF10A) para a proteína PTEN, controle positivo da reação (Figura 78A). Controle negativo da reação (Figura 78B). Para as linhagens de mastocitomas bem diferenciados (Grau 1) foram observadas em algumas células marcações de membranas na região de junção célula-célula, (Figura 78C), mas a maioria das células tiveram uma marcação citoplasmática média na região perinuclear (Figura 78D), para os tumores graduados como intermediários (Grau 2) foi observado marcação citoplasmática forte difusa, em algumas células com marcações nucleares (Figura 78E), e para os tumores graduados como indiferenciados (Grau 3) foi observado marcação citoplasmática média e difusa juntamente com a marcação nuclear média (Figura 78F).

Figura 78 - Fotomicrografia representativa da imunocitoquímica para PTEN nas células controle e nas linhagens mastocitomas

Fonte: Fonseca, I. I. M. da (2013)

Legenda: (A - MCF10A), (B - controle negativo), (C - Grau 1), (D - Grau 1), (E - Grau 2), (F - Grau 3), (Objetiva 40x)

5.15.6 Avaliação da expressão do c-Kit nas linhagens tumorais

O c-kit foi localizado no citoplasma das células mamárias humanas (MCF10A) a qual serviu como nosso controle positivo da reação (Figura 79A). Controle negativo da reação (Figura 79B). Para as linhagens de mastocitomas bem diferenciados (Grau 1) foram observadas em algumas células marcações de membranas na região de junção célula-célula, (Figura 79C), mas a maioria das células tiveram uma marcação citoplasmática forte na região perinuclear (Figura 79D), para os tumores graduados como intermediários (Grau 2) foi observado marcação citoplasmática forte difusa (Figura 79E), e para os tumores graduados como indiferenciados (Grau 3) foi observado marcação forte por todo citoplasma e uma marcação nuclear forte em algumas células (Figura 79F).

Figura 79 – Fotomicrografia representativa da imunocitoquímica para c-kit nas células controle e nas linhagens mastocitomas

Fonte: Fonseca, I. I. M. da (2013)

Legenda: (A - MCF10A), (B - controle negativo), (C - Grau 1), (D - Grau 1), (E - Grau 2), (F - Grau 3), (Objetiva 40x)

5.15.7 Avaliação da expressão da Conexina 32 nas linhagens tumorais

A conexina 32 (Cx32) foi localizada nas células de mastocitomas bem diferenciados (Grau 1) dispersa no citoplasma (Figura 80A). Para os tumores graduados como intermediários (Grau 2) foi observado marcação citoplasmática forte na região perinuclear (Figura 80B), e para os tumores graduados como indiferenciados (Grau 3) foi observado uma redução no número e na intensidade das marcação citoplasmática (Figura 80C). Controle negativo da reação (Figura 80D).

Figura 80 - Fotomicrografia representativa da imunocitoquímica para Cx32 nas diferentes linhagens mastocitomas

Fonte: Fonseca, I. I. M. da (2013)

Legenda: (A - Grau 1), (B - Grau 2), (C - Grau 3), (D - controle negativo), (Objetiva 40x)

5.15.8 Avaliação da expressão da Conexina 43 nas linhagens tumorais

A Conexina 43 foi localizada na membrana, citoplasma das células mamárias humanas (MCF10A) a qual serviu como nosso controle positivo da reação (Figura 80A). Controle negativo da reação (Figura 81B). Para as linhagens de mastocitomas bem diferenciados (Grau 1) foram observadas marcações de membranas na região de junção célula-célula, e marcação citoplasmática fraca (Figura 81C), mas a maioria das células tiveram uma marcação forte e puntiforme dispersa por todo citoplasma das células (Figura 81D), para os tumores graduados como intermediários (Grau 2) foi observado marcação citoplasmática forte difusa concentrada na região próxima do núcleo (Figura 81E), e para os tumores graduados como indiferenciados (Grau 3) foi observado uma redução no número das marcações citoplasmáticas as quais se apresentaram dispersas por todo citoplasma (Figura 81F).

Figura 81 - Fotomicrografia representativa da imunocitoquímica para Cx43 nas células controle e nas linhagens mastocitomas

Fonte: Fonseca, I. I. M. da (2013)

Legenda: (A - MCF10A), (B - controle negativo), (C - Grau 1), (D - Grau 1), (E - Grau 2), (F - Grau 3), (Objetiva 40x)

5.15.9 Avaliação da expressão da α -catenina nas linhagens tumorais

A α -catenina foi localizada nas células de mastocitomas bem diferenciados (Grau 1) na região interna da membrana plasmática e em todo o citoplasma. Observamos também uma marcação nuclear fraca (Figura 82A). As células dos tumores graduados como intermediários (Grau 2) tiveram uma marcação citoplasmática forte na região perinuclear (Figura 82B). Houve uma redução na marcação citoplasmática nas células dos tumores indiferenciados (Figura 82C), controle negativo da reação (Figura 82D).

Figura 82 - Fotomicrografia representativa da imunocitoquímica para α -catenina nas diferentes linhagens mastocitomas

Fonte: Fonseca, I. I. M. da (2013)

Legenda: (A - Grau 1), (B - Grau 2), (C - Grau 3), (D - controle negativo), (Objetiva 40x)

5.15.10 Avaliação da expressão da MMP-7 nas linhagens tumorais

A MMP-7 foi localizada na membrana e citoplasma das células da linhagem dos mastocitomas bem diferenciados (Grau 1) (Figura 83A). As células dos tumores graduados como intermediários (Grau 2) tiveram uma marcação citoplasmática forte na região perinuclear (Figura 83B). Houve uma redução na marcação citoplasmática nas células dos tumores indiferenciados (Figura 83C), controle negativo da reação (Figura 83D).

Figura 83 - Fotomicrografia representativa da imunocitoquímica para MMP-7 nas diferentes linhagens mastocitomas

Fonte: Fonseca, I. I. M. da (2013)

Legenda: (A - Grau 1), (B - Grau 2), (C - Grau 3), (D - controle negativo), (Objetiva 40x)

5.15.11 Avaliação da expressão da Triptase nas linhagens tumorais

A imunomarcção da triptase foi localizada no citoplasma de algumas células das linhagens de mastocitomas bem diferenciados (Grau 1) (Figura 84A). As células dos tumores graduados como intermediários (Grau 2) tiveram uma redução desta marcação citoplasmática (Figura 84B). Nas células das linhagens dos tumores indiferenciados a marcação citoplasmática foi escassa e se apresentou mais perinuclear (Figura 84C), controle negativo da reação (Figura 84D).

Figura 84 - Fotomicrografia da imunocitoquímica para triptase nas diferentes linhagens mastocitomas

Fonte: Fonseca, I. I. M. da (2013)

Legenda: (A - Grau 1), (B - Grau 2), (C - Grau 3), (D - controle negativo), (Objetiva 40x)

5.15.12 Avaliação da expressão da Vimentina nas linhagens tumorais

Uma imunomarcção forte para vimentina foi observada no citoplasma e núcleo de todas as células das linhagens de mastocitomas bem diferenciados (Grau 1) (Figura 85A). As células dos tumores graduados como intermediários (Grau 2) tiveram uma redução desta marcação citoplasmática e nuclear (Figura 85B). Nas células das linhagens dos tumores indiferenciados a marcação citoplasmática e nuclear foi similar aos tumores de grau 2 (Figura 85C), controle negativo da reação (Figura 85D).

Figura 85 - Fotomicrografia da imunocitoquímica para vimentina nas diferentes linhagens mastocitomas

Fonte: Fonseca, I. I. M. da (2013)

Legenda: (A - Grau 1), (B - Grau 2), (C - Grau 3), (D - controle negativo), (Objetiva 40x)

5.16 IMUNOFLUORESCENCIA

Realizamos uma dupla marcação pela imunofluorescência dos seguintes marcadores moleculares: E-caderina, β -catenina, α -catenina, p120-catenina, MMP-7, PTEN, c-Kit, Cx32, Cx43 e a triptase, nas células da linhagem MCF10A e nas linhagens de mastocitoma estabelecidas por nós. Para o complexo E-caderina/cateninas e a triptase que são monoclonais a marcação do anticorpo foi verde e para o PTEN que é policlonal a marcação foi em vermelho. Em segundo grupo de dupla marcação, usamos a E-caderina monoclonal com marcação verde e MMP-7, PTEN, c-Kit, Cx32, Cx43 que são policlonais com marcação em vermelho.

5.16.1 Dupla marcação pela imunofluorescência para E-caderina e PTEN

Após o cultivo dos mastócitos tumorais, realizamos um ensaio de imunofluorescência com dupla marcação para E-caderina (verde) e PTEN (vermelho).

Os padrões de marcação e a intensidade tanto para a E-caderina como para o PTEN, tiveram variação nos diferentes graus dos mastocitomas em cultivo. Observamos a imunomarcação para a E-caderina na membrana de algumas células da linhagem MCF10A,

nosso controle positivo, (Figura 86A) Observamos imunomarcção para E-caderina na membrana e citoplasma de células das linhagens de mastocitomas de grau 1, (Figura 86D) e somente no citoplasma das células das linhagens dos tumores graduados como 2 e 3 (Figura 86G e J).

Observamos a imunomarcção para a PTEN no núcleo e citoplasma das células da linhagem MCF10A, nosso controle positivo, (Figura 86B). Observamos imunomarcção para E-caderina no citoplasma e núcleo das células das linhagens de mastocitomas de grau 1, (Figura 86E) e núcleo e citoplasma das células das linhagens dos tumores graduados como 2 (Figura 86H), e somente no núcleo das células das linhagens de tumores de grau 3, (Figura 86K). As figuras 86C, F, I e L ilustram as colorações nucleares com DAPI.

Figura 86 - Fotomicrografia representativa da dupla marcação pela imunofluorescência para E-caderina e PTEN nas células controle MCF10A e nas diferentes linhagens mastocitoma

Fonte: Fonseca, I. I. M. da (2013)

Legenda: (MCF10A figuras 86 A, B e C), (Células Mastocitoma de Grau 1 figura 86 D, E e F), (Células Mastocitoma de Grau 2 figura 86 G, H e I), (Células Mastocitoma de Grau 3 figura 86 J, K e L), (Objetiva 40x)

5.16.2 Dupla marcação pela imunofluorescência para β -catenina e PTEN

Após o cultivo dos mastócitos tumorais, realizamos um ensaio de imunofluorescência com dupla marcação para β -catenina (verde) e PTEN (vermelho). Os padrões de marcação e a intensidade, como a localização variaram nas diferentes linhagens celulares tanto para a β -catenina como para o PTEN.

Observamos a imunomarcação para a β -catenina no citoplasma de algumas células da linhagem MCF10A, nosso controle positivo, (Figura 87A). Observamos imunomarcação para β -catenina na membrana, dispersa no citoplasma e em algumas células de mastocitomas de grau 1 e 2 apresentaram uma marcação perinuclear forte (Figura 87D e G) respectivamente. Nas linhagens dos tumores graduados como 3 além das marcações na membrana e citoplasma observamos também marcações nucleares para a β -catenina (Figura 87G e J).

Para o PTEN observamos a imunomarcação no citoplasma e núcleo das células da linhagem MCF10A, nosso controle positivo, (Figura 87B). Observamos imunomarcação para PTEN no citoplasma e núcleo das células das linhagens de mastocitomas de grau 1, (Figura 87E) e uma marcação de intensidade média no núcleo das células das linhagens dos tumores graduados como 2 (Figura 87H), e uma marcação forte no núcleo das células das linhagens de tumores de grau 3, (Figura 87K). As figuras 87C, F, I e L ilustram as colorações nucleares com DAPI.

Figura 87 - Fotomicrografia representativa da dupla marcação pela imunofluorescência para β -catenina e PTEN nas células controle MCF10A e nas diferentes linhagens mastocitoma

Fonte: Fonseca, I. I. M. da (2013)

Legenda: (MCF10A figuras 87A, B e C), (Células Mastocitoma de Grau 1 figura 87D, E e F), (Células Mastocitoma de Grau 2 figura 87G, H e I), (Células Mastocitoma de Grau 3 figura 87J, K e L), (Objetiva 40x)

5.16.3 Dupla marcação pela imunofluorescência para α -catenina e PTEN

Após o cultivo dos mastócitos tumorais, realizamos um ensaio de imunofluorescência com dupla marcação para α -catenina (verde) e PTEN (vermelho).

Os padrões de marcação e a intensidade, como a localização variaram nas diferentes linhagens celulares tanto para a α -catenina como para o PTEN.

Observamos a imunomarcação para a α -catenina na membrana e citoplasma forte em algumas células da linhagem MCF10A, nosso controle positivo, (Figura 88A). Observamos nas linhagens de mastocitomas de grau 1 a imunomarcação para α -catenina na membrana de algumas células na região de contato célula-célula, nestas mesmas células também foi observado marcação nuclear forte para α -catenina (Figura 88D). Nas linhagens dos tumores graduados como 2 observamos marcações pontuais fracas na membrana e citoplasma para a α -catenina (Figura 88G). Nas linhagens dos tumores graduados como 3 observamos marcações pontuais fracas para α -catenina no citoplasma das células (Figura 88J).

Para o PTEN observamos a imunomarcação fraca no citoplasma e núcleo das células da linhagem MCF10A, nosso controle positivo, (Figura 88B). Observamos imunomarcação nuclear forte para *PTEN* nas células das linhagens de mastocitomas de grau 1, (Figura 88E) e uma imunomarcação de intensidade média no núcleo e citoplasma das células das linhagens dos tumores graduados como 2 (Figura 88H), e uma marcação média no núcleo das células das linhagens de tumores de grau 3, (Figura 88K). As figuras 88C, F, I e L ilustram as colorações nucleares com DAPI.

Figura 88 - Fotomicrografia representativa da dupla marcação pela imunofluorescência para α -catenina e PTEN nas células controle MCF10A e nas diferentes linhagens mastocitoma

Fonte: Fonseca, I. I. M. da (2013)

Legenda: (MCF10A figuras 88A, B e C), (Células Mastocitoma de Grau 1 figura 88D, E e F), (Células Mastocitoma de Grau 2 figura 88G, H e I), (Células Mastocitoma de Grau 3 figura 88J, K e L), (Objetiva 40x)

5.16.4 Dupla marcação pela imunofluorescência para p120-catenina e PTEN

Após o cultivo dos mastócitos tumorais, realizamos um ensaio de imunofluorescência com dupla marcação para p120-catenina (verde) e PTEN (vermelho). Os padrões de marcação e a intensidade, como a localização variaram nas diferentes linhagens celulares tanto para a p120 catenina como para o PTEN.

Observamos um predomínio de imunomarcação forte na membrana nas células da linhagem MCF10A para a p120-catenina, nosso controle positivo, (Figura 89A). Observamos nas linhagens de mastocitomas de grau 1 uma imunomarcação forte para p120-catenina na membrana de algumas células na região de contato célula-célula, nestas mesmas células também foi observado uma marcação citoplasmática forte e uma marcação puntiforme nuclear para p120-catenina (Figura 89D). Nas linhagens dos tumores graduados como 2 observamos imunomarcações na membrana das células e uma redução das imunomarcações citoplasma mas com um aumento nas marcações nucleares para p120-catenina (Figura 89G). Nas linhagens dos tumores graduados como 3 observamos uma redução na intensidade das imunomarcação de membrana e citoplasma e um aumento nas imunomarcações nucleares para p120-catenina (Figura 89J).

Para o PTEN observamos a imunomarcação forte no citoplasma e núcleo das células da linhagem MCF10A, nosso controle positivo, (Figura 89B). Observamos imunomarcação citoplasmática e nuclear média para PTEN nas células das linhagens de mastocitomas de grau 1, (Figura 89E) e uma imunomarcação de intensidade fraca no núcleo e citoplasma das células das linhagens dos tumores graduados como 2, com algumas células tendo esta marcação mais forte (Figura 89H), houve uma redução na intensidade das imunomarcação citoplasmática mas houve um aumento das marcações nucleares nas células das linhagens de tumores de grau 3, (Figura 89K). As figuras 89C, F, I e L ilustram as colorações nucleares com DAPI.

Figura 89- Fotomicrografia representativa da dupla marcação pela imunofluorescência para p120-catenina e PTEN nas células controle MCF10A e nas diferentes linhagens mastocitomas

Fonte: Fonseca, I. I. M. da (2013)

Legenda: (MCF10A figuras 89A, B e C), (Células Mastocitoma de Grau 1 figura 89D, E e F), (Células astrocitoma de Grau 2 figura 89G, H e I), (Células Mastocitoma de Grau 3 figura 89J, K e L), (Objetiva 40x)

5.16.5 Dupla marcação pela imunofluorescência para E-caderina e Conexina 43

Após o cultivo dos mastócitos tumorais, realizamos um ensaio de imunofluorescência com dupla marcação para E-caderina (verde) e Cx43 (vermelho). Os padrões de marcação, intensidade e a localização variaram nas diferentes linhagens celulares tanto para a E-caderina como para a Cx43.

Observamos um predomínio de imunomarcação forte na membrana nas células da linhagem MCF10A para a E-caderina, nosso controle positivo, (Figura 90A). Nas linhagens de mastocitomas de grau 1 observamos uma imunomarcação forte para E-caderina no citoplasma das células (Figura 90D). Nas linhagens dos tumores graduados como 2 observamos imunomarcações citoplasmáticas média para E-caderina (Figura 90G). Nas linhagens dos tumores graduados como 3 observamos uma imunomarcação fraca para a E-caderina (Figura 90J).

Para a Cx43 observamos a imunomarcação média difusa no citoplasma das células da linhagem MCF10A, nosso controle positivo, (Figura 90B). Observamos imunomarcação na membrana na região de contato célula-célula juntamente com a marcação nuclear e citoplasmática forte para a Cx43 nas células das linhagens de mastocitomas de grau 1, (Figura 90E), observamos uma imunomarcação de intensidade forte no núcleo, marcações pontuais na membrana e redução da marcação citoplasmática nas células das linhagens dos tumores graduados como 2 (Figura 90H), houve uma redução na intensidade das imunomarcação nucleares e um aumento das marcações citoplasmáticas, as marcações membrana não se alteraram nas células das linhagens de tumores de grau 3, (Figura 90K). As figuras 90C, F, I e L ilustram as colorações nucleares com DAPI.

Figura 90 - Fotomicrografia representativa da dupla marcação pela imunofluorescência para E-caderina e Cx43 nas células controle MCF10A e nas diferentes linhagens mastocitoma

Fonte: Fonseca, I. I. M. da (2013)

Legenda: (MCF10A figuras 90A, B e C), (Células Mastocitoma de Grau 1 figura 90D, E e F), (Células Mastocitoma de Grau 2 figura 90G, H e I), (Células Mastocitoma de Grau 3 figura 90J, K e L), (Objetiva 40x)

5.16.6 Dupla marcação pela imunofluorescência para E-caderina e c-kit

Após o cultivo dos mastócitos tumorais, realizamos um ensaio de imunofluorescência com dupla marcação para E-caderina (verde) e c-kit (vermelho). Os padrões de marcação, intensidade e localização variaram nas diferentes linhagens celulares tanto para a E-caderina como para o c-kit.

Observamos um predomínio de imunomarcação forte na membrana nas células da linhagem MCF10A para a E-caderina, nosso controle positivo, (Figura 91A). Observamos nas linhagens de mastocitomas de grau 1 uma imunomarcação forte para E-caderina no citoplasma das células (Figura 91D). Nas linhagens dos tumores graduados como 2 observamos imunomarcação citoplasmática fraca para E-caderina (Figura 91G). Nas linhagens dos tumores graduados como 3 observamos imunomarcação fraca para a E-caderina (Figura 91J).

Para o c-kit foi observado uma imunomarcação média difusa no citoplasma das células da linhagem MCF10A, nosso controle positivo, (Figura 91B). Observamos imunomarcação citoplasmática e nuclear média para o c-kit nas células das linhagens de mastocitomas de grau 1, (Figura 91E), observamos uma imunomarcação de intensidade média no citoplasma e núcleo, nas células das linhagens dos tumores graduados como 2 (Figura 91H), houve uma redução na intensidade das imunomarcações citoplasmáticas e um aumento das imunomarcações nucleares para o c-kit nas linhagens de tumores de grau 3, (Figura 91K). As figuras 91C, F, I e L ilustram as colorações nucleares com DAPI.

Figura 91 - Fotomicrografia representativa da dupla marcação pela imunofluorescência para E-caderina e c-kit nas células controle MCF10A e nas diferentes linhagens mastocitomas

Fonte: Fonseca, I. I. M. da (2013)

Legenda: (MCF10A figuras 91A, B e C), (Células Mastocitoma de Grau 1 figura 91D, E e F), (Células Mastocitoma de Grau 2 figura 91G, H e I), (Células Mastocitoma de Grau 3 figura 91J, K e L), (Objetiva 40x)

5.16.7 Dupla marcação pela imunofluorescência para E-caderina e MMP-7

Após o cultivo dos mastócitos tumorais, realizamos um ensaio de imunofluorescência com dupla marcação para E-caderina (verde) e MMP-7 (vermelho). Os padrões de marcação, intensidade e a localização variaram nas diferentes linhagens celulares tanto para a E-caderina como para a MMP-7.

Observamos um predomínio de imunomarcação forte na membrana e citoplasma, também foi observada uma marcação nuclear em algumas células da linhagem MCF10A para a E-caderina, nosso controle positivo, (Figura 92A). Observamos nas linhagens de mastocitomas de grau 1 uma imunomarcação citoplasmática forte para E-caderina em algumas células mas o predomínio é de marcações fracas (Figura 92D). Nas linhagens dos tumores graduados como 2 observamos imunomarcações citoplasmáticas forte para E-caderina em algumas células, mas o predomínio é de marcações fracas (Figura 92G). Nas linhagens dos tumores graduados como 3 observamos imunomarcação fraca ou ausentes para a E-caderina (Figura 92J).

Para a MMP-7 foi observado um predomínio de imunomarcação nuclear nas células da linhagem MCF10A, nosso controle positivo, (Figura 92B). Observamos imunomarcação forte e puntiforme no citoplasma e nuclear forte para a MMP-7 nas células das linhagens de mastocitomas de grau 1, (Figura 92E), observamos uma redução da imunomarcação citoplasmática e nuclear para a MMP-7 nas células das linhagens dos tumores graduados como 2 (Figura 92H), ausência de marcação citoplasmática e redução das marcações nucleares para a MMP-7 nas linhagens de tumores de grau 3, (Figura 92K). As figuras 92C, F, I e L ilustram as colorações nucleares com DAPI.

Figura 92 - Fotomicrografia representativa da dupla marcação pela imunofluorescência para E-caderina e MMP-7 nas células controle MCF10A e nas diferentes linhagens mastocitomas

Fonte: Fonseca, I. I. M. da (2013)

Legenda: (MCF10A figuras 92A, B e C), (Células Mastocitoma de Grau 1 figura 92D, E e F), (Células Mastocitoma de Grau 2 figura 92G, H e I), (Células Mastocitoma de Grau 3 figura 92J, K e L), (Objetiva 40x)

5.16.8 Dupla marcação pela imunofluorescência para E-caderina e Cx32

Após o cultivo dos mastócitos tumorais, realizamos um ensaio de imunofluorescência com dupla marcação para E-caderina (verde) e Cx32 (vermelho). Os padrões de marcação, intensidade e a localização variaram nas diferentes linhagens celulares tanto para a E-caderina como para o Cx32.

Observamos uma imunomarcação citoplasmática fraca nas células da linhagem MCF10A para a E-caderina, nosso controle positivo, (Figura 93A). Observamos nas linhagens de mastocitomas de grau 1 uma imunomarcação citoplasmática perinuclear forte para E-caderina (Figura 93D). Nas linhagens dos tumores graduados como 2 observamos imunomarcações citoplasmáticas fracas para E-caderina (Figura 93G). Nas linhagens dos tumores graduados como 3 observamos imunomarcação fraca ou ausentes, em alguns núcleos foi possível observar marcação puntiforme para a E-caderina (Figura 93J).

Para a Cx32 foi observado uma imunomarcação forte difusa no citoplasma e núcleo das células da linhagem MCF10A, nosso controle positivo, (Figura 93B). Observamos imunomarcação forte e puntiforme no citoplasma e núcleo para a Cx32 nas células das linhagens de mastocitomas de grau 1, (Figura 93E), observamos uma redução da imunomarcação citoplasmática e nuclear para a Cx32, mas algumas marcações de membrana foram vistas nas células das linhagens dos tumores graduados como 2 (Figura 93H), ausência de marcação citoplasmática e aumento das marcações nucleares para a Cx32 nas linhagens de tumores de grau 3, (Figura 93K). As figuras 93C, F, I e L ilustram as colorações nucleares com DAPI.

Figura 93 - Fotomicrografia representativa da dupla marcação pela imunofluorescência para E-caderina e Cx32 nas células controle MCF10A e nas diferentes linhagens mastocitomas

Fonte: Fonseca, I. I. M. da (2013)

Legenda: (MCF10A figuras 93A, B e C), (Células Mastocitoma de Grau 1 figura 93D, E e F), (Células Mastocitoma de Grau 2 figura 93G, H e I), (Células Mastocitoma de Grau 3 figura 93J, K e L) (Objetiva 40x)

5.16.9 Dupla marcação pela imunofluorescência para Triptase e PTEN

Após o cultivo dos mastócitos tumorais, realizamos um ensaio de imunofluorescência com dupla marcação para triptase (verde) e PTEN (vermelho). Os padrões de marcação, intensidade e a localização variaram nas diferentes linhagens celulares tanto para a triptase como para o PTEN.

Observamos nas linhagens de mastocitomas de grau 1 uma imunomarcação puntiforme na membrana e núcleo e no citoplasma marcação fraca para triptase em algumas (Figura 94A). Nas linhagens dos tumores graduados como 2 observamos imunomarcações médias difusas no citoplasma e um aumento da marcação nuclear para triptase (Figura 94D). Nas linhagens dos tumores graduados como 3 observamos um aumento na imunomarcação nuclear e uma redução da citoplasmática para a triptase (Figura 94G).

Para o PTEN foi observado uma imunomarcação forte e puntiforme no citoplasma e núcleo das células das linhagens de mastocitomas de grau 1 (Figura 94B). Observamos uma redução na imunomarcação citoplasmática e nuclear para o PTEN nas células das linhagens dos tumores graduados como 2 (Figura 94E), observamos uma redução da imunomarcação citoplasmática e um aumento da marcação nuclear para o PTEN nas linhagens de tumores de grau 3, (Figura 94H). As figuras 94C, F e I ilustram as colorações nucleares com DAPI.

Figura 94 - Fotomicrografia representativa da dupla marcação pela imunofluorescência para Triptase e PTEN e nas diferentes linhagens mastocitomas

Fonte: Fonseca, I. I. M. da (2013)

Legenda: (MCF10A figuras 94A, B e C), (Células Mastocitoma de Grau 1 figura 94D, E e F), (Células Mastocitoma de Grau 2 figura 94G, H e I), (Células Mastocitoma de Grau 3 figura 94J, K e L) (Objetiva 40x)

5.17 ANÁLISE MUTACIONAL DO GENE C-KIT

A presença de mutações está significativamente associada a um grau histopatológico mais alto em mastocitomas, e estes pacientes com estas mutações, possuem um prognóstico pior se comparados com os animais que não possuem as mutações (ZEMKE et al., 2002;

ZAVODAVSKAYA et al., 2004; WEBSTER et al., 2006a; WEBSTER; KIUPEL; YUZBASIYAN, 2006b).

5.17.1 Amplificação do Gene c-kit pela Reação em Cadeia Polimerase (PCR)

O DNA genômico das 10 linhagens tumorais foi submetido à amplificação pela reação em cadeia polimerase (PCR) para o éxon 8, 10 - 11 e 17 do gene c-kit. Após a amplificação os produtos da PCR foram carregados em gel de agarose 2% juntamente com o reagente de alta afinidade pelo DNA o “Blue Green”, e então submetidos a uma eletroforese de 60 minutos a 80 V, ao final da eletroforese os géis foram fotografados.

Para amplificar o éxon 8 foi utilizado primers que reconheciam a região intrônica do gene, então o primer *foward* foi desenhado no final do intron 7 e *reverse* foi desenhado no começo do intron 8. Na figura 95 ilustramos os produtos amplificados para o éxon 8 do gene c-kit, os amplicons tem 300 pares de bases (pb).

Figura 95 – Fotodocumentação em gel de agarose do produto de PCR para o éxon 8 do gene c-kit

Fonte: Fonseca, I. I. M. da (2013)

Legenda: Padrão de peso molecular (PM); linhagem do tumor número 5 (T05); linhagem do tumor número 6 (T06); linhagem do tumor número 7 (T07); linhagem do tumor número 10 (T10); linhagem do tumor número 12 (T12); linhagem do tumor número 15 (T15); linhagem do tumor número 16 (T16); linhagem do tumor número 17 (T17); linhagem do tumor número 18 (T18); CN (controle negativo)

Para amplificar o éxon 10 e 11 simultaneamente foi utilizado primers que reconheciam a região intrônica do gene, então o primer *foward* foi desenhado no final do intron 9 e *reverse* foi desenhado no começo do intron 11. Na figura 96 ilustramos os produtos amplificados para o éxon 10-11 do gene c-kit, o amplicon tem 599 pares de bases.

Figura 96 - Fotodocumentação em gel de agarose do produto de PCR para os éxons 10 - 11 do gene c-kit

Fonte: Fonseca, I. I. M. da (2013)

Legenda: Padrão de peso molecular (PM); linhagem do tumor número 5 (T05); linhagem do tumor número 6 (T06); linhagem do tumor número 7 (T07); linhagem do tumor número 10 (T10); linhagem do tumor número 12 (T12); linhagem do tumor número 15 (T15); linhagem do tumor número 16 (T16); linhagem do tumor número 17 (T17); linhagem do tumor número 18 (T18); CN (controle negativo)

Para amplificar o éxon 17 foi utilizado um conjunto de primers que reconheciam a região intrônica do gene, então o primer *forward* foi desenhado no final do intron 16 e o primer *reverse* foi desenhado no começo do intron 17. Na figura 97 ilustramos os produtos amplificados para o éxon 17 do gene c-kit, o amplicon tem 297 pares de bases.

Figura 97 - Fotodocumentação em gel de agarose do produto de PCR para o éxon 17 do gene c-kit

Fonte: Fonseca, I. I. M. da (2013)

Legenda: Padrão de peso molecular (PM); linhagem do tumor número 5 (T05); linhagem do tumor número 6 (T06); linhagem do tumor número 7 (T07); linhagem do tumor número 10 (T10); linhagem do tumor número 12 (T12); linhagem do tumor número 15 (T15); linhagem do tumor número 16 (T16); linhagem do tumor número 17 (T17); linhagem do tumor número 18 (T18); CN (controle negativo)

5.17.2 Sequenciamento gênico do gene Gene c-kit

Após a reação de sequenciamento, as amostras foram analisadas no sequenciador ABI 3700, o qual nos forneceu a leitura da sequência das bases nucleotídicas gerando um eletroferograma. Estas sequências foram comparadas no NCBI com as bases depositadas sob o número AF044249 que corresponde ao RNA mensageiro do gene c-kit canino, o qual está representado na figura 98.

Figura 98 – Sequência nucleotídica do RNA mensageiro do gene c-kit canino e a sequência de aminoácidos deduzida

Fonte: Adaptado de Yarden et al (1987) por Fonseca, I. I. M. da (2013)

Legenda: (A) nucleotídeo Adenina; (T) nucleotídeo Timina; (C) nucleotídeo Citosina; (G) nucleotídeo Guanina.

A seta vermelha indica a inserção de um G no códon 414. As caixas vermelhas indicam as alterações encontradas neste trabalho. O círculo vermelho indica o início do éxon 11. As demais anotações foram marcadas por Yarden et al (1987), que compreendem os achados em seu estudo, as cisteínas do domínio extracelulares previstas estão sombreadas (o primeiro encontra-se na Cys do peptídeo de sinal). Resíduos de Asn em locais de consensos de glicosilação estão marcados com asteriscos. O domínio transmembrana previsto está sombreado. Resíduos afetados pelas mutações missense e exclusões

relatadas estão dentro de caixas-pretas. Um peptídeo repetido na sequência inserida em células de mastocitoma C1 e C2 está sublinhado. O local da inserção de nucleotídeos 48bp C1/C2 é mostrado por acento circunflexo aa (^). A sequência normal de cDNA do c-kit de cão que está depositado no banco de dados GenBank

5.17.2.1 Análise do exon 8 do gene c-kit

Utilizando o programa BLAST de alinhamento de duas sequências pelo endereço http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch&PROG_DEF=blastn&BLAST_PROG_DEF=megaBlast&BLAST_SPEC=blast2seq, realizamos a análise do éxon 8 do gene c-kit, que está localizado no domínio extracelular da proteína madura (Figura 99) e comparamos o produto sequenciado do exon 8 com a sequência nucleotídica do RNA mensageiro deduzida do gene c-kit canino, a qual esta depositada no Gene Bank NCBI sob o número AF044249 e observamos o reconhecimento e alinhamento perfeito do éxon 8 na região do domínio extracelular do gene c-kit, como ilustrado na figura 101.

Figura 99 – Representação esquemática da proteína c-kit, indicando a localização do éxon 8 na região do domínio extracelular

Fonte: Fonseca, I. I. M. da (2013)

Legenda: TM = transmembrana, MP = membrana proximal

O produto gerado pelo sequenciamento do éxon 8 esta ilustrado na figura 100. E tem uma parte do intron sete e oito. Na figura abaixo as bases em azul apontam o início da leitura éxon 8, e as em vermelho apontam as diferenças encontradas no sequenciamento deste éxon.

Figura 100 – Sequência nucleotídica do produto gerado pelos primers do exon 8 do gene c-kit, utilizando o DNA genômico

```

ATTCTCAGTCTCTTCAACTCAGAAGGTTCTAAGGATTTGGAAACCGTGGCGGGGAGCCT
TGGTGAGGTGTTCCAGCAGTCTGACCTATGGCCATTTCTCTTTTCCTACAGCAAAACCAG
AAATCCTGACTCATGAAAGTCTCACRAATGGCATGCTCCAGTGTGTGGTTGCAGGAT
TCCCAGAGCCCGCAGTAGATTGGTATTTCTGTCCAGGAGCTGAGCAGAGGTGAGAGG
ATTATTTTGGCTACTACTTAATGTGCACGAGGGAAGGACAGCAGGGTAGTTGAACCTCAGA
TAGGA
  
```

Fonte: Fonseca, I. I. M. da (2013)

Legenda: (A) nucleotídeo Adenina; (T) nucleotídeo Timina; (C) nucleotídeo Citosina; (G) nucleotídeo Guanina

Figura 101 – A figura ilustra a região de reconhecimento e alinhamento do éxon 8 no gene c-kit, o qual se alinhou perfeitamente na região do domínio extracelular do gene

Fonte: Fonseca, I. I. M. da (2013)

Após o alinhamento o programa apresenta as sequências pareadas representadas na figura 102, e podemos notar que logo no início existe uma base em nosso produto que não teve complementaridade com a sequência depositada no NCBI, gerando um “gap” (lacuna), pois havia em nossa sequência uma inserção de uma Guanina (G) em vermelho, continuando a comparação dos nucleotídeos observamos outra região onde não houve o pareamento porque as bases não eram iguais, onde devia ter uma Guanina em nossa amostra tinha uma Adenina (A) apontada em vermelho, gerando assim o aparecimento deste R que representa o aminoácido gerado por esta inversão de bases. Mais a frente foi localizada outra base em que não havia o pareamento, onde deveria ter uma Guanina a nossa amostra apresentou uma Adenina.

Figura 102 – A figura ilustra o resultado do pareamento de bases do RNA mensageiro e o produto do exon 8 do gene c-kit pelo programa BLAST

Query	1266	ACA-CAAAACCAGAAATCCTGACTCATGAAAGTCTCACGAATGGCATGCTCCAGTGTGTG	1324
Sbjct	108	ACAGCAAACCAGAAATCCTGACTCATGAAAGTCTCACAAATGGCATGCTCCAGTGTGTG	167
Query	1325	GTTGCAGGATTCCCAGAGCCCGCAGTAGGTTGGTATTTCTGTCCAGGAGCTGAGCAGAG	1383
Sbjct	168	GTTGCAGGATTCCCAGAGCCCGCAGTAGATTGGTATTTCTGTCCAGGAGCTGAGCAGAG	226

Fonte: Fonseca, I. I. M. da (2013)

Legenda: (A) nucleotídeo Adenina; (T) nucleotídeo Timina; (C) nucleotídeo Citosina; (G) nucleotídeo Guanina

Na figura 103 apresenta um esquema das mudanças de sequência com a inserção de uma a guanina no códon 414, e a região de complementariedade dos nucleotídeos da sequência normal do RNAm do gene c-kit e o pareamento da sequência do produto do exon 8. A diferença no pareamento das sequências esta ilustrada em vermelho e a base normal que foi substituída esta em azul. A inserção de uma Guanina ocorreu nos dois alelos do gene c-kit no códon 414, pois o eletroferograma esta sem ruído e limpo após a inserção do G, figura 104. A inserção da Guanina faz com que os nucleotídeos seguintes sejam deslocados para frente levando a uma mudança na sequência de leitura e consequentemente na mudança dos aminoácidos produzidos por este RNAm. Então o aminoácido treonina (ACG) na posição 425 doa a Guanina para compor o próximo aminoácido, ficando então uma glutamina (GAA) que quando mutada vai gerar outro aminoacido uma Lisina (AAA), figura 103. A inserção do G na posição 414, também altera o códon 422 que ao invés de ser composto por uma glutamina (GAA) na sequência alterada vai gerar um códon de parada (TGA) na leitura da proteína, gerando então uma proteína truncada, figura 104.

Todas as linhagens celulares em estudo apresentaram a inserção do nucleotídeo G no códon 414 do exon 8 do gene c-kit. As linhagens T05, T10, T16 e T18 apresentaram no códon 425 uma deleção em heterozigose, figura 102, 103 e 104. E as linhagens T06, T07, T12, T13, T15 e T17 apresentaram no códon 425 a deleção em homozigose da Guanina, figura 105, 106 e 107.

Figura 103 – Esquema das mudanças ocorridas no gene c-Kit com a inserção do G no exon 8

	Codon 414	Codon 422	Codon 425
Normal	AAC ACA AAA CCA GAA ATC CTG ACT CAT GAA AGT CTC ACC AAT GGC ATG CTC CAG TGT GTG		
Inserção G	AAC A GC AAA ACC AGA AAT CCT GAC TCA TGA AAG TCT CAC G AA TGG CAT GCT CCA GTG TGT		
Mutado	AAC A GC AAA ACC AGA AAT CCT GAC TCA TGA AAG TCT CAC AAA TGG CAT GCT CCA GTG TGT		
	Inserção G	Codon parada	Troca do G → A

Fonte: Fonseca, I. I. M. da (2013)

Legenda: (A) nucleotídeo Adenina; (T) nucleotídeo Timina; (C) nucleotídeo Citosina; (G) nucleotídeo Guanina

Na figura 105 - Ilustramos a região de complementariedade dos nucleotídeos da sequência normal do RNAm do gene c-kit e o pareamento da sequência do produto do exon 8. Aonde foi possível identificar uma deleção de um G no códon 425, gerando uma mutação em homozigose, como ilustrado nas figuras 105, 106 e 107 a seguir.

Figura 104 - Eletroferogramas do sequenciamento do éxon 8 do gene c-kit, demonstrando uma alteração em heterozigose (G → A), no códon 425

Fonte: Fonseca, I. I. M. da (2013)

Legenda: (A) nucleotídeo Adenina; (T) nucleotídeo Timina; (C) nucleotídeo Citosina; (G) nucleotídeo Guanina

Query	1266	ACA-CAAAACCAGAAATCCTGACTCATGAAAGTCTCAC G AATGGCATGCTCCAGTGTGTG	1324
Sbjct	108	ACA G CAAAACCAGAAATCCTGACTCATGAAAGTCTCAC A AATGGCATGCTCCAGTGTGTG	167
Query	1325	GTTGCAGGATTCCCAGAGCCCGCAGTAG G TTGGTATTTCTGTCCAGGAGCTGAGCAGAG	1383
Sbjct	168	GTTGCAGGATTCCCAGAGCCCGCAGTAG A TTGGTATTTCTGTCCAGGAGCTGAGCAGAG	226

	Codon 414	Codon 422	Codon 425
Normal	AAC ACA AAA CCA GAA ATC CTG ACT CAT GAA AGT CTC AC	AAAT GGC ATG CTC CAG TGT GTG	
Inserção G	AAC AGC AAA ACC AGA AAT CCT GAC TCA TGA AAG TCT CAC	AAA TGG CAT GCT CCA GTG TGT	
Mutado	AAC AGC AAA ACC AGA AAT CCT GAC TCA TGA AAG TCT CAC	AAA TGG CAT GCT CCA GTG TGT	
	Inserção G	Codon parada	Troca G → A

5.17.2.2 Análise dos exons 10-11 do gene c-kit

Realizamos também análise mutacional na região que codifica os exons 10-11 do gene c-kit. O produto gerado pelo sequenciamento dos éxons 10-11, este produto tem uma parte do intron 9, 10 e 11, como ilustrado na figura 110.

Através do programa BLAST de alinhamento de duas sequências foi realizado a comparação dos produtos sequenciados dos exons 10-11 com a sequência nucleotídica do RNA mensageiro deduzida do gene c-kit canino, a qual esta depositada no Gene Bank NCBI sob o número AF044249 e observamos o reconhecimento e alinhamento perfeito dos éxons 10-11 na região do domínio transmembrana do gene c-kit, como ilustrado na figura 111.

Figura 110 - A figura ilustra a região de reconhecimento do éxon 10 - 11 no gene c-kit o qual se alinhou perfeitamente na região do domínio transmembrana do gene

```
AGTAGYSGTTTGGGTCAGGTGGTTGTCATGAAGCTCCACCCCTGCTAATACGTTGTAATTC
CACATTCCCCTTTCATTTTGAACAAATCCATCCCCACACCCTGTTTCACACCTTTGCTG
ATTGGCTTTGTGATCGCAGCTGGAATGATGTGCATTATCGTGATGATTCTTACCTACA
AGTATCTACAGTAATCATTCAATTTGTTCTCTACCCTAAGTGCTATAATGATCGAAATGTT
ATTCATTAAGATGATCTGTCTCTCTTTTCTCCCCCACCAGAAACCCATGTATGAAGTA
CAGTGGAAGGTTGTTGAGGAGATCAATGGAACAATTATGTTTACATAGACCCAACAC
AGTTCCTTACGATCACAAATGGGAGTTTCCAGAAACAGGCTGAGCTTTGGTCAGTA
TGAAAYAGGGGCTTTCATGTAACCTTTTTGTGTACGTGTAACAATGACTTTAGGGAACCC
CATTAGCTTCCTTTGTTCTGTTCCAAGTGAACAATAAGTATTTCTGTGAAGTTTCATCAY
TTTTGATAGATTCCCKATAAAGCACCTTATAGAGAAATGTCCTTAGCGRATTTTKKYCCA
```

Fonte: Fonseca, I. I. M. da (2013)

Legenda: (A) nucleotídeo Adenina; (T) nucleotídeo Timina; (C) nucleotídeo Citosina; (G) nucleotídeo Guanina. A região em vermelho codifica para o exon 10 e 11

Figura 111 – A figura ilustra a região de reconhecimento dos éxons 10 - 11 no gene c-kit o qual se alinhou perfeitamente na região do domínio transmembrana do gene

Fonte: Fonseca, I. I. M. da (2013)

Figura 112 – A figura ilustra a região de reconhecimento do éxon 10 do gene c-kit o qual se alinhou perfeitamente na região do domínio transmembrana do gene c-kit pelo programa BLAST

```

Query    1552  CTTTGCATTTAAAGAACAAATCCATCCCCACACCCTGTTTCACACCTTTGCTGATTGGCTT 1611
          ||||  ||||  ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct    71    CTTT-CATTT-TAGAACAAATCCATCCCCACACCCTGTTTCACACCTTTGCTGATTGGCTT 128

Query    1612  TGTGATCGCAGCTGGAATGATGTGCATTATCGTGATGATTCTTACCTACAAGTATCTACA 671
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct    129  TGTGATCGCAGCTGGAATGATGTGCATTATCGTGATGATTCTTACCTACAAGTATCTACA 188

Query    1672  G 1672
          |
Sbjct    189  G 189

```

Legenda: (A) nucleotideo Adenina; (T) nucleotideo Timina; (C) nucleotideo Citosina; (G) nucleotideo Guanina

Figura 113 – A figura ilustra a região de reconhecimento do éxon 11 no gene c-kit o qual se alinhou perfeitamente na região do domínio transmembrana do gene c-kit pelo programa BLAST

Query	1670	CAGAAACCCATGTATGAAGTACAGTGAAGGTTGTTGAGGAGATCAATGGAAACAATTAT	1729
Sbjct	280	CAGAAACCCATGTATGAAGTACAGTGAAGGTTGTTGAGGAGATCAATGGAAACAATTAT	339
Query	1730	GTTTACATAGACCCAACACAGCTTCCTTACGATCACAAATGGGAGTTTCCCAGAAACAGG	789
Sbjct	340	GTTTACATAGACCCAACACAGCTTCCTTACGATCACAAATGGGAGTTTCCCAGAAACAGG	399
Query	1790	CTGAGCTTTGG	1800
Sbjct	340	CTGAGCTTTGG	410

Fonte: Fonseca, I. I. M. da (2013)

Legenda: (A) nucleotideo Adenina; (T) nucleotídeo Timina; (C) nucleotideo Citosina; (G) nucleotideo Guanina

Figura 114 – Eletroferograma esta representando a sequencia normal do exon 11do gene c-kit na região do códon 576

Fonte: Fonseca, I. I. M. da (2013)

Legenda: (A) nucleotideo Adenina; (T) nucleotídeo Timina; (C) nucleotideo Citosina; (G) nucleotideo Guanina

Figura 117 – A figura ilustra a região do códon 576 do éxon 11 onde houve a troca de uma Citosina por uma Timina

Fonte: Fonseca, I. I. M. da (2013)

Legenda: (A) nucleotídeo Adenina; (T) nucleotídeo Timina; (C) nucleotídeo Citosina; (G) nucleotídeo Guanina

5.17.2.3 Análise dos exons 17 do gene c-kit

Realizamos também a análise mutacional da região que codifica o éxon 17 do gene c-kit. O produto gerado pelo sequenciamento do éxon 17 tem uma parte do intron 16 e intron 17, como ilustrado na figura 118.

Através do programa BLAST de alinhamento de duas sequências foi realizado a comparação dos produtos sequenciados do éxon 17 com a sequência nucleotídica do RNA mensageiro deduzida do gene c-kit canino, a qual esta depositada no Gene Bank NCBI sob o número AF044249 e observamos o reconhecimento e alinhamento perfeito do éxon 17 na região do domínio intracitoplasmático do gene c-kit, como ilustrado na figura 119 e 120.

Na figura 121, ilustramos o eletroferograma normal para o éxon 17. Não encontramos nenhuma alteração neste éxon, em todas as linhagens esta normal.

Figura 118 – A figura ilustra a sequência do produto de PCR e reconhecimento do éxon 17 no gene c-kit

```
ATCATTCTTGAGAGTTTAATAAATGTAAATGGTTTTCTTTTCTCTCCCACTCTCCTAATAG
TGTATTACAGAGACTTGGCTGCTAGAAATATCCTCCTTACTCATGGTCGAATCACAA
AGATTTGTGATTTTGGTCTAGCCAGAGACATCAAGAATGATTCTAATTATGTGGTCAAA
GGAACGTGAGTACCCACTCTGCTTGACAGTCCAGTGAAGGATTTAGTTTCAAGTTTTTC
TAAGAATTGCTTTTATGAGTTTCCTAATGCAAATCCTACCTTTGGATACCATGCA
```

Fonte: Fonseca, I. I. M. da (2013)

Legenda: (A) nucleotídeo Adenina; (T) nucleotídeo Timina; (C) nucleotídeo Citosina; (G) nucleotídeo Guanina

Discussão

6 DISCUSSÃO

A ideia deste trabalho surgiu quando observamos resultados prévios de outros pesquisadores do nosso grupo em que foi observada uma redução da expressão da E-caderina em mastocitomas caninos *in situ*, pela imunoistoquímica e pelo PCR em tempo Real. Os resultados do PCR em Tempo Real não foram considerados relevantes por se tratar de um estudo em amostras de tecido, onde outras células estavam presentes e poderiam estar comprometendo os resultados reais da expressão da E-caderina pelos mastocitomas. Decidimos iniciar este estudo em amostras de mastocitoma emblocado em parafina a fim de identificar a localização e padrão de expressão destas proteínas para depois analisarmos sua expressão em mastócitos isolados. Para estudarmos a expressão gênica em mastócitos somente, sem a interferência das demais células do tecido conjuntivo, vasos, ou do sistema imunológico, planejamos realizar a cultura primária de mastócitos neoplásicos e estabelecer uma linhagem pura para cada graduação tumoral para depois realizarmos as análises de expressão. Estabelecemos com sucesso 10 linhagens de mastocitomas caninos, sendo 3 linhagens do grau 1, cinco linhagens do grau 2 e duas linhagens do grau 3.

Inúmeros marcadores moleculares têm auxiliado no diagnóstico e prognóstico de neoplasias em humanos e animais, após uma revisão na literatura observamos que parecia haver uma interação entre algumas vias de sinalização, em que receptores do tipo tirosina quinase estavam envolvidos na regulação de outras moléculas as quais tinham funções específicas na membrana celular. Um exemplo, o receptor tirosino quinase (c-Kit) o qual pode estar ligado a inúmeras alterações na proliferação tanto de mastócitos humanos levando a uma mastocitose sistêmica ou em cães levando ao mastocitoma. Resolvemos analisar o c-Kit, E-caderina e cateninas, o PTEN, MMP-7, conexinas 32 e 43 tanto em mastocitomas *ex-vivo* como *in vitro*. Alguns dos marcadores por nós estudados estão descritos como exclusivos de células epiteliais, como a MMP-7 e o PTEN, por exemplo, mas mesmo assim resolvemos analisar sua expressão em mastócitos neoplásicos, que são células de origem mesenquimal.

Nos últimos anos, a prevalência do câncer em cães tem aumentado, e representa uma das doenças mais graves dos animais domésticos e encontra-se entre as principais causas de morte (WITHROW, 2007). Os processos neoplásicos envolvendo mastócitos são relativamente incomuns na maioria das espécies, (COHEN et al., 1974; LONDON; SEGUIN, 2003). Nos humanos a ocorrência é rara, no entanto, em cães o mastocitoma representa um

dos tumores mais comum na espécie (MACY, 1985; DE NARDI et al., 2002), representando 20% dos tumores caninos cutâneos (COHEN et al., 1974; MACY, 1985; LONDON; SEGUIN, 2003). O exame histopatológico é o método de eleição para se identificar as características de uma neoplasia (MOTA; OLIVEIRA, 1999). De acordo com diversos autores, a graduação histopatológica do mastocitoma é considerada o fator mais importante no prognóstico e na avaliação do comportamento biológico desta neoplasia (FOX, 1998; HENDERSON; BREWER, 1998; LONDON; SEGUIN, 2003; THAMM; VAIL, 2007).

No presente estudo a classificação histológica dos mastocitomas foi realizada de acordo com o grau de diferenciação e anaplasia celular, seguindo os critérios de Patnaik et al. (1984) e teve como objetivo avaliar o grau do mastocitoma e separá-los em três grupos experimentais distintos. Consultamos os prontuários dos animais dos casos selecionados para relato de seu histórico clínico.

Analizamos 18 casos de mastocitomas, sendo seis casos de cada graduação (1, 2 e 3), para que fosse possível realizar a análise imunoistoquímica dos nove marcadores moleculares propostos neste estudo e comparar os resultados encontrados com a evolução clínica registrada nos prontuários. Este estudo foi realizado para se estabelecer o padrão e a intensidade das imunomarcações das proteínas dos diferentes marcadores moleculares em estudo e avaliar suas expressões *in situ*, correlacionando-as com os graus histológicos dos mastocitomas caninos.

Após consultar o prontuário dos casos de mastocitomas selecionados do acervo do Serviço de Patologia Animal do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, o histórico clínico das 18 amostras nos revelou que a raça Boxer foi a mais acometida sendo representada por 7 animais e correspondendo a (38,89%) dos cães, resultados similares foram encontrados por Costa-Casagrande (2010), em um estudo envolvendo 81 cães. Na literatura há relatos de uma predisposição hereditária para mastocitomas em animais originários dos Bulldogs. (O'KEEFE, 1990; SIMOES et al., 1994; LEMARIE et al., 1995; FOX, 1998; LONDON; SÉGUIN, 2003; MISDORP, 2004; COSTA et al., 2007; STREFEZZI, 2007).

Um total de 7 raças de cães foram representadas neste estudo, a outra raça que apareceu em maior proporção foi o Golden Retriever com três animais correspondendo a 16,67%, o Doberman, Dachshund, cães sem raça definida aparecem com dois animais de cada raça (11,11%), o Labrador e o Shar-pei com apenas um exemplar de cada (5,55%). Apesar dos cães da raça Boxer ser os mais acometidos pelo mastocitoma o prognóstico para esses

animais é bom, pois estes tendem a desenvolver tumores de grau 1 e 2. (BOSTOCK et al., 1973, THAMM; VAIL, 2001). Em nosso estudo foi possível observar esta distribuição, pois dos 7 animais da raça Boxer acometidos pelo mastocitoma, somente um era portador de um tumor de grau 3. Não encontramos, no nosso estudo, predisposição racial além do Boxer, devido ao reduzido número de animais de outras raças. Estes dados de prevalência racial devem, no entanto, ser interpretados com cautela, uma vez que desconhecemos a distribuição da população canina da cidade de São Paulo-Capital.

Dos 18 animais foram extraídas 40 formações de localizações variadas, sendo que 50% dos animais apresentando formação única os demais apresentaram múltiplas formações, esta incidência é muito maior que a descrita na literatura que é de 3 a 14% (MACY, 1985; O'KEEFE, 1990; SIMÕES et al., 1994). Observamos uma alta incidência de tumores múltiplos em cães da raça boxer, das 40 formações relatadas nos 18 cães, 23 estavam em cães da raça Boxer, alguns cães apresentavam 4, 5 e até 9 formações, estes três animais portadores de lesões múltiplas ainda estão vivos pois todas as formações neoplásicas eram de grau 1 ou 2. Usou-se apenas um tumor por animal, apesar de 9 deles pertencerem a animais com tumores múltiplos. Esta percentagem de tumores múltiplos (50%) está acima dos limites descritos em outros estudos que é somente de 25% (TAMS; MACY, 1981a,b; McCAW et al., 1997).

A distribuição dos tumores quanto à sua localização anatômica foi a seguinte: O local mais comumente acometido foram os membros pélvicos (30%), seguidos pela região do tórax, (27,5%), abdômen lateral (17,5%), cabeça/pescoço (10%), pavilhão auricular (7,5%), bolsa escrotal (5%), dígito (2,5%). Nossos dados diferem da literatura, pois as localizações mais frequentes descritas são tórax e períneo, seguidas pelas extremidades e cabeça e pescoço (O'KEEFE, 1990; FOX, 1998). A literatura descreve que tumores provenientes da região perineal, regiões do prepúcio e focinho são muitas vezes mais agressivos do que em outras regiões do corpo (CALVERT, 1984; THEILEN; MADEWELL, 1979).

A alta incidência de mastocitomas nos membros pode ser explicada pelo fato de que são áreas de fácil acesso a ectoparasitas, assim como o contato com o solo, onde podem contaminar-se com poluentes ambientais ou agentes cancerígenos que podem desencadear uma dermatite grave e causar o desenvolvimento do mastocitomas. Além disso, a susceptibilidade aumenta em cães com o sistema imune comprometido ou animais mais velhos (MODIANO; BREEN, 2007).

Calvert (1984) realizou estudos em que camundongos foram expostos repetidamente a carcinógenos tópicos e desenvolveram o mastocitoma, e foi proposto que um processo similar possa explicar o surgimento de mastocitomas em áreas de dermatite crônica.

Os resultados encontrados em nosso trabalho refletem uma pequena parcela das incidências deste tumor no hospital veterinário, pois foram gerados a partir de uma casuística muito pequena.

Quanto à predisposição sexual relacionada à ocorrência do mastocitoma em cães, nos observamos uma maior susceptibilidade em cães machos (61,11%, 11/18), observações semelhantes foram apresentadas por outros autores (TAKAHASHI et al., 2000).

Maior incidência do mastocitomas foi observada em animais mais idosos, mas uma ampla faixa etária foi acometida, resultados similares foram relatados por O'Keefe (1999). A idade média dos animais foi de 9,6, e variou entre seis e 13 anos de idade. Em nosso estudo, animais entre dez e treze anos (55,55%, 10/18) foram mais frequentemente acometidos, diferentemente dos intervalos observados por Macy (1985) e London e Seguin (2003) que foi entre 8 e 9 anos.

Encontramos, em nosso estudo uma associação da localização das formações neoplásicas com a ocorrência de óbito, pois em 9 animais que vieram a óbito em decorrência da neoplasia 14 formações foram retiradas, sendo que 11 delas se localizavam na região de membros e tronco (78,57%, 11/14), nossos achados corroboram com a literatura que cita maior malignidade dos tumores localizados nesta região (O'KEEFE, 1990; FOX, 1998), apesar de outros autores não observarem esta associação (CAHALANE et al., 2004).

Analizamos também a distribuição dos mastocitomas em função dos linfonodos acometidos os quais foram observados durante o exame clínico. O tempo de evolução, intervalo para recidiva, óbito e o tempo de sobrevivência também foram observados. As metástases para o linfonodo foram registrada em cinco animais, sendo estes portadores de Grau 2 e 3. Todos os cães com metástase evoluíram para o óbito.

Houve recidiva em dois (33,33%, 2/6) animais acometidos por mastocitoma de Grau 1 sendo observada a mesma incidência de recidiva (33,33%, 2/6) nos os animais portadores de mastocitoma de Grau 2, todos os animais portadores de mastocitoma de Grau 3 tiveram recidiva (100%, 6/6). O intervalo de recidiva para as três graduações variou de 1 - 10 meses.

Todos os animais diagnosticados com mastocitoma de grau 3 vieram a óbito em decorrência do desenvolvimento do tumor. Não houve diferenças significativas entre os mastocitomas quanto à duração do crescimento do tumor.

Os animais portadores de tumores de Grau 1 não exibiram quaisquer diferenças em termos de desenvolvimento do tumor, progressão, recorrência e morte, quando comparados aos portadores de tumores de Grau 2. No entanto, quando comparamos os animais portadores de mastocitomas de Graus 1 e 2 com os portadores de mastocitomas de Grau 3 houve uma diferença significativa entre os grupos, pois os animais portadores de tumores de Grau 3 apresentaram mau prognóstico.

O tempo de sobrevida dos animais após a recidiva do tumor variou de dois a cinco meses, independentemente do grau tumoral. Os cães que morreram por outras causas não relacionadas aos mastocitomas foram considerados estatisticamente vivos, pois não morreram em decorrência da neoplasia. O tempo de sobrevida de cães com múltiplos tumores não foi significativamente diferente dos cães com mastocitomas solitários. No caso dos cães com diversos mastocitomas (isto é, sem metástases nem recorrência no local do tumor) cada tumor foi considerado como um evento separado, as análises posteriores foram realizadas apenas com um dos tumores. A análise estatística não apresentou diferença significativa entre o tempo de sobrevida dos animais acometidos pelos mastocitomas de Grau 1 ou 2. Porém, uma diferença significativa no tempo de sobrevida dos animais portadores de mastocitoma de Grau 3 foi observada quando comparados aos portadores de mastocitomas de Grau 1 e 2.

Os parâmetros histológicos podem sofrer influência de critérios individuais de cada patologista, pois, um mesmo tumor pode ser classificado em diferentes graus histológicos por diferentes patologistas. A maioria dos patologistas ao diagnosticarem os mastocitomas estabelece uma classificação intermediária ou até mesmo grau 3 (JÉROME et al., 1999), e se apoiam em exames complementares para iniciar o tratamento, e um dos métodos diagnósticos auxiliares tem sido a expressão de alguns marcadores de proliferação como o Ki67 e o receptor tirosina quinase, ambos pela técnica da imunoistoquímica.

Investigamos os mastocitomas caninos usando uma série de marcadores moleculares, a avaliação da expressão destas proteínas pela imunoistoquímica poderá auxiliar e direcionar o diagnóstico desta neoplasia. Os marcadores estudados foram a E-caderina, β -catenina, α -catenina, p120-catenina, (complexo de adesão celular), MMP-7, PTEN tem papeis antagônicos sobre este complexo proteico, pois se PTEN esta ligado ao complexo E-caderina/cateninas este se estabiliza, e quando a E-caderina sofrer a digestão pela MMP-7 este complexo de proteínas se desestabiliza e é dissociada, a ação do c-kit sobre as caderinas e cateninas esta na fosforilação desencadeada pelas quinases as quais são ativadas pela dimerização do c-Kit. Outros marcadores avaliados neste estudo foram às proteínas de junção

de comunicação tipo *gap*, as Conexinas 32 e 43, que, neste contexto, estão sob a ação do receptor c-Kit ou da manutenção do complexo de adesão E-caderina/cateninas.

Em nosso estudo prospectivo, onde foram coletadas 18 formações de mastocitomas cutâneos caninos de dezoito animais, o diagnóstico de mastocitoma foi realizado por meio de citologia aspirativa ou biópsia. Estas amostras de mastocitoma foram submetidas ao protocolo de cultivo celular para se estabelecer uma linhagem de mastocitoma para cada fragmento tumoral (18 amostras). Após o estabelecimento dos cultivos celulares, nas linhagens realizamos a análise de expressão para vimentina e triptase a fim de caracterizar e comprovar que de fato as células em cultivo eram mastócitos.

Realizamos também a análise pela imunocitoquímica e a imunofluorescência nas células das linhagens tumorais estabelecidas dos tumores de mastocitoma canino, as seguintes proteínas foram avaliadas: Ecaderina, β -catenina, α -catenina, p120-catenina, MMP-7, PTEN, Cx43, Cx32, c-kit, triptase. Para os mesmos marcadores realizamos o ensaio de imunofluorescência com dupla marcação, para os anticorpos monoclonais descritos anteriormente usamos o anticorpo policlonal PTEN, e para os demais anticorpos policlonais usamos um anticorpo contra E-caderina que era monoclonal. Os resultados serão discutidos para ambas as técnicas e para cada molécula estudada.

A imunoistoquímica é um método que tem auxiliado muito no diagnóstico dos mastocitomas, e hoje já esta sendo utilizada na rotina diagnóstica. É uma metodologia rápida e fácil de ser realizada, e pode ser utilizada em tecidos parafinados, congelados ou frescos (BARRA, 2006). Segundo Lui et al., (1997) para se utilizar esta metodologia alguns cuidados devem ser tomados, pois inúmeros fatores podem vir a interferir na sensibilidade e especificidade da técnica, como: a presença de ligações cruzadas dos anticorpos com outros epítomos. O método de quantificação das células marcadas também é muito importante, e faz muita diferença no resultado final (BERGMAN et al., 1996; BARRA, 2006).

Com base nesses relatos, no presente trabalho, realizamos as análises dos marcadores *in situ*, adotando alguns critérios com o intuito de minimizar fatores intercorrentes, o primeiro foi à utilização de anticorpos monoclonais aonde poderíamos ter mais interferência e a segunda foi à contagem de aproximadamente 1000-1200 células neoplásicas com marcação positivas ou negativas sem considerar a intensidade da marcação, em mais ou menos 20 campos aleatórios por corte. De acordo com Garcia et al. (1989) e Scott et al. (1991) a distinção entre células fortemente positivas e fracamente positivas durante a contagem pode ser subjetiva e induzir a erros na avaliação. Além destes cuidados citados anteriormente,

também foram adotados controles positivos e negativos, métodos de recuperação antigênica e bloqueio de reações inespecíficas visando à obtenção de reações fidedignas.

Os resultados obtidos no presente estudo evidenciaram que os anticorpos monoclonais para a E-caderina, β -catenina, α -catenina, p120-catenina, foram sensíveis e específicos na detecção das respectivas proteínas em mastócitos tumorais de tecido cutâneo canino. Apesar de não serem espécie-específicos, estes anticorpos revelaram um padrão de imunoreatividade no tecido canino muito similar as encontradas em tecido humano. Os anticorpos policlonais como para a MMP-7, PTEN, Cx43, Cx32 e c-kit, também se mostraram sensíveis na detecção das respectivas proteínas nas amostras de mastocitoma canino.

As E-caderinas, são moléculas de adesão celular dependentes de cálcio, desempenham papéis cruciais, não somente para a manutenção da integridade tecidual, mas também na regulação de muitos aspectos do comportamento celular (TAKEICHI, 1991). Estudos relatam expressão da E-caderinas, não apenas em células epiteliais, mas também em células derivadas da medula óssea, tais como células dendríticas, células de Langerhans e da eritropoiese em etapas definidas de maturação, e certas células T e linhagens de células T de linfoma de células (AIBA et al., 1995; ARMEANU et al., 1995; BÜHRING et al., 1996; CAUX et al., 1996; MUNRO et al., 1996; TSUTSUI et al., 1996; KAWAMURA et al., 1998).

A primeira descrição de que os mastócitos expressavam as proteínas do complexo de adesão E-caderina/catenina foi relatada por Tegoshi et al., no ano de 2000, sua pesquisa foi realizada em mastócitos normais derivados de medula óssea e do peritônio de camundongo, Tegoshi avaliou a localização e função das E-caderinas nestas células, conseguindo provar a existência do complexo de proteínas E-caderina/cateninas e sua localização na membrana destes mastócitos. Segundo Tegoshi (2000), este complexo proteico pode estar envolvido na regulação de certos estágios de diferenciação dos mastócitos, como também nas interações célula-célula. Outro estudo envolvendo mastocitomas caninos foi realizado mais recentemente por Ramos e Miller (2011), onde a análise da expressão da E-caderina também foi realizada pelo método imunoistoquímico, este estudo envolveu tumores de células redondas, onde alguns mastocitomas caninos foram incluídos, porém, neste estudo a quantificação da expressão da E-caderina não foi realizada, e sua detecção foi tanto no citoplasma quanto na membrana dos mastócitos tumorais. Estudos realizados por outros autores demonstraram que os mastócitos humanos também expressam a E-caderina (NISHIDA et al., 2003; FLORIAN et al., 2006).

Nossos resultados para a expressão de E-caderinas e as proteínas citoplasmáticas associadas à caderina em mastócitos tumorais caninos, revelaram que os mastócitos tumorais caninos expressam a E-caderina, bem como as proteínas citoplasmáticas α , β , e p120-catenina. Os mastocitomas caninos foram submetidos a uma imunomarcação com dois anticorpos monoclonais que reconhecem o epítipo da molécula de E-caderina humana e, ambos revelaram uma redução na expressão da E-caderina nos diferentes graus do mastocitomas. Sendo que o anticorpo E-caderina (clone HECD-1) revelou uma imunoreatividade para proteínas na membrana, citoplasma e núcleo nos mastócitos tumorais, porém, nas células do epitélio canino observamos somente marcação citoplasmática e nuclear. Este resultado nos surpreendeu, pois, nas células epiteliais humanas este anticorpo reconhece a proteína na membrana das células. Segundo Ronzitti et al. (2004), este anticorpo se liga no primeiro domínio da região extracelular da E-caderina. Quando comparamos as sequências nucleotídicas do gene humano e do gene canino para a E-caderina existe uma homologia de 83% entre estes genes, como ilustra a figura abaixo. Parece ser uma propriedade específica deste anticorpo, pois quando realizamos a análise utilizando o anticorpo E-caderina clone NCH-38, observamos a imunorreatividade na membrana das células epiteliais, mas não evidenciamos a marcação nuclear observada para este primeiro anticorpo.

A análise das contagens das marcações para o anticorpo anti-E-caderina (clone HECD-1) revelaram diferença significativa quando comparamos os resultados obtidos para os tumores Grau 1 versus as obtidas para os de Grau 3, tanto as marcações citoplasmáticas quanto para as nucleares.

Quando realizamos a reação de imunoistoquímica com o anticorpo contra a E-caderina humana (clone NCH-38), observamos marcação para as proteínas na membrana e citoplasma tanto para as células epiteliais caninas como para os mastócitos tumorais bem diferenciados, e não houve marcação nuclear quando utilizamos este anticorpo. O resultado das contagens das marcações citoplasmáticas para a E-caderina (clone NCH-38) nas três graduações tumorais revelou diferença estatisticamente significativa quando comparados os resultados obtidos para os tumores de Grau 1 versus os de Grau 3. A mesma diferença foi encontrada quando comparamos os resultados obtidos para os tumores de Grau 2 versus os de Grau 3. Os resultados obtidos pelos dois anticorpos revelam que as E-caderinas estão diferencialmente expressas nas células dos mastocitomas mais indiferenciados. As marcações revelaram uma localização subcelular da E-caderina nos mastocitomas. Existem poucos estudos relacionados à expressão da E-caderina nos mastocitomas caninos. Nossos resultados corroboram com os

achados do primeiro relato da expressão de E-caderina em mastocitomas caninos descrito por Mota et al. em 2005, (Dissertação de mestrado –Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP). Mota et al. (2005) que em seu estudo avaliou a expressão da E-caderina nos graus 2 e 3 dos mastocitomas, utilizando um outro anticorpo anti-Ecaderina observou resultados muitos similares aos encontrados neste estudo, ou seja uma diferença estatisticamente significativa na expressão da E-caderina nos mastocitoma de grau 3 quando comparados com as marcações obtidas nas amostras de grau 2.

Em nosso estudo observamos marcações nucleares para E-caderina nos mastócitos tumorais. Achados similares foram encontrados por Chetty et al. (2008) em tumores endócrinos, onde observou que uma ausência de marcação na membrana celular e uma localização nuclear aberrante da expressão da E-caderina estava correlacionado com invasão das células tumorais. Outros autores também relatam que um frequente acúmulo nuclear da E-caderina ocorre por alterações na via de sinalização WNT, em tumores de carcinoma escamoso de esôfago (SALAHSHOR et al., 2008).

Os resultados da imunocitoquímica e imunofluorescência, para a E-caderina nas linhagens celulares foram similares aos obtidos na imunoistoquímica nos mastocitomas caninos. A única diferença encontrada foi em relação à marcação nuclear da E-caderina, que nas linhagens celulares não foi observada. Visto que os resultados *in situ* revelam uma redução significativa das marcações nucleares para E-caderina nos mastocitomas de grau 3, deduzimos que a cultura celular é composta por uma população de células mais anaplasicas, que não necessitam mais da ação da E-caderina nuclear. Em estudos funcionais, Ferber et al. (2008) demonstraram que a E-caderina pode sim permear o núcleo da célula, quando ligada a molécula p120-catenina, quando a E-caderina é clivada pela enzima γ -secretase libera o fragmento C-terminal, os autores realizaram inúmeros experimentos e comprovaram que a E-caderina permanecia ligada a p-120 catenina e ocorria a translocação de ambos para dentro do núcleo das células, onde atuam juntamente na repressão do repressor Kaizo, que é um repressor transcricional responsável por inibir a transcrição da matrilisina MMP-7, por se ligar especificamente em sua região promotora. Os resultados deste estudo revelam que, além de um papel na supressão tumoral a E-caderina pode atuar juntamente com a p120-catenina e auxiliar na digestão do estroma através da ação das metaloproteinases, como também inibir seu próprio retorno para a membrana celular, uma vez que também é alvo da ação desta enzima.

Outra possibilidade pode estar ocorrendo, pois segundo, Yanagisawa e Anastasiadis (2006), a p120-catenina pode de ligar a outras caderinas clássicas mesenquimais, (N-cadherin, R-cadherin, ou cadherin 11), gerando assim uma competição pela ligação a p120-catenina e consequentemente uma redução ou até a ausência da E-caderina no núcleo dos mastócitos. Se considerarmos o fato de que os mastócitos residentes na derme possam ter um comportamento similar às células epiteliais, possivelmente devem responder as mesmas vias de sinalização e mecanismos que coordenam uma célula epitelial.

A disfunção da E-caderina tem sido implicada na invasão e carcinogênese em inúmeros tumores epiteliais. (SHIMOYAMA et al., 1992). A regulação negativa da função de E-caderina pode ocorrer por meio de vários mecanismos, incluindo mutações genéticas que frequentemente ocorrem em associação com a perda de heterozigosidade do alelo de tipo selvagem (BERX et al., 1998). Inúmeros estudos têm utilizado a análise imunoistoquímica para demonstrar a perda ou a redução da E-caderina. A redução da expressão e a atividade da E-caderina deve ser um dos mecanismos mais utilizados por células tumorais a fim de invadir os tecidos circundantes (HAJRA; FEARON, 2002). Mecanismos pelo qual as células tumorais podem diminuir a atividade da E-caderina, incluem a metilação do promotor, repressão transcricional, modificação pós-traducional do complexo E-caderina/catenina.

Um dos mecanismos que podem também ocorrer durante o desenvolvimento de neoplasias é a hipermetilação das ilhas de CpG; este processo de silenciamento de genes ocorre em células normais. A hipermetilação do promotor do gene da E-caderina foi observada em carcinomas humanos, incluindo os da mama, da próstata, bexiga, cólon e cânceres orais (GRAFF et al., 2000; NASS et al., 2000; CHANG et al., 2002; KANAZAWA et al., 2002; RIBEIRO-FILHO et al., 2002).

No presente estudo realizamos a análise, pela imunoistoquímica da expressão da proteína β -catenina nos diferentes graus do mastocitoma canino. As imunomarcações para β -catenina foram detectadas em alta densidade na membrana das células epiteliais caninas. A imunoreatividade para β -catenina foi localizada na membrana, citoplasma e núcleo das células dos mastocitomas caninos. A análise estatística das contagens citoplasmáticas e nucleares das imunomarcações para β -catenina nas três graduações do mastocitomas caninos revelou uma diferença significativa quando comparamos as marcações citoplasmáticas dos tumores Grau 3 versus as marcações citoplasmáticas dos tumores de Grau 1, os tumores de grau 3 apresentaram uma redução de sua marcação citoplasmática. Não houve diferença na contagem das marcações nucleares, pois todos os graus do mastocitoma apresentavam marcação nuclear

muito similar. Encontramos resultados similares quando utilizamos a imunocitoquímica e imunofluorescência para a β -catenina nas células dos mastocitomas em cultivo.

Até o momento não existem relatos de estudos da β -catenina em mastocitomas caninos, mas estudos realizados por Kajiguchi et al. (2008) em três linhagens de mastócitos HMC-1 e HMC-1.2 derivadas de paciente com mastocitose e a LAD 2 derivadas de um sarcoma de mastócitos, confirmaram a existência de uma interação entre a proteína c-Kit e a β -catenina. Os autores demonstraram a existência de uma interação física entre a β -catenina com a proteína c-Kit a que é responsável pela fosforilação da β -catenina. Entretanto a fosforilação da tirosina da β -catenina não é mediada pela sinalização PI3K/AKT e sim induzida diretamente pelo c-Kit ativo, pois, observaram que tanto o c-Kit quanto a β -catenina co-imunoprecipitavam juntos. Quando foi usado um siRNAs direcionado para o gene c-Kit e para a β -catenina, o grau de regulação negativa c-Kit foi semelhante ao grau de regulação negativa da β -catenina, tanto do gene alvo como de suas respectivas proteínas. O c-Kit ativo se liga a β -catenina e catalisa a fosforilação de tirosina, e uma inativação ou um silenciamento de c-Kit inibe a β -catenina e consequentemente a expressão dos genes alvo da em leucemia de mastócitos (MCL) (KAJIGUCHI et al., 2008).

Em outros estudos usando células epiteliais, foi demonstrado um desequilíbrio no complexo de adesão E-caderina/cateninas, resultando no aumento da β -catenina livre no citoplasma, que quando não é encaminhada para o proteossoma, ocorre a sua translocação para o núcleo, onde se liga aos fatores de transcrição TCF/LET levando então a ativação inapropriada da expressão de inúmeros genes (NOLLET, 1999; MOON et al., 2004; IWAI et al., 2005; GAO et al., 2005; SCULLY et al., 2005). Consequentemente pode haver uma proliferação incontrolada das células. De acordo com Sato et al. (2002), a expressão citoplasmática e nuclear para β -catenina já é sinal agressividade para os cânceres de língua, mesmo que esta proteína não apresente mutações. O acúmulo citoplasmático e nuclear da β -catenina tem sido relatado no câncer colorretal, e uma quebra ou a perda da proteína APC, como também uma mutação no gene GSK-3 β , ambos inibidores da β -catenina, podem ser mecanismos subjacentes críticos que desencadeiam a expressão de gene pró-proliferativos e genes de sobrevivência regulados pela β -catenina (BIENZ; CLEVERS, 2000; POLAKIS, 2000). Apesar da sinalização β -catenina se encontrar aumentada em leucemia mieloide aguda e no mieloma múltiplo, não foi encontrada nenhuma mutação no gene APC ou β -catenina, (DERKSEN et al., 2004; SIMON et al., 2005).

Detectamos a marcação para a α -catenina pelo ensaio de imunoistoquímica e observamos a marcação desta proteína na membrana, citoplasma e núcleo das células dos mastocitomas. Porém, a maioria das marcações foi citoplasmática e nuclear. A análise estatística das contagens das imunomarcações citoplasmáticas e nucleares para as α -cateninas nas três graduações tumorais revelaram diferença significativa quando comparamos as marcações citoplasmáticas dos tumores Grau 3 versus as marcações citoplasmáticas dos tumores de Grau 1. As marcações nucleares não apresentaram resultados estatísticos significantes.

Encontramos resultados similares quando analisamos as diferentes linhagens celulares de mastocitoma pela imunocitoquímica e imunofluorescência usando o mesmo anticorpo para a α -catenina. Houve uma redução na marcação citoplasmática nas células dos tumores indiferenciados, e não foi observada marcação nuclear nas linhagens quando usamos a imunocitoquímica. Na imunofluorescência observamos nas células dos mastocitomas de grau 1 a imunomarkação para α -catenina na membrana de algumas células na região de contato célula-célula, como também marcação nuclear forte. Nas células dos tumores de grau 2 observamos marcações pontuais fracas na membrana, citoplasma e ausência de marcação nuclear. Nas células dos tumores de grau 3 observamos marcações citoplasmáticas fracas e ausência de marcação nuclear para a α -catenina. Achados similares foram encontrados em tumores de células epiteliais onde os níveis reduzidos das proteínas E-caderina e α -catenina parece ser característica em diferentes cânceres em humanos, incluindo tumores malignos do cólon, da mama, do fígado, do estômago, do esôfago, da bexiga (MOLL et al., 1993; KADOWAKI et al., 1994; OCHIAI et al., 1994; SHIOZAKI et al., 1994; RIMM et al., 1995; SHIMAZUI et al., 1996; KOZYRAKI et al., 1996). A proporção de tais tumores que não conseguem expressar uma ou ambas as proteínas tem sido relatada superior ou igual a 80 %, e a perda de E-caderina ou α -catenina geralmente correlaciona-se com o grau de diferenciação do tumor e metástases (KADOWAKI et al., 1994; MATSUI et al., 1994; VERMEULEN et al., 1994). Matsui et al. (1994), demonstraram em seu estudo envolvendo cânceres gástricos que o índice de metástase para os linfonodos era muito mais alto quando havia uma redução ou ausência das E-caderina e α -catenin simultaneamente, do que nos tumores que apresentavam a expressão preservada da E-caderina e ausência da α -catenina.

A perda de α -catenina parece ser mais frequente, e também se correlaciona melhor com o nível de invasão do tumor e com o grau de diferenciação do que a perda de E-caderina. (KADOWAKI et al., 1994; MATSUI et al., 1994). Quando α -catenina foi artificialmente

reintroduzida em células de tumores de próstata, a adesão dependente da E-caderina foi restaurada e o fenótipo invasivo foi suprimido (EWING et al., 1995).

A α -catenina parece funcionar como um supressor de tumor, semelhante a várias caderinas clássicas. A perda da α -catenina não só compromete adesão intercelular, mas também leva a uma resposta alterada dos queratinócitos a diferentes fatores de crescimento, que ativam receptor tirosina quinase ligados na superfície de células epidérmicas, e consequentemente um crescimento descontrolado que pode levar ao desenvolvimento tumoral e metástases (KOBIELAK; FUCHS, 2004). As mutações nulas na α -catenina tem a capacidade não só perturbam as junções aderentes, mas também de ativar constitutivamente Ras-MAPK. Revelando os efeitos dramáticos da perda α -catenina no epitélio da pele mais do que tem sido observado com a ativação das MAPK por oncogenes clássicos (KOBIELAK; FUCHS, 2004).

Em nosso estudo, detectamos a expressão da p120-catenina por imunoistoquímica nos diferentes graus do mastocitoma canino, esta foi localizada no citoplasma e núcleo dos mastócitos tumorais. Realizamos a análise estatística das contagens das imunomarcações citoplasmáticas e nucleares para p120-catenina nas três graduações tumorais, os resultados revelaram uma diferença significativa quando comparamos as marcações citoplasmáticas dos tumores de Grau 3 versus as marcações citoplasmáticas dos tumores de Grau 1. As marcações nucleares não apresentaram resultados estatisticamente significativos. Uma vez que em todos os tumores foram observadas as mesmas proporções das marcações nucleares.

Encontramos resultados similares em nosso estudo quando analisamos as diferentes linhagens celulares de mastocitoma pela imunocitoquímica e imunofluorescência. A p120-catenina foi localizada na membrana, citoplasma e núcleo das células das linhagens de mastocitomas bem diferenciados (Grau 1), foram observadas em algumas células marcações de membranas na região de junção célula-célula tanto pela imunocitoquímica quanto pela imunofluorescência, mas a maioria das células tiveram uma marcação citoplasmática forte e difusa. Nas células das linhagens de mastocitomas indiferenciados (Grau 2), observamos marcação citoplasmática forte difusa, como também marcações citoplasmáticas puntiformes e todas as células tiveram marcação nuclear forte. Nas células das linhagens de mastocitomas indiferenciados (Grau 3) foi observado marcação citoplasmática média ou fraca e marcação nuclear forte. Como não existem estudos relacionados à expressão da p120-catenina em mastócitos caninos, então recorreremos aos resultados encontrados e descritos em tumores de células epiteliais para justificar nossos achados. Segundo a literatura a p120-catenina se

liga a cauda citoplasmática da E-caderina em células epiteliais, e está localizada no citoplasma e na superfície interna da membrana plasmática, que em conjunto com E-caderina funciona como parte da conexão aderente, um complexo do citoesqueleto especializado que regula a adesão célula-célula (REYNOLDS et al., 1994; REYNOLDS et al., 1996). Estudos demonstram que qualquer evento que perturbe o vínculo entre a E-caderina-p120-catenina pode levar a uma translocação nuclear da p120-catenina e afetar o comportamento biológico das células (VAN HENGEL et al., 1999; ROCZNIAK-FERGUSON; REYNOLDS, 2003). Inúmeros relatos de alterações ou em reguladores citoplasmáticos das E-caderinas ou em uma das cateninas, foram implicados como tendo um papel central neste processo, a p120-catenina é frequentemente alterada e/ou perdida em tumores do cólon, bexiga, estômago, mama, próstata, pulmão, pâncreas (ANASTASIADIS; REYNOLDS, 2000; REYNOLDS et al., 2004b). A p120-catenina atua como um modulador molecular que dinamicamente controla a manutenção e dissociação do complexo de adesão E-caderina/cateninas, deste modo quando p120-catenina está ligado ao complexo mantém caderina na superfície da célula, e a dissociação p120-catenina promove a internalização da E-caderina (REYNOLDS; ROCZNIAK-FERGUSON, 2004a).

Inúmeros mecanismos podem promover a dissociação da p120-catenina do complexo caderina/cateninas, e um dos mais frequentes é a concorrência de outras proteínas pela ligação na região de domínio justamembrana (JMD) da E-caderina. Por exemplo, Src se associa nesta região e promove ligação da ubiquitina ligase Hakai fosforilando assim uma tirosina no domínio justamembrana da E-caderina levando a ubiquitinação e sua internalização (FUJITA et al., 2002). Presenilin-1 também concorre com p120 pela ligação ao domínio justamembrana da E-caderina, podendo iniciar uma rotatividade da E-caderina através de um mecanismo proteolítico (BAKI et al., 2001). Outro mecanismo pode ocorrer pela ação das *kinesins* que indiretamente mediam as interações da p120-catenina com os microtubulos. *Kinesins* são tipicamente proteínas motoras envolvidas, entre outras coisas, o transporte de proteínas e organelas em microtúbulos (SCHLIWA; WOEHLKE, 2003). Em resumo, o vaivém núcleo-citoplasma da p120-catenina é regulado por mecanismos intrínsecos e extrínsecos, que juntos, determinam a extensão de sua localização nuclear. (ROCZNIAK-FERGUSON; REYNOLDS, 2003). Em células deficientes de E-caderina observa-se um aumento da p120-catenina nuclear (VAN HENGEL et al., 1999).

A p120-catenina parece contribuir para a invasão e a progressão dos tumores de várias maneiras independentes através (a) p120-catenina induz invasão por associação com caderina

mesenquimais (N-cadherin, R-cadherin, e cadherin 11), (YANAGISAWA; ANASTASIADIS, 2006), (b) p120-catenina citoplasmática não consegue manter o controle das Rho-GTPases (ANASTASIADIS, 2007), e (c) expressão de genes dependentes da liberação da repressão exercida pela p120-catenina, os quais são mediados por Kaiso (KELLY et al., 2004). A redução da expressão da p120-catenina em tumores metastáticos é relativamente alta e está associada a uma co-regulação para baixo de todos os membros do complexo E-caderina /cateninas (KALLAKURY et al., 2001). A perda de p120-catenina parece ser um evento precoce na a progressão do tumor, possivelmente anterior à perda de E-caderina, sugerindo que a p120 tem um papel como um "modulador duplo" em diferentes tipos de células (ANASTASIADIS; REYNOLDS, 2000; THORESON; REYNOLDS, 2002).

Como não existem estudos relacionados à expressão da p120-catenina em mastócitos caninos, e diante dos resultados por nós obtidos, postulamos que os mesmos eventos envolvendo o complexo E-caderina/catenina descritos na literatura para tumores de células epiteliais, possam ser responsáveis pela evolução e desenvolvimento dos mastocitomas caninos. Levando a uma desestabilização destas junções de adesão favorecem assim a migração, proliferação e metastases dos mastócitos tumorais caninos.

Detectamos a marcação para a MMP-7 nos tecidos tumorais dos mastocitomas cutâneos caninos usando imunoistoquímica. Constatamos marcação forte na região membrana proximal em algumas células neoplásicas. No entanto, a prevalência das imunomarcações para a MMP-7 nas amostras tumorais de mastócitos bem diferenciados (Grau 1) foram citoplasmáticas fortes e difusas juntamente com as nucleares, já para os tumores de grau intermediário de diferenciação (Grau 2) foram detectadas raras marcações nucleares e as marcações citoplasmáticas eram de intensidade média com um predomínio na região membrana proximal. Nos tumores indiferenciados (Grau 3) foram detectadas imunomarcações citoplasmáticas mais fracas e raras marcações nucleares em algumas porções do tumor quando comparados com os tumores bem diferenciados.

A análise comparativa das marcações para a proteína MMP-7 nas três graduações tumorais nos mostrou que tanto as marcações citoplasmáticas quanto as nucleares apresentaram diferenças estatísticas significativas. Para a imunom marcação citoplasmática a diferença foi altamente significativa quando comparada a mastocitomas de Grau 1, e para a imunomarcação nuclear a diferença foi também altamente significativa ($p < 0,0005$) em comparação com mastocitomas de Grau 1.

Achados similares foram encontrados quando realizamos a análise imunocitoquímica e imunofluorescência para a MMP-7, nas linhagens tumorais estabelecidas dos mastocitomas caninos. Na imunocitoquímica a MMP-7 foi localizada na membrana e citoplasma das células da linhagem dos mastocitomas bem diferenciados (Grau 1). As células dos tumores graduados como intermediários (Grau 2) tiveram marcação citoplasmática forte na região perinuclear. Houve redução na marcação citoplasmática nas células dos tumores indiferenciados (Grau 3). Houve semelhança destes achados com aqueles obtidos na imunoistoquímica.

Na imunofluorescência a MMP-7 revelou um predomínio de imunomarcação nuclear nas células da linhagem MCF10A. Nas células das linhagens de mastocitomas de grau 1 uma imunomarcação forte e puntiforme no citoplasma e núcleo, nas células das linhagens dos tumores graduados como 2 e 3 observamos uma redução da imunomarcação citoplasmática e nuclear para a MMP-7. Somos os primeiros a realizar um estudo e relatar a expressão da MMP-7 em mastócitos tumorais caninos. Tais dados são similares aos reportados por Brabletz et al. (1999) que em seu estudo com tumores de células epiteliais observaram uma super expressão da MMP-7 em decorrência da redução da E-caderina/cateninas. Segundo o autor a expressão da MMP-7 é induzida por fatores de crescimento célula-célula e célula-matriz. O seu gene é induzível por estímulos extracelulares que ativam um fator de transcrição dimérico, o complexo ativador de proteína 1 (AP-1), que vai se ligar ao promotor de MMPs no núcleo celular e ativar a sua transcrição. Por outro lado, alguns autores têm sugerido que a β -catenina é um importante fator regulador na super expressão da MMP-7. Além disso, a ativação das MMP-7 pode envolver uma reação em cascata, visto que as atividades das MMPs interferem umas com as outras, através da ativação de proenzimas. A MMP-7 tem uma ampla atividade proteolítica, degradando vários componentes da membrana extracelular, entre eles os proteoglicanos, laminina, elastina, caseína, fibronectina e o colágeno tipo IV (WILSON et al., 1996; ICHIKAWA et al., 1998; MASAKI et al., 2001; YANAGISAWA et al., 2005). A degradação do colágeno tipo IV, em particular, torna a MMP-7 um importante fator de metástase, uma vez que o colágeno tipo IV é o maior componente da membrana basal. A atividade das MMPs é regulada por expressão gênica, por ativação da pró-enzima, por inativação da enzima ativa e por inibidores tissulares específicos. As MMPs ampliam o processo de invasão tumoral, não somente por meio da degradação das proteínas da matriz extracelular, bem como pela ativação das cascatas que promovem a motilidade e a solubilização de fatores de crescimento ligados à matriz extracelular (STAMENKOVIC,

2003). A MMP-7 cliva as E-caderinas e rompe as junções aderentes, promovendo um fenótipo migratório (GUMBINER; SIMONS, 1987; HARREL et al., 2005;)

Estudos realizados por Noë et al. (2001) identificaram a matrilisina (MMP-7) e demonstraram que esta enzima era capaz de clivar a região justamembranar da E-caderina, gerando dois fragmentos um fragmento do ectodomínio de 80kDa e outro intracelular de 40 kDa. Outros autores sugerem que ambos os fragmentos extracelulares e intra da E-caderina participam na sinalização diretamente através da ativação de receptores ErbB (NAJY et al., 2008) e da atividade nuclear do complexo p120/Kaiso (FERBER et al., 2008), respectivamente. Assim mudanças adicionais na capacidade migratória é um resultado predominante da clivagem da E-caderina pela MMP7, como a perda de inibição por contato, e o aumento na proliferação indica que a clivagem da E-caderina pela MMP7 pode regular o potencial de crescimento de células não transformadas. É possível que uma expressão aberrante de MMP7 seja o resultado de um programa de iniciação celular que promove a proliferação epitelial e migração, e que o processamento da E-caderina pela MMP7 seja o programa molecular efector. (LYNCH et al., 2010).

A MMP-7 é uma das metaloproteinases de matriz que tem um papel crítico na invasão tumoral e na remodelagem da matriz extracelular no câncer. Muito embora, nenhuma metaloproteinase sozinha ou mesmo suas associações possam justificar o processo de desorganização pluricelular, que culmina com uma transcrição de mRNA, levando à transformação maligna de uma célula. (JUCÁ et al., 2008).

Detectamos pela imunoistoquímica a marcação para o PTEN nos células do mastocitomas caninos. O PTEN foi detectado na membrana de algumas células de tumores bem diferenciados (Grau 1), mas o predomínio das marcações foram citoplasmáticas e nucleares. Nos tumores de grau 2 e 3 observamos uma redução na intensidade das marcações citoplasmáticas e nucleares. A análise comparativa da marcação para a proteína PTEN nas três graduações tumorais não mostrou diferença significativa tanto as marcações citoplasmáticas quanto para as nucleares. Entretanto, uma tendência de redução foi observada para ambas as marcações.

Quando analisamos as diferentes linhagens celulares de mastocitoma pela imunocitoquímica e imunofluorescência, encontramos resultados similares para a expressão do PTEN. Pela imunocitoquímica o PTEN foi detectado nas células das linhagens de mastocitomas bem diferenciados (Grau 1) como marcações na membrana na região de junção célula-célula fracas, mas a maioria das células tiveram uma marcação citoplasmática média na

região perinuclear, para os tumores graduados como intermediários (Grau 2) foi observada marcação citoplasmática forte difusa, em algumas células com marcações nucleares e para os tumores graduados como indiferenciados (Grau 3) foi observada marcação citoplasmática média e difusa juntamente com a marcação nuclear. Pela imunofluorescência observamos uma marcação nuclear e citoplasmática forte nas células dos tumores de grau 1, e uma redução da marcação citoplasmática nas células dos tumores de graus 2 e 3. Nossos achados corroboram com os descritos por autores que estudaram a expressão do PTEN pela imunoistoquímica em tumores de células epiteliais, onde a existência de marcação nuclear para o PTEN foi relatada em inúmeros tipos celulares, incluindo neurónios primários e células endoteliais (SANO et al., 1999), células mioepiteliais de ductos mamários normais (PERREN et al., 1999), em células foliculares normais da tireóide (GIMM et al., 2000). Em geral, uma forte coloração nuclear do PTEN tem sido observada em células normais quando comparadas com células tumorais (GERICKE et al., 2006), e chegaram a pensar que a expressão do PTEN estava correlacionada diretamente com a diferenciação celular (SEMBA et al., 2009). Segundo estudos realizados Ginn-Pease e Eng (2003); o aumento dos níveis nucleares de PTEN ocorre na fase G0 - G1 e uma diminuição dos níveis nucleares de PTEN ocorrem na fase S, indicando que PTEN nuclear esta envolvido como um modulador do ciclo. Outros autores relatam que o aumento do PTEN no núcleo de exerce uma atividade supressora enquanto que a redução esta correlacionada com o aumento da progressão tumoral. (GIMM et al., 2000; WHITEMAN et al., 2002; TACHIBANA et al., 2002; ZHOU et al., 2002).

Existe uma comunicação cruzada entre a proteína E-caderina e o PTEN, pois a proteína PTEN estabiliza a E-caderina nas junções aderentes (KOTELEVETS e cols., 2001).

Kotelevets et al., em 2005, propôs a existência de um complexo de um conjunto de que denominou de *signalosome*, o qual seria composto pelas proteínas MAGI, E-caderina, α -catenina e β -catenina, PTEN e PI3K. Sua teoria foi comprovada por meio de estudo envolvendo imunoprecipitação de proteínas. Quando o PTEN faz parte deste complexo de proteínas se estabiliza e esta protegido da degradação, aumentando assim, a sua presença no citosol sem afetar os níveis de mRNA (SUBAUSTE et al., 2005; HU et al., 2007).

Estudos sugerem que a β -catenina regula negativamente a transcrição PTEN através do bloqueio do gene de resposta de crescimento precoce 1 (Egr1), (LAU et al., 2011). Foi demonstrado que Egr1 ativa a transcrição de PTEN diretamente por sua ligação no promotor do PTEN (VIROLLE et al., 2011).

Quando o PTEN está presente no complexo de junções aderente, estabiliza o signalossome a incluindo a E- caderina e MAGI, sequestrando a β -catenina na membrana plasmática. Assim, a β -catenina não pode ser translocada para o núcleo e consequentemente inibir a transcrição Egr1, ocorrendo então uma transcrição continua da proteína PTEN. Além disso, quando ligada ao signalossome a proteína PTEN fica protegida da degradação proteossomal, resultando em níveis sustentados desta proteína PTEN no citosol, regulando negativamente a via PI3K/AKT, (LAU et al., 2011).

A perda de expressão de E- caderina no câncer provoca perturbações no signalossome, libertando assim a proteína MAGI, a β -catenina e o PTEN. O efeito líquido disso é a degradação proteossomal de PTEN e através da transcrição de inúmeros genes pela β - catenina que é translocada para o núcleo ocorre à inibição de PTEN, (LAU et al., 2011).

Estudos realizados por Li et al. (2004) em carcinomas gástricos demonstraram que a redução na expressão da E-caderina e do PTEN estão relacionados com invasão e metástases e a um pobre prognóstico. Inúmeros estudos têm demonstrado que o PTEN interage com ambas as proteínas E-caderina e com a guanilato-quinase invertida associada à membrana (MAGI-2), para inibir a migração e proliferação celular (WU et al., 2000; TOLKACHEVA et al., 2001; SUBAUSTE et al., 2005; HU, et al., 2007). A afinidade do PTEN por MAGI-2 aumenta quando PTEN é fosforilado na posição Thr-382/383. (TOLKACHEVA et al., 2001).

Estudos em células MCF-7 demonstraram que o PTEN nuclear regula negativamente a fosforilação de p44/42 e ciclina D1 e induz parada do ciclo celular em G1, enquanto o PTEN citoplasmático regula para baixo a fosforilação do Akt e superregula a expressão do p27 e induzindo a apoptose celular. Desta maneira o particionamento do PTEN nucleo/citoplasma regula diferencialmente o ciclo celular e apoptose. (WAITE et al., 2002). A translocação nuclear da proteína PTEN é mediada por difusão passiva, segundo estudos realizados por Liu et al. (2005).

Em adenocarcinoma colorretal foi demonstrada uma diminuição gradual na expressão nuclear do PTEN, comparando sua expressão em células normais e em etapas posteriores de progressão e metástase. O que sugere um papel importante para PTEN na carcinogênese. Além disso, a perda da expressão de PTEN nuclear é um marcador de prognóstico clínico em pacientes com estágio II de câncer colorretal (JANG et al., 2010).

Outros estudos utilizando a linhagem de células MCF7 descobriram que PTEN nuclear é necessário para a parada do ciclo celular e que o PTEN citoplasmático é necessário para a indução a apoptose (CHUNG; ENG, 2005). Estes estudos e outros indicam que o

aumento da translocação nuclear de PTEN está associado com atividade supressora de tumor e a depleção nuclear do PTEN se correlaciona com o aumento da progressão tumoral (GIMM et al., 2000; WHITEMAN et al., 2002; TACHIBANA et al., 2002; ZHOU et al., 2002).

Os mecanismos de importação nuclear do PTEN podem envolver modificações pós-translacionais do PTEN. Por exemplo, resultados de poliubiquitinação levam a degradação de PTEN, enquanto que a monoubiquitinação do PTEN leva a translocação nuclear (TROTMAN et al., 2007). A fosforilação também é outra modificação pós-traducional que ocorre com o PTEN. O domínio C-terminal de PTEN possui importantes sítios de fosforilação (Ser-380, Thr-382/383, Ser-385), que estão envolvidos na regulação da estabilidade do PTEN, atividade e localização (SHENG et al., 1996; TORRES; PULIDO, 2001; CHANG et al., 2008). A fosforilação de PTEN na Ser-380 é regulada durante o estresse oxidativo e está associada com o acúmulo de PTEN nuclear (CHANG et al., 2008).

Detectamos pela imunoistoquímica a proteína c-Kit nos mastocitomas caninos. Seguimos a classificação de Kiupel et al. (2004), para descrever as marcações encontradas nos diferentes graus do mastocitoma. O padrão expressão KIT-I em 4 tumores, KIT-II em 8 tumores, KIT-III em 6 tumores. As amostras tumorais que expressavam KIT-I, três pertenciam ao grau 1 do histopatológico, e um pertencia ao grau 2. As amostras que expressavam KIT-II, dois estavam incluídos nas amostras classificadas como grau 1, e seis pertenciam as classificadas como grau 2. Enquanto que as amostras que expressavam KIT-III todas pertenciam ao grau 3.

Quanto aos animais que apresentaram óbito relacionado ao tumor, dos quatro animais que demonstraram padrão KIT-I nenhum evoluiu a óbito relacionado ao tumor, enquanto dois dos que mostraram padrão KIT-II vieram a óbito. O óbito relacionado ao mastocitoma ocorreu em todos os pacientes com padrão de marcação KIT-III.

Resultados similares foram encontrados para a marcação do c-Kit nas células das linhagens tumorais dos mastocitomas cutâneos caninos pela imunocitoquímica e imunofluorescência. Nós detectamos a proteína c-kit na membrana de algumas células das linhagens de mastocitomas bem diferenciados (Grau 1) na região de junção célula-célula, mas a maioria das células tiveram uma marcação citoplasmática forte e difusa marcações iguais ao tumores de grau 2, foi observado marcação forte por todo citoplasma e uma marcação nuclear forte em algumas células para os de grau 3. Pela imunofluorescência as células dos tumores de grau 1 e 2 tiveram a mesma intensidade mas marcações citoplasmáticas e nucleares, nas células dos tumores de grau 3 houve uma redução da marcação citoplasmática e aumento da

marcação nuclear nestes tumores. Correlacionando nossos resultados para as marcações do c-Kit e da β -catenina foi possível observar que nos graus mais agressivos do mastocitoma com padrão de marcação KIT-III temos um aumento de β -catenina nuclear. Nossos achados corroboram com os encontrados por Webster et al. (2006a), o qual descreve que a localização aberrantes da proteína c-Kit em mastocitomas caninos está associado a um pior prognóstico, quando comparados com os mastocitomas que têm localização perimembranar normal da proteína.

Embora ITD (*internal tandem duplication*) mutações no c-kit e a localização aberrante da proteína c-Kit têm sido bem caracterizadas em mastocitomas cutâneos caninos (LONDON et al., 1999; MA et al., 1999; DOWNING et al., 2002; ZEMKE et al., 2002; PRYER et al., 2003; JONES, et al., 2004; WEBSTER et al., 2006b), pouco se sabe sobre as consequências a jusante destes mutações no nível celular. Todas as mutações do tipo ITD no gene c-KIT, que foram caracterizadas até o momento produz uma ativação constitutiva da proteína c-KIT, na ausência de ligante (LONDON et al., 1999; MA et al., 1999; PRYER et al., 2003) e também tem sido associada com regulação de fosforilação de quinases a jusante por sinais extracelulares (PRYER et al., 2003).

A ligação de SCF ao c-Kit induz a uma homodimerização do receptor e uma autofosforilação nos resíduos de tirosina Y568 e Y570, no domínio justamembranar (BLECHMAN et al., 1993). Estes resíduos de atuam como locais de ancoragem para moléculas de sinalização que contém o domínio Src homologia 2 (SH2) tais como e Janus quinase (JAK), transdutor de sinal e ativador de transcrição (STAT), Src quinase, proteína ativada por mitógeno (MAP) quinase e o domínio fosfatidilinositol-3 (PI3) quinase (MOL et al., 2003).

O c-Kit é expresso nos melanócitos, mastócitos, células estaminais hematopoiéticas, células germinativas e células intersticiais de Cajal (LENNARTSSON et al., 2005). Uma fosforilação constitutiva da proteína c-Kit independente do ligante, pode ocorrer por mutações pontuais no gene c-Kit, que leva a um ganho-de-função, este evento têm sido descritos em diversas doenças neoplásicas, incluindo leucemia de mastócitos (MCL), mastocitose sistêmica e tumores estromais gastrointestinais (MORIYAMA et al., 1996; AKIN; METCALFE, et al., 2004). O imatinib é um inibidor tirosina quinase amplamente usado no tratamento de mastocitoses ou sarcoma de mastócitos (MA et al., 2002; AKIN et al., 2003; VERWEIJ et al., 2004). No entanto, o imatinib não inibe as células que apresentam a mutação D816V, a mutação mais comum de ganho-de-função, em mastocitose sistêmica (FROST et al., 2002; MA

et al., 2002; AKIN et al., 2003). Outros autores demonstraram que o inibidor de tirosina-quinase PKC 412 consegue inibir a ativação D816V KIT *in vivo* e *in vitro* (GOTLIB et al., 2005; GLEIXNER et al., 2006).

Detectamos a marcação da proteína Cx32 usando a imunocitoquímica e imunofluorescência, nas células das linhagens de mastocitomas canino. Nas células de mastocitomas bem diferenciados (Grau 1) a Cx32 foi localizada dispersa no citoplasma. Para os tumores graduados como intermediários (Grau 2) foi observado marcação citoplasmática forte na região perinuclear, e para os tumores graduados como indiferenciados (Grau 3) foi observado uma redução no número e na intensidade das marcação citoplasmáticas.

Observamos imunomarcação forte e puntiforme no citoplasma e núcleo para a Cx32 nas células das linhagens de mastocitomas de grau 1, observamos uma redução da imunomarcação citoplasmática e nuclear para a Cx32, mas algumas marcações de membrana foram vistas nas células das linhagens dos tumores graduados como 2, ausência de marcação citoplasmática e aumento das marcações nucleares para a Cx32 nas linhagens de tumores de grau 3. O primeiro relato de que mastócitos expressão Cx32 foi descrito por Vliagoftis et al. (1999) em seu estudo com mastócitos murinos. Até o momento não existem relatos de estudos da expressão da Cx32 em mastocitomas caninos. Em estudos envolvendo carcinoma epidermóide humano, Chakraborty et al. (2010), observaram que a E-caderina regula diferencialmente a montagem da Connexin43 e Connexin32 em junções de comunicação do tipo gap, foi e demonstrado que a Cx32 não conseguiu montar as junções de comunicação tanto em células nulas de E-caderina quanto em células expressando E-caderina. Além disso a Cx32 aparece em forma de agregados intracelulares de tamanhos variáveis, tanto em células negativas quanto nas positivas para E-caderina. Concluem que a expressão da E-caderina sozinha não é suficiente para induzir a montagem de Cx32 em junções de comunicação do tipo gap de novo. Outros estudos em modelos de camundongos com tumores intestinais (contendo uma mutação no gene APC - polipose adenomatosa coli) observaram que havia uma redução das junções comunicantes mediada pela Cx32 em células Paneth do intestino e em contraste o aumento dos níveis da Cx43 em componentes do estroma de adenomas intestinais (HUSOY et al., 2004). A proteína APC pode desempenhar um papel na regulação da expressão de Cx32 no intestino, possivelmente por meio do controle dos níveis e atividade da β -catenina. É também é possível que a deficiência de APC permita o aumento da proliferação celular e aumento da frequência de mutações, resultando em perda da função expressão Cx32 e das junções de comunicações do tipo gap (KING; BERTRAM, 2005).

Detectamos a marcação da proteína Cx43 usando a imunocitoquímica e imunofluorescência, nas células das linhagens de mastocitomas canino. Utilizando a imunocitoquímica, a marcação da Cx43 nas linhagens de mastocitomas bem diferenciados (Grau 1) foi visualizada como pontos na membrana, além de uma marcação forte e puntiforme dispersa por todo citoplasma nas células dos tumores graduados como intermediários (Grau 2), e marcação citoplasmática forte difusa concentrada na região próxima do núcleo. Com relação aos tumores graduados como indiferenciados (Grau 3) foi observado uma redução no número das marcações citoplasmáticas as quais se apresentaram dispersas por todo citoplasma. Na imunofluorescência observamos a imunomarcação na membrana na região de contato célula-célula juntamente com a marcação nuclear e citoplasmática forte para a Cx43 nas células das linhagens de mastocitomas de grau 1 e 2. Nas células provenientes dos tumores graduados como 3, houve uma redução na intensidade das imunomarcações nucleares e um aumento das marcações citoplasmáticas que se apresentaram puntiformes. Além disso, foram vistas algumas marcações de membrana na região de contato célula-célula.

Em seus estudos Chakraborty et al. (2010), demonstraram que a Cx43 consegue montar junções de comunicação tanto em células nulas de E-caderina quanto em células expressando E-caderina. Por outro lado, em células expressando a E-caderina a comunicação via Cx43 foi mais intensa, mas, a expressão da caderina teve pouco efeito sobre a comunicação juncional. Portanto, segundo este estudo a Cx43 é capaz de montar as junções de comunicação na ausência de E-caderina. A adesão célula-célula mediada pela E-caderina facilita a montagem e crescimento de junções de comunicação compostas de Cx43. Inúmeros autores estudaram o evento de contato célula-célula mediados pelo complexo E-caderina-catenina e a possibilidade desses atuarem na formação da junção de comunicação do tipo *gap*. (ATSUMI; TAKEICHI, 1980; KANNO et al., 1984; MUSIL et al., 1990; MEYER et al., 1992).

Atsumi e Takeichi (1980) sugeriram pela primeira vez, que as junções de aderência geradas pelo complexo E-caderina/cateninas devem estar presente para que ocorra a gênese das junções de comunicação do tipo *gap*. O tratamento de células em cultura com anticorpos que bloqueiam a atividade de adesão da E-caderina suprime a transferência do corante entre células (KANNO et al., 1984) e inibem a montagem das junções do tipo *gap*. (MEYER et al., 1992). No entanto, existe a possibilidade de que o efeito do anticorpo seja indireto, uma vez que a inibição da adesão celular mediada pelas junções das caderinas, por vezes induz a

contração das células, que pode indiretamente, afetar a manutenção e montagem das junções do tipo gap.

Já em seus estudos Musil et al. (1990), verificou que a expressão da E-caderina não afetava significativamente a produção das Conexinas, mas afetava a sua fosforilação e seu aparecimento em forma de placas de junção de comunicação em regiões de contato célula-célula. A forma associada da E-caderina/ α -catenina podem se ligar a actina, mas E-caderina sozinha não tem esta capacidade de ligação a actina (NAGAFUCHI et al., 1993). Portanto, a proteína α -catenina é crucial para a interação E-caderina-actina com o citoesqueleto. Isto implica que a formação deste complexo molecular é um pré-requisito para a formação de uma junção tipo gap. Outros autores demonstraram que a E-caderina e α -catenina estão intimamente co-localizadas com as conexinas nas membranas celulares durante reaparecimento da junção gap, e que os locais de contato célula-célula mediado pelo complexo caderina/catenina podem atuar como focos para a formação de junção gap na regeneração de hepatócitos (FUJIMOTO et al., 1997).

Conexinas podem ser canais de comunicação intercelular ou proteínas que desencadeiam processos de proliferação ou de apoptose, dependendo do contexto celular (GOODENOUGH; PAUL, 2003). Outros autores demonstraram que as células derivadas de tumores eram deficientes de expressão de conexinas (LEE et al., 1992; LAIRD et al., 1999) e em estudos de super expressão destas proteínas mostraram diminuição da proliferação celular (YAMASAKI; NAUS, 1996).

Perda da expressão e da função da conexina pode permitir um desvio de percurso no controle celular normal, resultando na redução de reparos de danos ao DNA e aumento da frequência de mutação. Zhu et al. (1997) comprovaram um aumento da frequência de mutações em células Cx43-negativas em comparação com a linhagem de células positivas para Cx43. Embora a expressão de Cx43 seja perdida na maioria das células dos tumores, houve apenas um relato de mutação dentro um gene de Cx43 (DUBINA et al., 2002). Vários estudos têm mostrado que as alterações de metilação no promotor do gene da conexina estão associadas ao silenciamento do gene (MESNIL et al., 2002).

Outros autores mostraram que a expressão do gene Cx43 pode ser regulada através a ativação da via Wnt, e que o promotor da Cx43 é responsivo à ativação transcricional da β -catenina (VAN DER HEYDEN et al., 1998; Ai et al., 2000).

As junções gap são importantes canais de comunicação intercelular que participam não só da manutenção de tecidos normais; também é conhecido que sua perda contribui para o

desenvolvimento de neoplasias (AVANZO et al., 2004; DAGLI et al., 2004). O fluxo de moléculas através das junções gap é considerado um mecanismo chave em praticamente todos os processos do ciclo da vida de uma célula (VINKEN et al., 2006). A deficiência de conexinas aumenta a susceptibilidade tanto para carcinogênese espontânea quanto para a induzida quimicamente, embora a inibição do crescimento causada por transfecção de genes que codificam conexinas, nem sempre esteja associada ao aumento da atividade das comunicações por junções comunicantes (VINKEN et al., 2006).

Detectamos a marcação da triptase usando a imunocitoquímica e imunofluorescência, nas células das linhagens de mastocitomas canino. A imunomarcação da triptase pela imunocitoquímica foi visualizada uma marcação puntiforme forte no citoplasma de algumas células das linhagens de mastocitomas bem diferenciados (Grau 1), nas células dos tumores graduados como intermediários (Grau 2) tiveram uma redução desta marcação citoplasmática. Nas células das linhagens dos tumores indiferenciados (Grau 3) a marcação citoplasmática foi escassa e se apresentou mais perinuclear.

Na imunofluorescência, a marcação para a Triptase nas células das linhagens de mastocitoma de grau 1 foi observada como uma imunomarcação puntiforme na membrana, citoplasma e núcleo, nas linhagens de mastocitomas de grau 2 observamos imunomarcações médias difusas no citoplasma e um aumento da marcação nuclear para triptase. Nas linhagens dos tumores graduados como 3 observamos um aumento na imunomarcação nuclear e uma redução da citoplasmática. Nossos resultados corroboram com os achados de Fernandez et al. (2005), em que as células de tumores de mastocitomas muito imaturos, não foi detectado a expressão da triptase pela imunoistoquímica, pois nestes mastócitos tumorais ainda não tinham desenvolvido as proteases específicas como a triptase e quimase dentro dos seus grânulos. Quando compararam com o diagnóstico histológico, a triptase foi detectada em todos os mastocitomas de grau 1, não foi detectada em um dos mastocitomas de grau 2, e cerca de metade dos mastocitomas de grau 3. (FERNANDEZ et al., 2005), Os resultados da expressão da triptase em nosso estudo comprova o fato de que realmente estamos com populações de mastócitos tumorais de diferentes graus em cultivo.

Imunomarcação forte para vimentina foi observada no citoplasma e núcleo de todas as células das linhagens de mastocitomas bem diferenciados (Grau 1). As células dos tumores graduados como intermediários (Grau 2) tiveram uma redução desta marcação citoplasmática e nuclear. Nas células das linhagens dos tumores indiferenciados a marcação citoplasmática e nuclear foi similar aos tumores de grau 2. A vimentina é uma proteína usada como um

marcador para tecidos derivados do mesoderma. Realizamos a análise pela imunocitoquímica somente para demonstrar a origem mesenquimal das células das linhagens por nós estabelecidas.

Com relação ao cultivo celular dos mastocitomas, observamos que os mastócitos tumorais se apresentam de forma aderentes a garrafa de cultivo. Nossos resultados demonstram que após o estabelecimento dos cultivos celulares dos mastocitomas, ocorre uma seleção dos clones mais agressivos que passam a representar a linhagem. Constatou-se que em um tumor de grau 1 aparentemente bem diferenciado podem existir células com grau de malignidade maior que levam a um alto índice de proliferação. O que observamos nestes três anos de cultivo dos mastócitos tumorais é que eles são dependentes do contato célula-célula, pois em culturas bem confluentes os mastócitos continuam a se proliferar indefinidamente, mas se forem colocados em um ambiente onde as células ficam dispersas e em baixa densidade elas entram em senescência e morrem. O que observamos é que alguns tumores de alto grau pareciam ser dependentes de SCF, como em nosso estudo não submetemos os cultivos com meio contendo o fator de crescimento SCF, inúmeras linhagens morreram, ou não se proliferaram *in vitro*. Notamos que a ação da tripsina sobre os mastócitos aderentes estimulava a degranulação massiva de algumas células e consequentemente o rompimento da membrana celular e morte. Inúmeras linhagens apresentaram uma alta concentração de restos celulares após a tripsinização, então as culturas eram cuidadas de forma que não fosse preciso tripsinizar muitas vezes para expandir os cultivos, deixando por até um mês sem tripsinizar, só lavando as células com PBS 1x e colocando 50% de meio novo e 50% de meio condicionado por elas mesmas que era então centrifugado para tirar os debris celulares. Realizamos com sucesso o estímulo a de uma medula óssea canina a se diferenciar em mastócito normal, para ser usado como nosso controle nos experimentos. A análise do ciclo celular e da ploidia de DNA que nos revelou que a grande maioria das células das diferentes linhagens de mastocitomas está na fase G1 do ciclo celular e são diploides, pois os valores obtidos da média do índice de proliferação foram em torno de 1,03 a 1,093. Realizamos posteriormente a análise do tempo de proliferação realizado pelo CFSE revelou que as sete linhagens celulares submetidas à análise apresentaram uma taxa de proliferação celular acima de 60% após 24 horas de cultivo. A linhagem T15 (grau 2), foi a que proliferou menos, as linhagens T06 (grau 3), T16 (grau 2), T12 (grau 1) e T18 (grau 2), tiveram aproximadamente a mesma taxa de proliferação. As maiores taxas de proliferação foram observadas para as linhagens T10 (grau 1) e T17 (grau 2), estas duas linhagens estavam em cultivo contínuo por

mais de três meses, o estresse pela troca de meio, tripsinização, mudança de temperatura pode ter estimulado a se proliferarem muito mais que as outras linhagens, ou houve a seleção de clones mais agressivos nestas duas linhagens, que até então foram classificadas como tumores de grau 1 e 2 segundo Patnaik et al. (1984).

Apesar dos resultados da imunocitoquímica comprovando a expressão do c-kit, triptase e vimentina, fomos questionados se as linhagens eram de fato mastócitos tumorais, pois não era possível a realização da coloração com azul de toluidina, visto que os grânulos das células não coravam adequadamente. Para complementar o estudo, fixamos um total de $1,2 \times 10^6$ células por ml de todas as linhagens com glutaraldeído 2,5% e realizamos a análise morfológica pela microscopia eletrônica de transmissão. Nossos resultados comprovam que de fato todas as linhagens pertencem a células de mastócitos tumorais em diferentes estágios de diferenciação. As células provenientes de medula óssea contêm inúmeros grânulos com conteúdo eletro densos ainda imaturos. Submetemos as células de uma mesma linhagem que se apresentava em diferentes aspectos em cultivo, em suspensão, redondas e fusiformes, e comprovamos que todas as formas distintas eram de fato mastócitos tumorais, as que se encontravam em suspensão apresentavam uma grande quantidade de vacúolos em seu citoplasma e pareciam estar em degeneração. As demais tinham um aspecto similar às outras linhagens, apresentando as figuras de mielina bem formadas com conteúdo granular bem definido em seu interior. Também resolvemos analisar qual era o aspecto das células de um tumor recém-coletado, então submetemos os micro fragmentos do tumor de grau 2 a uma análise da ultraestrutura pela microscopia eletrônica e comprovamos que de fato as células apresentam uma enorme grande quantidade de grânulos em seu citoplasma como também esses grânulos apresentam-se repletos de conteúdo.

Diante dos resultados apresentados nos cultivos celulares e do padrão de expressão dos diferentes marcadores moleculares, surgiu mais uma dúvida, será que o gene c-kit dessas linhagens celulares estaria mutado, e quais seriam as mutações? Procedemos à análise dos exons 8, 10-11 e 17 pelo sequenciamento gênico, realizamos a análise somente da fita *sense*. A análise do eletroferograma do éxon 8 revelou uma inserção de uma guanina nos dois alelos do gene no códon 414 que leva a uma mudança no sentido da leitura gerando um códon de parada no aminoácido 422, descobrimos também que existe a troca de uma Guanina por uma Adenina no códon antigo 425, agora 426 devido a inserção do G na códon 414, o aminoácido treonina codificado pelo códon 425 se transforma em uma glutamina no códon 426, e quando ocorre a troca do G por A no códon 426, a glutamina se transforma em uma lisina, deleção em

heterozigose. Ainda neste mesmo códon observamos outro evento, a deleção da guanina nos dois alelos e inserção da adenina no códon 426, mutação em homozigose. Observamos a inserção da guanina no códon 414 em todas as linhagens em estudo, a mutação no códon 426 em heterozigose foi observada nas linhagens T05, T10, T16 e T18. A mutação no códon 426 em homozigose foi observada nas linhagens T06, T07, T12, T13, T15 e T17. No códon 442 existe outra troca de uma Guanina por uma Adenina, este evento foi visto em todas as linhagens de mastocitomas.

Ao analisarmos os eletroferogramas do exon 10-11 do gene c-Kit, e observamos que o exon 10 não tem nenhuma alteração em todas as linhagens celulares, o exon 11 apresentou uma mutação em heterozigose no códon 576, onde uma Citosina foi trocada por uma Adenina, esta troca transforma um aminoácido tirosina em um códon de parada na proteína (UAC – UAA). As linhagens T05, T06, T10, T12 e T16 não apresentaram alteração no códon 576 do éxon 11, mas as linhagens T07, T13, T15, T17 e T18 apresentaram a mutação no códon 576 em heterozigose. Analisamos também o exon 17 do gene c-Kit o qual se apresentou normal em todas as linhagens estudadas. Não observamos nenhuma relação entre as mutações encontradas e a proliferação celular das linhagens.

O objetivo maior deste trabalho foi identificar novos marcadores do mastocitoma canino e relacionar com o receptor tirosino quinase c-Kit um marcador clássico do mastocitoma canino, em amostras *ex-vivo* e *in vitro*. Nossos resultados foram surpreendentes quando correlacionamos às expressões destes marcadores com a graduação histológica dos mastocitomas caninos, houve uma redução significativa dos marcadores que desempenham uma função supressora de tumor como a E-caderina/cateninas e PTEN nos tumores mais anaplásicos e um aumento da expressão do c-Kit e conexina 43. Os tumores com menor expressão do c-Kit correlacionam-se com maior expressão das proteínas do complexo caderina cateninas e PTEN.

A importância do entendimento do mecanismo de funcionamento do receptor de tirosino quinase se dá pelas futuras possibilidades de tratamento direcionado a moléculas alvo que podem estar ativando constitutivamente o receptor, independente de este ter ou não uma mutação. Todos os marcadores analisados estão interligados ou interligam vias de sinalização, então um distúrbio em qualquer um destes marcadores vai desencadear uma resposta de inibição de sua expressão fisiológica, levando a uma proliferação sem controle.

Uma localização subcelular para o PTEN, com um predomínio de expressão citoplasmática esta envolvida na indução a apoptose, enquanto que a expressão nuclear é

responsável pela parada do ciclo celular na fase G1. Lembrando que o PTEN estabiliza o complexo de adesão E-caderina/cateninas na membrana celular, então somente a localização subcelular de PTEN já poderia ser interpretada como um fator importante para estimular a proliferação dos mastócitos tumorais. A MMP-7 é um regulador negativo da E-caderina, nossos resultados da MMP-7 revelaram que esta enzima está sendo expressão em grande quantidade nos tumores bem diferenciados, onde as células ainda apresentam certa diferenciação e o complexo de adesão ainda poderia ser reestabelecido, houve uma redução significativa nos tumores mais indiferenciados, o que justifica, pois estas células não conseguem atingir um grau de diferenciação que permita a expressão de alguns marcadores de diferenciação, como por exemplo, as E-caderinas em suas membranas. Como o principal substrato da MMP-7 são as E-caderinas, deve existir um feedback negativo que regula a expressão da MMP-7 para baixo quando já não é mais necessária, uma vez que estes complexos de adesão não conseguem mais ser montados na membrana celular.

Os resultados conjuntos da análise da expressão dos diferentes marcadores nos permite afirmar que a proteína c-Kit está diretamente ligada à desestabilização do complexo E-caderina/cateninas, pois o c-Kit pode fosforilar a β -catenina quando este é ativado pelo SCF e consequentemente levar a desestabilização do complexo de adesão e ao mesmo tempo em que estimula a proliferação celular via ligação da B-catenina ao fator LEF/TCF no núcleo das células.

Diante dos resultados obtidos para a expressão da Cx32 nos mastocitomas caninos, podemos deduzir que a perda das montagens das junções de comunicação via Cx32 pode ser importante para a transformação neoplásica corroborando os dados da literatura, pois os mastocitomas de grau 1 já apresentavam uma localização subcelular para a Cx32.

Os resultados da expressão da Cx43 nos mastocitomas caninos revelou que ocorre um aumento de sua expressão uma vez que sua transcrição é mediada pela B-catenina nuclear, então a desestabilização do complexo E-caderina/cateninas promove um aumento citoplasmático da expressão da Cx43, mas não necessariamente um aumento das junções de comunicação via Cx43, pois as junções de adesão são necessárias para que ocorra um aumento de fato da comunicação via Cx43.

Na ausência da E-caderina o complexo de adesão intercelular não é montado, ocorrendo à ativação dos fatores de crescimento via β -catenina, a proteína E-caderina tem um papel efetor chave no desenvolvimento e proliferação dos mastocitomas caninos.

A presença da β -catenina no complexo proteico E-caderina/cateninas na membrana celular se faz necessária para a integridade das junções de adesão, uma vez que a própria β -catenina quando em localização subcelular vai inibir este complexo proteico via ativação da transcrição de genes responsáveis pela proliferação celular, dentre eles a MMP-7.

Os nossos resultados revelaram uma perda significativa da expressão citoplasmática α -catenina nos mastocitomas caninos de grau 2 e 3. Como a α -catenina atua na ligação do complexo proteico E-caderina/cateninas aos filamentos de actina, sua ausência compromete a montagem deste complexo, inúmeros relatos de mutação na α -catenin em tumores humanos, levando a translocação nuclear da B-catenina e ativação de fatores de crescimento que vão estimular receptores tirosina quinase na membrana celular. A ausência da α -catenina pode ser o programa efector no desenvolvimento destes tumores.

Nossos dados aqui apresentados sugerem que o aumento da atividade transcriçional gerada pela β -catenina nuclear, juntamente com atividade desregulada do receptor tirosina-quinase, podem ser os responsáveis pela malignidade dos mastocitomas caninos. Talvez a β -catenina possa representar um alvo terapêutico muito mais importante nestas neoplasias, já que inibidores tirosina quinase podem não ser eficazes devido as diferentes mutações encontradas no gene c-Kit em mastocitomas caninos.

A finalidade maior de se realizar estudos morfológicos, funcionais e moleculares das neoplasias é contribuir, mais cedo ou mais tarde, para o controle destas doenças. Esperamos, com este trabalho, ter fornecido informações importantes que favorecerão a busca por melhores tratamentos dos mastocitomas caninos.

Conclusão

7 CONCLUSÕES

Diante dos resultados expostos podemos concluir que:

- Houve correlação entre o grau histológico dos mastocitomas caninos segundo Patnaik et al., 1984, e a sobrevida dos animais.
- Estabelecemos e caracterizamos com sucesso a cultura primária de 10 linhagens de mastocitomas nas três graduações. A avaliação ultraestrutural comprovou que as células em cultivo são de fato mastócitos tumorais, em diferentes estágios de diferenciação. A análise do ciclo celular e ploidia DNA revelaram que os mastócitos tumorais estão na fase G1 do ciclo e que as células são predominantemente diploides. A análise da proliferação celular pelo método CFSE revelou que as células atingem seu pico máximo de proliferação em 24 hs.
- Encontramos diferenças significativas nas expressões (por imunoistoquímica) dos marcadores moleculares PTEN, E-caderina, beta-catenina, alfa catenina, p120, c-Kit, Conexina 32, Conexina 43 e MMP7, estudados tanto em amostras *ex-vivo* quanto *in vitro* de mastocitomas caninos.
- Mutações em c-Kit diferentes das relatadas na literatura foram encontradas nos mastocitomas estudados.
- Este estudo nos ajudou a compreender um pouco mais as alterações e possíveis interações moleculares e mecanismos que desencadeiam a transformação neoplásica dos mastócitos.

Referências

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, 1999.
- AI, Z.W.; FISCHER, A.; SPRAY, D. C.; BROWN, A. M. C.; FISHMAN, G. I. Wnt-1 regulation of connexin43 in cardiac myocytes. **Journal Clinical Investigation**, v. 105, 161-171, 2000.
- AIBA, S.; NAKAGAWA, S.; OZAWA, H.; TAGAMI, H. Different expression of E-cadherin by two cutaneous gamma/delta TcR1 T-cell subsets, V gamma 5- and V gamma 51 gamma/delta TcR1 T cells. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 105, n. 4, p. 379-382, 1995.
- AKIN, C.; BROCKOW, K.; D'AMBROSIO, C.; KIRSHENBAUM, A. S.; MA, Y.; LONGLEY, B. J.; METCALFE, D. D. Effects of tyrosine kinase inhibitor STI571 on human mast cells bearing wild-type or mutated c-kit. **Experimental Hematology**, v. 31, p. 686-692, 2003.
- AKIN, C.; METCALFE, D. D. Systemic mastocytosis. **Annual Review of Medicine**, v. 55, p. 419-432, 2004.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Biologia molecular da célula**. 3 ed. Porto Alegre. Artes Medicas. 1997. 1294 p.
- ALLANDER, S. V.; NUPPONEN, N. N.; RINGNÉR, M.; HOSTETTER, G.; MAHER, G. W.; GOLDBERGER, N.; CHEN, Y.; CARPTEN, J.; ELKAHLOUN, A. G.; MELTZER, P. S. Gastrointestinal stromal tumors with KIT mutations exhibit a remarkably homogeneous gene expression profile. **Cancer Research**, v. 61, p. 8624-8862, 1999.
- ANASTASIADIS, P. Z.; REYNOLDS, A. B. The p120 catenin family: complex roles in adhesion, signaling and cancer. **Journal Cell Science**, v. 113, n. 8, p. 1319-1334, 2000.
- ANASTASIADIS, P. Z. p120-ctn: a nexus for contextual signaling via Rho GTPases. **Biochimistry Biophys Acta**, v. 1773, p. 34-46, 2007.
- ANDRE, C.; MARTIN, E.; CORNU, F.; HU, W. X.; WANG, X. P.; GALIBERT, F. Genomic organization of the human c-kit gene: evolution of the receptor tyrosine kinase subclass III. **Oncogene**, v. 7, p. 685-691, 1992.
- ANDRE, C.; HAMPE, A.; LACHAUME, P.; MARTIN, E.; WANG, X. P.; MANUS, V.; HU, W. X.; GALIBERT, F. "Sequence analysis of two genomic regions containing the KIT and the FMS receptor tyrosine kinase genes." **Genomics**, v. 39, n. 2, p. 216-226, 1997.

ANZAI, C.; HAMPE, A.; LACHAUME, P.; MARTIN, E.; WANG, X. P.; MANUS, V.; HU, W. X.; GALIBERT, F. Associated with the transmembrane 4 superfamily proteins constitutes a functionally distinct subunit in human hematopoietic progenitors. **Blood**, v. 99, n. 12, p. 4413-4421, 2002.

ARMEANU, S.; BIIHRING, H.-J.; REUSS-BORST, M.; MILLER, C. A.; KLEIN, G. E-Cadherin Is Functionally Involved in the Maturation of the Erythroid Lineage. **The Journal of Cell Biology**, v. 131, n. 1, p. 243-249, 1995.

AROK, M. "Similitudes et différences entre les mastocytes et le polynucléaire basophile." **Revue Française Allergologie**, v. 44, n. 1, p. 23-36, 2004.

ASHMAN, L. K. The biology of stem cell factor and its receptor C-kit. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 31, p. 1037-1051, 1999.

ATSUMI, T.; TAKEICHI, M. Cell association pattern in aggregates controlled by multiple cell-cell adhesion mechanisms. **Development Growth & Differentiation**, v. 22, p. 133-142, 1980.

AUXILIA, S.; HILL, P. "Mast cell distribution, epidermal thickness and hair follicle density in normal canine skin: possible explanations for the predilection sites of atopic dermatitis?" **Veterinary Dermatology**, v. 11, p. 247-54, 2000.

AVANZO, J. L.; MESNIL, M.; HERNANDEZ-BLAZQUEZ, F. J.; MACKOWIAK, I. I.; MORI, C. M. C.; DA SILVA, T. C.; OLORIS, S. C. S.; GARATE, A.P.; MASSIRONI, S.M.G.; YAMASAKI, H.; ZAIDAN DAGLI, M. L. Increased susceptibility to urethane-induced lung tumors in mice with decreased expression of connexin43. **Carcinogenesis**, v. 25 p. 1973-1982, 2004.

AYL, R.; COUTO, C.; HAMMER, A.; WEISBRODE, S.; ERICSON, J.; MATHES, L. "Correlation of DNA ploidy to histologic grade, clinical variables, and survival in dogs with mast cell tumors." **Veterinary Pathology**, v. 29, p. 386-90, 1992.

BAKI, L.; MARAMBAUD, P.; EFTHIMIOPOULOS, S.; GEORGAKOPOULOS, A.; WEN, P.; CUI, W.; SHIOI, M. J.; KOO, M. E.; OZAWA, M. M.; FRIEDRICH JR., M. V. L.; ROBAKIS, N. K. Presenilin-1 binds cytoplasmic epithelial cadherin, inhibits cadherin/p120 association, and regulates stability and function of the cadherin/catenin adhesion complex. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, p. 2381-2386, 2001.

BANKFALVI, A.; TERPE, H. J.; BREUKELMANN, D.; BIER, B.; REMPE, D.; PSCHADKA, G.; KRECH, R.; LELLÈ, R. J.; BOECKER, W. Immunophenotypic and prognostic analysis of E-cadherin and beta-catenin expression during breast carcinogenesis and tumor progression: a comparative study with CD44. **Histopathology**, v. 34, n. 1, p. 25-34, 1999.

BANKFALVI, A.; KRABORT, M.; VEGH, A.; FELSZEGHY, E.; PIFFKO, J. Deranged expression of the E-cadherin/B-catenin complex and the epidermal growth factor in the

clinical evolution and progression of oral squamous cell carcinomas. **Journal Oral, Pathology Medicine**, v. 31, n. 8, p. 450-457, 2002.

BARSUMIAN, E.; MCGIVNEY, A.; BASCIANO, L. K.; SIRAGANIAN, R. P. Establishment of four mouse mastocytoma cell lines. **Cell Immunology**, v. 90, n. 1, p. 131-141, 1995.

BARRA, M. B. O uso da imunoistoquímica no diagnóstico: indicações e limitações. *Revista da AMRIGS*, v. 50, n. 2, p. 173-184, 2006.

BASHFORD, E. F.; MURRAY, J. A.; CRAMER, W. Comparison between the transmission of an infective granuloma of the dog and carcinoma of the mouse. **Scientific Report**, Imperial Cancer Research Fundation, v. 2, p. 33-37, 1905.

BAUER, O.; RAZIN, E. Mast Cell-Nerve Interactions. **News in Physiological Sciences**, v. 15, p. 213-218, 2000.

BEAVON, I. R. G. The E-cadherin-catenin complex in tumor metastasis: structure, function and regulation. **Europe Journal Cancer**, Oxford, v.36, n. 13, p. 1607-1620, 2000.

BEIL, W.; PAMMER, J. "In situ detection of the mast cell proteases chymase and tryptase in human lung tissue using light and electron microscopy." **Histochemistry Cell Biology**, v. 116, p. 483-93, 2001.

BENINGO, K.; SCOTT, D.; ERB, H. "Subepidermal linear alignment of mast cells in inflammatory dermatoses of the dog." **Veterinary Dermatology**, v. 11, p. 13-16, 2000.

BENSIGNOR, E.; DELISLE, F.; DEVAUCHELLE, P. "Les mastocytomes du chien." **Le Point Veterinary**, v. 27, n. 173, p. 925-932, 1996.

BENOIST, C.; MATHIS, D. Mast cells in autoimmune disease. **Nature**, 420, 875–878, 2002.

BERGMAN, P. J.; OGILVIE, G. K.; POWERS, B. E. Monoclonal Antibody C219 Immunohistochemistry Against P-Glycoprotein: Sequential Analysis and Predictive Ability in Dogs With Lymphoma. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 10, n. 6, p. 354-359, 1996

BERX, G.; BECKER, K. F.; HOFER, H.; VAN ROY, F. Mutations of the human E-cadherin (CDH1) gene. **Human Mutation**, v. 12, p. 226-237, 1998.

BEYER, E. C.; PAUL, D. L.; GOODENOUGH, D. A. Connexin 43: a protein from rat heart homologous to a gap junction protein from liver. **Journal of the Cell Biology**, v. 105, p. 2621-2629, 1987.

BIENZ, M.; CLEVERS, H. Linking colorectal cancer to Wnt signaling. **Cell**, v. 103, p. 311-320, 2000.

BLAIR, R. J.; MENG, H.; MARCHESE, M. J.; REN, S.; SCHWARTZ, L. B.; TONNESEN, M. G.; GRUBER, B. L. Human mast cells stimulate vascular tube formation. Tryptase is a

- novel, potent angiogenic factor. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 99, p. 2691-2700, 1997.
- BLECHMAN, J. M.; LEV, S.; GIVOL, D.; YARDEN, Y. Structure-function analyses of the kit receptor for the steel factor. **Stem Cells**, v. 11 p.12-21, 1993. Supplement, 2.
- BLOOM, F. Spontaneous solitary and multiple mast cell tumors (mastocytoma) in dogs. **Archives of Pathology**, v. 33, p. 661-676, 1942.
- BRABLETZ, T.; JUNG, A.; DAG, S.; HLUBEK, F.; KIRCHNER, T. Beta-catenin regulates the expression of the matrix metalloproteinase-7 in human colorectal cancer. **American Journal Pathology**, v. 155, n. 4, p. 1033-1038, 1999.
- BROUDY, V. C.; UN, N. L.; LILES, W. C.; COREY, S. J.; LAUGHLIN, B. O.; MOU, S.; LINNEKIN, D. Signaling via src family kinases is required for normal internalization of the receptor c-Kit. **Blood**, v. 94, p. 1979-1986, 1999.
- BOSTOCK, D. E. The prognosis following surgical removal of mastocytomas in dogs. **Journal of Small Animal Practice**, v. 14, p. 27-40, 1973.
- BUCKLEY, M.; McEUN, A.; WALLS, A. "The Detection of mast cell subpopulations in formalin-fixed human tissues using a new monoclonal antibody specific for chymase." **Journal of Pathology**, v. 189, p. 138-143, 1999.
- BUHRING, H. J.; MULLER, T.; HERBST, R.; COLE, S.; RAPPOLD, I.; SCHULLER, W.; ZHU, X.; FRITZSCH, U.; FAUL, C.; ARMEANU, S.; ULLRICH, A.; KLEIN, G.; and SCHMIDT, H. The adhesion molecule E-cadherin and a surface antigen recognized by the antibody 9C4 are selectively expressed on erythroid cells of defined maturational stages. **Leukemia**, v. 10, p. 106-116, 1996.
- CAHALANE, A. K.; PAYNE, S.; BARBER, L. G.; DUDA, L. E.; HENRY, C. J.; MAULDIN, G. E.; FRIMBERGER, A. E.; COTTER, S. M.; MOORE, A. S. prognostic factors for survival of dogs with inguinal and perineal mast cell tumors treated surgical with or without adjunctive treatment: 68 cases (1994-2002). **Journal of the American Veterinary Medical association**, v. 225, n. 3, p. 401-408, 2004.
- CAIRNS, B. L.; WALLS, A. F. Mast cell tryptase stimulates the synthesis of type I collagen in human lung fibroblasts. **Journal of Clinical Investigation**, v. 99, p. 1313-1321, 1997.
- CALVERT, C. A. Canine viral and transmissible neoplasm. In: GREENE, C. E. (Ed.). **Clinical microbiology and infectious diseases of the dog and cat**. Philadelphia: W.B. Saunders Co., p. 469-475, 1984.
- CAPUANO, A. C. T. **Estudo da expressão das proteínas PTEN e AKT em células derivadas de carcinoma epidermóide bucal em câmara invasão**. 2005.73 f. Tese (Doutorado Faculdade de Odontologia) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

CARTER, M.; METCALFE, D. "Paediatric mastocytosis." **Archives of Disease in Childhood**, v. 86, p. 315-19, 2002.

CANÔNICO, B.; FELICI, C.; PAPA, S. CD117. **Journal Biologic Regulation Homeostasis Agents**, v. 15, p. 90-94, 2001.

CAUGHEY, G.; LAZARUS, S.; VIRO, N.; GOLD, W.; NADEL, J. "Tryptase and chymase: comparison of extraction and release in two dog mastocytoma lines." **Immunology**, v. 63, p. 339-344, 1988.

CAUGHEY, G.; RAYMOND, W.; VANDERSLICE, P. "Dog Mast Cell Chymase: Molecular Cloning and Characterization." **Biochemistry**, v. 29, p. 5166-5171, 1990.

CAUGHEY, G. "Mast Cell Tryptase: Hoisted by Its Own Petard?" **Journal Clinical Investigation**, v. 97, n. 4, p. 895-896, 1996.

CAUX, C.; VANBERVLIET, B.; MASSACRIER, C.; DEZUTTER-DAMBUYANT, C.; de SAINT-VIS, B.; JACQUET, C.; YONEDA, K.; IMAMURA, S.; SCHMITT, D.; BANCHEREAU, J. CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to GM-CSF1TNF alpha. **Journal of Experimental Medicine**, v. 184, p. 695-706, 1996.

CAUWE, B.; VAN DEN STEEN, P. E.; OPDENAKKER, G. The Biochemical, Biological, and Pathological Kaleidoscope of Cell Surface Substrates Processed by Matrix Metalloproteinases. **Critical Reviews Biochemistry and Molecular Biology**, v. 42, p. 113-185, 2007.

CAVALLARO, U.; CHRISTOFORI, G. Cell adhesion and signalling by cadhrins and Ig-CAMs in câncer. **Nature Reviews Cancer**, v. 4, p. 118-132, 2004.

CHANG, H. W.; CHOW, V.; LAM, K. Y.; WEI, W. I.; YUEN, A. Loss of E-cadherin expression resulting from promoter hypermethylation in oral tongue carcinoma and its prognostic significance. **Cancer**, v. 94, p. 386-392, 2002.

CHAKRABORTY, S.; MITRA, S.; FALK, M. M.; CAPLAN, S.; WHEELLOCK, M. J.; JOHNSON, K. R.; MEHTA, P. P. E-cadherin differentially regulates the assembly of connexin43 and connexin32 into gap junctions in human squamous carcinoma cells. **Journal Biology. Chemistry**, v. 285, p. 10761-10776, 2010.

CHEN, X. S.; KOJIMABORISY, G. G.; GREEN, K. J. p120 catenin associates with kinesin and facilitates the transport of cadherin-catenin complexes to intercellular junctions. **Journal Cell Biology**, v.163, p. 547-557, 2003.

CHETTY, R.; SERRA, S.; ASA, S. L. Loss of membrane localization and aberrant nuclear E-cadherin expression correlates with invasion in pancreatic endocrine tumours. **The American Journal of Surgical Pathology**, v. 32, p. 413-419, 2008.

- CHOU, Y. H.; ROSENVAR, E.; GOLDMAN, R. D. "Phosphorylations and disassembly of intermediate filaments in mitotic cells." **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 86, p. 1885-1889, 1989.
- CHUNG, E. J.; HWANG, S-G.; NGUYEN, P.; LEE, S.; KIM, J-S.; KIM, J. W.; HENKART, P. A.; BOTTARO, D. P.; SOON, L.; BONVINI, P.; LEE, S-J.; KARP, J. E.; OH, H. J.; RUBIN, J. S.; TREPEL, J. B. Regulation of leukemic cell adhesion, proliferation, and survival by beta-catenin. **Blood**, v. 100, p. 982-990, 2002.
- CROSIER, P. S.; RICCIARDI, S. T.; HALL, L. R.; VITAS, M. R.; CLARK, S. C.; CROSIER, K. E. Expression of isoforms of the human receptor tyrosine kinase c-kit in leukemic cell lines and acute myeloid leukemia. **Blood**, v. 82, p. 1151-1158, 1993.
- COHEN, D.; REIF, J. S.; BRODEY, R. S.; KEISER, H. Epidemiological analysis of the most prevalent sites and types of canine neoplasia observed in a veterinary hospital. **Cancer Research**, v.34, p. 2859-2868, 1974.
- COSTA, R. M. G.; MATOS, E.; REMA, A.; LOPES, C.; PIRES, M. A.; GÄRTNER, F. CD117 immunoexpression in canine mast cell tumours: correlations with pathological variables and proliferation markers. **BMC Veterinary Research**, v. 3, n. 19, p. 1-7, 2007.
- COSTA CASAGRANDE, T. A. **Avaliação de indicadores de prognóstico para mastocitoma canino: estudo clínico-cirúrgico, histológico, imunoistoquímico, estereológico e de expressão gênica**. 2010. 179 f. Tese (Doutorado Faculdade de Medicina veterinária e Zootecnia) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.
- CONSCIENCE, J. F.; FISCHER, F. An improved preservation technique for cells of hemopoietic origin. **Cryobiology**, v. 22, p. 495-498, 1985.
- CONTRERAS, J. E.; SANCHEZ, H. A.; VELIZ, L. P.; BUKAUSKAS, F. F.; BENNETT, M. V.; SAEZ, J. C. Role of connexin-based gap junction channels and hemichannels in ischemia-induced cell death in nervous tissue. **Brain Research Brain Research Review**, v. 7, p. 290-303, 2004.
- DAGLI, M. L.; YAMASAKI, H.; KRUTOVSKIKH, V.; OMORI, Y. Delayed liver regeneration and increased susceptibility to chemical hepatocarcinogenesis in transgenic mice expressing a dominant-negative mutant of connexin32 only in the liver. **Carcinogenesis**, v. 25, p. 483-492, 2004.
- D'AURIOL, L.; MATTEI, M.; GALIBERT, F. "Localization of the human c-kit protooncogene on the q11-q12 region of chromosome 4." **Human Genetics**, v. 78, p. 374-376, 1988.
- DAVIS, M. A.; IRETON, R. C.; REYNOLDS, A. B. A core function for p120-catenin in cadherin turnover. **Journal Cell Biology**, v. 163, p. 525-534, 2003.
- DE NARDI, A. B.; RODASKI, S.; SOUZA, R. S.; MACEDO, T. R.; RODIGHERI, S. M.; RIOS, A.; PIEKARZ, C. H. Prevalência de neoplasias e modalidades de tratamento

em cães atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal do Paraná.

Archives of Veterinary Science, v. 7, n. 2, p.15-26, 2002.

DE VINNEY, R.; GOLD, W. M. Establishment of two dog mastocytoma cell lines in continuous culture. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 3 n. 5 p.413-420, 1990.

DE VRIES, V.; PINO-LAGOS, K.; ELGUETA, R.; NOELLE, R. J. The enigmatic role of mast cells in dominant tolerance. **Current Opinion in Organ Transplantation**, v. 14, p. 332-337, 2009.

DERKSEN, P. W.; TJIN, E.; MEIJER, H. P.; KLOK, M. D.; MACGILLAVRY, H. D.; OERS, M. H. V.; LOKHORST, H. M.; BLOEM, A. C.; CLEVERS, H.; NUSSE, R.; NEUT, R. V. D.; SPAARGAREN, M.; PALS, S. T. Illegitimate WNT signaling promotes proliferation of multiple myeloma cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, p. 6122-6127, 2004.

DI CRISTOFANO, A.; PANDOLFI, P. P. The multiple roles of PTEN in tumor suppression. **Cell**, v. 100, p. 387-390, 2000.

DRIANCOURT, M. A.; REYNAUD, K.; CORTVRINDT, SMITZ, J. Roles of KIT and KIT LIGAND in ovarian function. **Review Reproduction**, v. 4, p. 143-152, 2000.

DOBSON, J. M.; SCASE, J. Advances in the diagnosis and management of cutaneous mast cell tumors in dogs. **Journal of Small Animal Practice**, v. 48, n. 8, p. 424-431, 2007.

DOWNING, S.; CHIEN, M. B.; KASS, P. H.; MOORE, P. E.; LONDON, C. A. Prevalence and importance of internal tandem duplications in exons 11 and 12 of c-kit in mast cell tumors of dogs. **American Journal Veterinary Research**, v. 63, p. 1718-1723, 2002.

DUBINA, M. V. IATCKII, N. A. POPOV, D. E.; VASIL'EV, S. V.; KRUTOVSKIKH, V. A. Connexin 43, but not connexin 32, is mutated at advanced stages of human sporadic colon cancer. **Oncogene**, v. 21, p. 4992-4996, 2002.

DUNN, T. B.; POTTER, M. A transplantable mast-cell neoplasm in the mouse. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 18, p. 587-601, 1957.

DUNSMORE, S. E.; SAARIALHO-KERE, U. K.; ROBY, J. D.; WILSON, C. L.; MATRISIAN, L. M.; WELGUS, H. G.; PARKS, W. C. Matrilysin expression and function in airway epithelium. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 102, p. 1321-1331, 1998.

DVORAK, A. M.; SCHULMAN, E. S.; PETERS, S. P.; MacGLASHAN, D. W. Jr.; NEWBALL, H. H.; SCHLEIMER, R. P.; LICHTENSTEIN, L. M. Immunoglobulin E-mediated degranulation of isolated human lung mast cells. **Laboratory Investigation**, v. 53, n. 1, p. 45-56, 1985.

DVORAK, A. M.; ISHIZAKA, T. Ultrastructural analysis of the development of human basophils and mast cells in vitro. **International Journal of Clinical & Laboratory Research**, v. 25, n. 1, p. 7-24, 1995a.

DVORAK, A. M.; MORGAN, E. S.; MONAHAN-EARLEY, R. A.; ESTRELLA, P.; SCHLEIMER, R. P.; WELLER, P. F.; TEPPER, R. I.; LICHTENSTEIN, L. M.; GALLI, S. J. Analysis of mast cell activation using diamine oxidase-gold enzyme-affinity ultrastructural cytochemistry. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 107, n. 1-3, p. 87-9, 1995b.

DVORAK, A. M.; MORGAN, E. S.; WELLER, P. F. RNA is closely associated with human mast cell lipid bodies. **Histology Histopathology**, v. 18, p. 943-968, 2003.

ELIAS, P.; FRIEND, D. S. Vitamin-A induced mucous metaplasia. An in vitro system for modulating tight and gap junction differentiation. **Journal Cell Biology**, v. 68, p. 173-188, 1976.

EUGENIN, E. A.; BRANES, M. C.; BERMAN, J. W.; SAEZ, J. C. TNF-alpha plus IFN-gamma induce connexin43 expression and formation of gap junctions between human monocytes/macrophages that enhance physiological responses. **Journal Immunology**, v. 170, p. 1320 -1328, 2003.

EVANS, W. H.; MARTIN, P. E. Lighting up gap junction channels in aflash. **Bioessays**, v. 24, p. 876-880, 2002.

EWING, C. M.; RU, N.; MORTON, R. A.; ROBINSON, J. C.; WHEELLOCK, M. J.; JOHNSON, K. R.; BARRETT, J. C.; ISAACS, W. B. Chromosome-5 suppresses tumorigenicity of PC3 prostate-cancer cells: correlation with reexpression of α -catenin and restoration of E-cadherin function. **Cancer Research**, v. 55, p. 4813-4817, 1995.

FLANAGAN, J. G.; CHAN, D. C.; LEDER, P. Transmembrane form of the kit ligand growth factor is determined by alternative splicing and is missing in the Sid mutant. **Cell**, v. 64, p.1025-35, 1991.

FERNANDEZ, N. J.; WEST, K. H.; JACKSON, M. L.; KIDNEY B. A. Immunohistochemical and Histochemical Stains for Differentiating Canine Cutaneous Round Cell Tumors. **Veterinary Pathology**, v. 42, p. 437-445, 2005.

FLORIAN, S.; SONNECK, K.; CZERNY, M.; HENNERSDORF, F.; HAUSWIRTH, A. W.; BUHRING, H.-J.; VALENT, P. Detection of novel leukocyte differentiation antigens on basophils and mast cell by HLDA8 antibodies. **Allergy**, v. 61, p. 1054-1062, 2006.

FERBER, E. C.; KAJITA, M.; WADLOW, A.; TOBIANSKY, L.; NIESSEN, C.; ARIGA, H.; DANIEL, J.; FUJITA, Y. "A role for the cleaved cytoplasmic domain of E-cadherin in the nucleus." **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 19, p. 12691-12700, 2008.

FILIPPOV, S.; CARAS, I.; MURRAY, R.; MATRISIAN, L. M.; CHAPMAN JR., H. A.; SHAPIRO, S.; WEISS, S. J. Matrilysin-dependent elastolysis by human macrophages. **The Journal Experimental Medicine**, v. 198, p. 925-935, 2003.

FINGLETON, B. "Matrix metalloproteinases as valid clinical targets." **Current Pharmaceutical Design**, v. 13, n. 3, p. 333-346, 2007.

FRANZ, C. M.; RIDLEY, A. J. p120 catenin associates with microtubules: inverse relationship between microtubules binding and Rho GTPase regulation. **Journal Biology Chemistry**, v. 279, p. 6588-6594, 2004.

FROST, M. J.; FERRAO, P. T.; HUGHES T. P.; ASHMAN, L. K. Juxtamembrane mutant V560GKit is more sensitive to Imatinib (STI571) compared with wild-type c-kit whereas the kinase domain mutant D816VKit is resistant. **Molecular Cancer Therapy**, v. 1, p. 1115-1124, 2002.

FOX, E. L.; Mast cell tumors. In: MORRISON, B. W. **Cancer in dogs and cats medical and surgical management**. 1.ed. Philadelphia: Williams & Wilkins, 1998. p. 479-488.

FUJITA, Y.; KRAUSE, G.; SCHEFFNER, M.; ZECHNER, D.; LEDDY, H. E.; BEHRENS, J.; SOMMER, T.; BIRCHMEIER, W. Hakai a c-Cbl-like protein, ubiquitinates and induces endocytosis of the E-cadherin complex. **Nature Cell Biology**, v. 4, p. 222-231, 2002.

FUJIMOTO, K.; NAGAFUCHI, A.; TSUKITA, S.; KURAOKA, A.; OHOKUMA, A.; SHIBATA, Y. Dynamics of connexins, E-cadherin and α -catenin on cell membranes during gap junction formation. **Journal of Cell Science**, v. 110, p. 311-322, 1997.

GALLI, S. J. Mast cells and basophils. **Current Opinion in Hematology**, v. 7, n. 1, p. 32-39, 2000.

GALLI, S. J.; NAKAE, S.; TSAI, M. Mast cells in the development of adaptive immune responses. **Nature Immunology**, v. 6, p. 135-142, 2005a.

GALLI, S.; KALESNIKOFF, J.; GRIMBALDESTON, M.; PILIPONSKY, A.; WILLIAMS, C.; TSAI, M. "Mast Cells as "Tunable" Effector and Immunoregulatory Cells: Recent Advances." **Annual Review Immunology**, v. 23, p. 749-86, 2005b.

GARCIA, G.; BRAZIS, P.; MAJO, N.; FERRER, L.; MORA, F.; PUIGDEMONT, A. Comparative morphofunctional study of dispersed mature canine cutaneous mast cells and BR cells, a poorly differentiated mast cell line from a dog subcutaneous mastocytoma. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 62, p. 323-337, 1998.

GAO, S.; EIBERG, H.; KROGDAHL, A.; LIU, C.-J.; SORENSEN J. A. Cytoplasmic expression of E-cadherin and β -catenin with LOH and hypermethylation of the APC gene in oral squamous cell carcinomas. **Journal Oral Pathology Medicine**, v. 34, n. 2, p. 116-119, 2005.

- GERICKE, A.; MUNSON, M.; ROSS, A. H. "Regulation of the PTEN phosphatase," **Gene**, v. 374, n. 1-2, p. 1-9, 2006.
- GERRITSEN, R. J.; TESKE, E.; KRAUS, J. S.; RUTTERMAN, G. R. Multiagent chemotherapy for mast cell tumors in the dog. **Veterinary Quality**, v. 20, p. 28-31, 1998.
- GHADIALLY, F. N. **Diagnostic ultrastructural pathology a self evaluation manual**. Butterworths: Stoneham, Mass, 1984. 50 p.
- GLEIXNER, K. V.; MAYERHOFER, M.; AICHBERGER, K. J.; DERDAK, S.; SONNECK, K.; BÖHM, A.; GRUZE, A.; SAMORAPOOMPICHIT, P.; MANLEY, P. W.; FABBRO, D.; PICKL, W. F.; SILLABER, C.; VALENT, P. PKC412 inhibits in vitro growth of neoplastic human mast cells expressing the D816V-mutated variant of KIT: comparison with AMN107, imatinib, and cladribine (2CdA) and evaluation of cooperative drug effects. **Blood**, v. 107, p. 752-759, 2006.
- GIBSON, P. C.; COOPER, K. CD117 (KIT): a diverse protein with selective applications in surgical pathology. **Advances in Anatomic Pathology**, v. 9, p. 65-69, 2002.
- GIEPMANS, B. N. G.; HENGVELD, T.; POSTMA, F. R.; MOOLENAAR, W. H. Interaction of c-Src with Gap Junction Protein Connexin-43. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 8544-8549, 2001.
- GIEBEL, L. B.; STRUNK, K. M.; HOLMES, S. A.; SPRITZ, R. A. Organization and nucleotide sequence of the human KIT (mast/stem cell growth factor receptor) proto-oncogene. **Oncogene**, v. 7, p. 2207-2217, 1992.
- GIMM, O.; PERREN, A.; WENG L. P.; MARSH, D. J.; YEH, J. J.; ZIEBOLD, U.; GIL, E.; HINZE, R.; DELBRIDGE, L.; LEES, J. A.; MUTTER, G. L.; ROBINSON, B. G.; KOMMINOTH, P.; DRALLE, H.; ENG, C. "Differential nuclear and cytoplasmic expression of PTEN in normal thyroid tissue, and benign and malignant epithelial thyroid tumors." **American Journal of Pathology**, v. 156, n. 5, p. 1693-1700, 2000.
- GINN, P. E.; FOX, L. E.; BROWER, L. 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.
- GOKKEL, E.; GROSSMAN, Z.; RAMOS, B.; YARDEN, Y.; RECHAVI, G.; GIVOL, D. Structural organization of the murine c-kit proto-oncogene. **Oncogene**, v. 7, p. 1423-1429, 1992.
- GINN-PEASE, M. E.; ENG, C. "Increased nuclear phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10 is associated with G0-G1 in MCF-7 cells." **Cancer Research**, v. 63, n. 2, p. 282-286, 2003.
- GOODENOUGH, D. A.; PAUL, D. L. Beyond the gap: Functions of unpaired connexon channels. **Nature Review Molecular Cell Biology**, v. 4, p. 285-294, 2003.

GOLDSCHMIDT, M. H.; HENDRICK, M. J. Tumors of skin and soft tissues. In: MEUTEN, D. J. **Tumors in domestic animal**. 4. ed. Ames: Iowa State Press, 2002. p. 44-117.

GOTLIB, J.; BERUBE, C.; GROWNEY, J. D.; CHEN, C. C.; GEORGE, T. I.; WILLIAMS, C.; KAJIGUCHI, T.; RUAN, J.; LILLEBERG, S. L.; DUROCHER, J. A.; LICHY, J. H.; WANG, Y.; COHEN, P. S.; ARBER, D. A.; HEINRICH, M. C.; NECKERS, L.; GALLI, S. J.; GILLILAND, D. G.; COUTRÉ, S. E. Activity of the tyrosine kinase inhibitor PKC412 in a patient with mast cell leukemia with the D816V KIT mutation. **Blood**, v. 106, p. 2865-2870, 2005

GOVIER, S. M. principles of treatment for mast cell tumors. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**, v. 18, n. 2, p. 103-106, 2003.

GRAFF, J. R.; GABRIELSON, E.; FUJII, H.; BAYLIN, S. B.; HERMAN, J. G. Methylation patterns of the E-cadherin 50 CpG island are unstable and reflect the dynamic, heterogeneous loss of E-cadherin expression during metastatic progression. **Journal Biology Chemistry**, v. 275, p. 2727-2732, 2000.

GRAHAM, T. A.; WEAVER, C.; MAO, F.; KIMELMAN, D.; XU, W. Crystal structure of a β -catenin/Tcf complex. **Cell**, v. 103, p. 885-896, 2000.

GRICHNIK, J. M.; BURCH, J. A.; SCHULTEIS, R. D.; SHAN, S.; LIU, J.; DARROW, T. L.; VERVAERT, C. E.; SEIGLER, H. F. Melanoma, a tumor based on a mutant stem cell? **Journal Investigation Dermatology**, v. 126, n. 1, p. 142-153, 2006.

GROSS, T. L.; IHRHE, P. J.; WALDER, E. J. A macroscopic and microscopic evaluation of canine and felines skin disease. In: _____. **Veterinary dermatopathology**. St. Louis: Mosby, 1992a. 519 p.

GROSS, T. L.; IHRKE, P. J.; WALDER, E. J. Histiocytic and mast cell tumors. In: _____. **Veterinary dermatopathology**. R. RW. St. Louis, Mosby Year Book: 1992b. p. 465-473.

GROSS, T. L.; IHRKE, P. J.; WALDER, E. J.; AFFOLTER, V. K. Mast cell tumors. Skin Diseases of the Dog and Cat: In: _____. **Clinical and Histopathological Diagnosis**. Oxford, Blackwell Science Ltd: 2005. p. 853-65.

GRUBER, B. L.; KEW, R. R.; JELASK, A.; MARCHESE, M. J.; GARLICK, J.; REN, S.; SCHWARTZ, L. B.; KORN, J. H. Human mast cells activate fibroblasts. tryptase is a fibrogenic factor stimulating collagen mRNA and fibroblast chemotaxis. **Journal of Immunology**, v. 158, p. 2310-2317, 1997.

GUMBINER, B.; SIMONS, K. "The role of uvomorulin in the formation of epithelial occluding junctions." **Ciba Foundation Symposium**, v. 125, p. 168-186, 1987.

GURISH, M.; AUSTEN, K. "The Diverse Roles of Mast Cells." **Journal Experiment Medicine**, v. 194, n. 1, p. 1-5, 2001.

- HABAS, R. Canonical Wnt signaling: an unexpected new player. **Development Cell**, v. 11, n. 2, p. 138-139, 2006.
- HAJRA, K. M.; FEARON, E. R. Cadherin and catenin alterations in human cancer. **Genes Chromosomes Cancer**, v. 34, p. 255-68, 2002.
- HARREL, P. C.; McCAWLEY, L. J.; FINGLETON, B.; McINTYRE, J. O.; MATRISIAN, L. M. "Proliferative effects of apical, but not basal, matrix metalloproteinase-7 activity in polarized MDCK cells." **Experimental Cell Research**, v. 303, n. 2, p. 308-320, 2005.
- HAYASHI, S-I.; KUNISADA, T.; OGAWA, M.; YAMAGUCHI, K.; NISHIKAWA, S-I. Exon skipping by mutation of an authentic splice site of c-kit gene in W/W mouse. **Nucleic Acids Research**, v. 19, p. 267-271, 1991.
- HEBDA, P. A.; COLLINS, M. A.; THARP, M. D. Mast cell and myofibroblast in wound healing. **Dermatologic Clinics**, v. 11, p. 685-696, 1993.
- HENDRICK, M.; MAHAFFEY, E.; MOORE, F.; VOS, J.; WALDER, E. **Histological classification of mesenchymal tumors of skin and soft tissues of domestic animals**. Washington, DC: Armed Forces Institute of Pathology. 1998. v. 2, p. 67-98.
- HERRENKNECHT, K.; OZAWA, M.; ECKERSKORN, C.; LOTTSPEICH, F.; LENTER, M.; KEMLER, R. The uvomorulin-anchorage protein α -catenin is a vinculin homologue. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 88, p. 9156-9160, 1991.
- HEINRICH, M. C.; RUBIN, B. P.; LONGLEY, B. J.; FLETCHER, J. A. Biology and genetic aspects of gastrointestinal stromal tumors: KIT activation and cytogenetic alterations. **Human Pathology**, v. 33, p. 484-495, 2002.
- HEIB, V.; BECKER, M.; TAUBE, C.; STASSEN, M. Advances in the understanding of mast cell function. **British Journal Haematology**, v. 142, p. 683-694, 2008.
- HENDERSON, R. A.; BREWER JR, W. G. Pele e subcutâneo; In: SLATTER, D. **Manual de Cirurgia de Pequenos Animais**, 1998. v. 2, p. 2447-2462.
- HILL, P.; MARTIN, R. "A review of mast cell biology." **Veterinary Dermatology**, v. 9, p. 145-166, 1998.
- HIROTA, S.; ISOZAKI, K.; NISHIDA, T.; KITAMURA, Y. Effects of loss-of-function and gain-of-function mutations of c-Kit on the gastrointestinal tract. **Journal Gastroenterology**, v. 12, p. 75-79, 2000.
- HIROTA, S.; NISHIDA, T.; ISOKAZI, K.; TANIGUCHI, M.; NAKAMURA, J.; OKAZAKI, T.; KITAMURA, Y. Gain-of-function mutation at the extracellular domain of KIT in gastrointestinal stromal tumours. **Journal Pathology**, v. 193, p. 505-510, 2001.

- HORNY, H. P.; JORDAN, G.; MENKE, J. H.; VALENT, P. D. "Chymase expressing bone marrow mast cells in mastocytosis and myelodysplastic syndromes: an immunohistochemical and morphometric study." **Journal Clinical Pathology**, v. 56, n. 2, p. 103-106, 2003.
- HOTTENDORF, G. H.; NIELSEN, S. W. Pathologic report of 29 necropsies on dogs with mastocytoma. **Journal of Veterinary Pathology**, v. 5, p. 102-121, 1968.
- HU, Y.; LI, Z.; GUO, L.; WANG, L.; ZHANG, L.; CAI, X.; ZHAO, H.; ZHA, X. "MAGI-2 Inhibits cell migration and proliferation via PTEN in human hepatocarcinoma cells." **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 467, n. 1, p. 1-9, 2007.
- HUANG, R. P.; FAN, Y.; HOSSAIN, M. Z.; PENG, A.; ZENG, Z. L.; BOYNTON, A. L. Reversion of the neoplastic phenotype of human glioblastoma cells by connexin43 (cx43). **Cancer Research**, v. 58, p. 5089-5096, 1998.
- HUSOY, T.; OLSTORN, H. B.; KNUTSEN, H. K.; LOBERG, E. M.; CRUCIANI, V.; MIKALSEN, S. O.; GOVERUD, I. L.; ALEXANDER, J. Truncated mouse adenomatous polyposis coli reduces connexin32 content and increases matrilysin secretion from Paneth cells. **European Journal of Cancer**, v. 40, p. 1599-1603, 2004.
- ICHIKAWA, Y.; ISHIKAWA, T.; MOMIYAMA, N.; YAMAGUCHI, S.; MASUI, H.; HASEGAWA, S.; CHISHIMA, T.; TAKIMOTO, A.; KITAMURA, H.; AKITAYA, T. Detection of regional lymph node metastase in colon cancer using RT-PCR for matrix metalloproteinase 7, matrilysin. **Clinical Experimental Metastasis**, v. 16, n. 1, p. 3-8, 1998.
- IRANI, A. M.; GOLDSTEIN, S.; WINTROUB, B.; BRADFORD, T.; SCHWARTZ, L. "Human Mast Cell Carboxypeptidase Selective Localization to MCtC Cells." **Journal Immunology**, v. 147, n. 1, p. 247-253, 1991.
- IRETON, R. C.; DAVIS, M. A.; VAN HENGEL, J.; MARINER, D. J.; BARNES, K.; THORESON, M. A.; ANASTASIADIS, P. Z.; MATRISIAN, L.; BUNDY, L. M.; SEALY, L. A novel role for p120 catenin in E-cadherin function. **Journal Cell Biology**, v. 159, p. 465-476, 2002.
- ISHIGURO, T.; KADOSAWA, T.; MORI, K.; TAKAGI, S.; OKUMURA, M.; FUJINAGA, T. Establishment and characterization of a new canine mast cell tumor cell line. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 63, n. 9, p. 1031-1034, 2001.
- ISOZAKI, K.; TERRIS, B.; BELGHITI, J.; SCHIFFMANN, S.; HIROTA, S.; VANDERWINDEN, J-M. Germline-activating mutation in the kinase domain of KIT gene in familial gastrointestinal stromal tumors. **American Journal Pathology**, v. 157, p. 1581-1585, 2000.
- IWAI, S.; KATAGIRI, W.; KONG, C.; AMEKAWA, S.; NAKAZAWA, M.; YURA, Y. Mutations of the APC, beta-catenin, and axin 1 genes and cytoplasmic accumulation of β -catenin in oral squamous cell carcinoma. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 131, n. 12, p. 773-782, 2005.

- JAHN, T.; SEIPEL, P.; COUTINHO, S.; URSCHEL, S.; SCHWARZ, K.; MIETHING, C.; SERVE, H.; PESCHEL, C.; DUYSER, J. Analysing c-kit internalization using a functional c-kit EGFP chimera containing the fluorochrome within the extracellular domain. **Oncogene**, v. 21, v. 29, p. 4508-4520, 2002.
- JANEWAY JR., C. A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; SHLOMCHIK, K. M. J. Resposta immune humoral. In: _____. **Imunologia: o sistema immune na saúde e na doença**. 5. ed. São Paulo: Artmed. 2002. p. 399-400.
- JANG, K-S.; SONG, Y. S.; JANG, S-H.; MIN, K-W.; NA, W.; JANG, S. M.; JUN, Y. J.; LEE, K. H.; CHOI, D.; PAIK, S. S. "Clinicopathological significance of nuclear PTEN expression in colorectal adenocarcinoma," **Histopathology**, v. 56, n. 2, p. 229-239, 2010.
- JAKES, L.; SUE, T.; McDUFFIE, N.; PRESNELL, K. "Sulfated mucopolysaccharides in dog mast cell tumors." **Journal Animal Hospital Association**, v. 13, p. 359-68, 1977.
- JÉROME, 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, 1999.
- JONES, C. L.; GRAHN R. A.; CHIEN, M. B.; LYONS, L. A.; LONDON, C. A. Detection of c-kit mutations in canine mast cell tumors using fluorescent polyacrylamide gel electrophoresis. **Journal Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 16, p. 95-100, 2004.
- JUCÁ, M.; NUNES, B. L. B. B. P.; MENEZES, H. L.; GOMES, E. G. A.; MATOS, D. Metaloproteínas 1 e 7 e Câncer Colorretal. **Review Brasileira de Coloproctologia**, v. 28, n. 3, p. 353-362, 2008.
- KADOWAKI, T.; SHIOZAKI, H.; INOUE, M.; TAMURA, S.; OKA, H.; DOKI, Y.; IIHARA, K.; MATSUI, S.; IWAZAWA, T.; NAGAFUCHI, A.; TSUKITA, S.; MORI, T. E-cadherin and α -catenin expression in human esophageal cancer. **Cancer Research**, v. 54, p. 291-296, 1994.
- KALLAKURY, B. V.; SHEEHAN, C. E.; ROSS, J. S. Co-downregulation of cell adhesion proteins alpha- and beta-catenins, p120CTN, E-cadherin, and CD44 in prostatic adenocarcinomas. **Human Pathology**, v. 32, n. 8, p. 849-55, 2001.
- KAJIGUCHI, T.; LEE, S.; LEE, M-J.; TREPEL, J. B.; NECKERS, L. KIT regulates tyrosine phosphorylation and nuclear localization of β -catenin in mast cell leukemia. **Leukemia Research**, v. 32, n. 5, p. 761-770, 2008.
- KANAZAWA, T.; WATANABE, T.; KAZAMA, S.; TADA, T.; KOKETSU, S.; NAGAWA, H. Poorly differentiated adenocarcinoma and mucinous carcinoma of the colon and rectum show higher rates of loss of heterozygosity and loss of E-cadherin expression due to methylation of promoter region. **International Journal of Cancer**, v. 102, p. 225-29, 2002.
- KANNO, Y.; SASAKI, Y.; SHIBA, Y.; YOSHIDA-NORO, C.; TAKEICHI, M.

Monoclonal antibody ECCD-1 inhibits intercellular communication in teratocarcinoma PCC3 cells. **Experimental Cell Research**, v. 152, p. 270-274, 1984.

KATSUMOTO, T.; MITSUSHIMA, A.; KURIMURA, T. "The role of the vimentin intermediate filaments in rat 3Y1 cells elucidated by immunoelectron microscopy and computer-graphic reconstruction." **Biology Cell**, v. 68, n. 2, p. 139-46, 1990.

KAWAMURA, K. K.; TSUTSUI, J.; SUZUKI, S. T.; KANZAKI, T.; OZAWA, M. N-cadherin expressed on malignant T cell lymphoma cells is functional, and promotes heterotypic adhesion between the lymphoma cells and mesenchymal cells expressing N-cadherin. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 112, p. 62-66, 1998.

KAWARAI, S.; MASUDA, K.; OHMORI, K.; MATSUURA, S.; YASUDA, N.; NAGATA, M.; SAKAGUCHI, M.; TSUJIMOTO, H. Cultivation and Characterization of Canine Skin-Derived Mast Cells. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 72, n. 2, p. 131-140, 2010.

KELLY, K. F.; SPRING, C. M.; OTCHERE, A. A.; DANIEL, J. M. NLS-dependent nuclear localization of p120ctn is necessary to relieve Kaiso-mediated transcriptional repression. **Journal Cell Science**, v. 117, p. 2675-86, 2004.

KRAMER, H.; WINDRUM, G. "The metachromatic staining reaction." **Journal Histochemistry Cytochemistry**, v. 3, p. 227-36, 1955.

KRAUS, C.; LIEHR, T.; HÜLSKEN, J.; BEHRENS, J.; BIRCHMEIER, W.; GRZESCHIK, K. H.; BALLHAUSEN, W. G. "Localization of the human β -catenin gene (CTNNB1) to 3p21: a region implicated in tumor development." **Genomics**, v. 23, n. 1, p. 272- 274, 1994.

KRICK, E.L.; BILLINGS, A. P.; SHOFR, F. S.; WATANABE, S.; SORENMO, K. U. Cytological lymph node evaluation in dogs with mast cell tumors: association with grade and survival. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 7, n. 2, p.130-138, 2009.

KERKELÄ, E.; SAARIALHO-KERE, U. Matrix metalloproteinase in tumor progression: focus on basal and squamous cell skin cancer. **Experimental Dermatology**, v. 1, p. 109-125, 2003.

KING, T. J.; BERTRAM, J. S. Connexins as targets for cancer chemoprevention and chemotherapy. **Biophys Biochemistry Acta**, v. 1719, n. 1-2, p.146-160, 2005.

KIRSHENBAUM, A.; KESSLER, S.; GOFF, J.; METCALFE, D. "Demonstration of the Origin of Human Mast Cells from CD34+ Bone Marrow Progenitor Cells." **The Journal of Immunology**, v. 146, p. 1410-1415, 1991.

KIRSHENBAUM, A.; GOFF, J.; SEMERE, T.; SCOTT, L.; METCALFE, D. "Demonstration That Human Mast Cells arise From a Progenitor Cell Population That is CD34+, c-kit +, and Expresses Amino-peptide N (CD13)." **Blood**, v. 94, n. 7, p. 2333-2342, 1999.

- KITAMURA, Y. "Heterogeneity of mast cells and phenotypic changes between subpopulations." **Annual Review Immunology**, v. 7, p. 59-76, 1989.
- KISTLER, J.; DONG, Y.; ROOS, M.; GRUIJTERS, T.; DONALDSON, P.; BULLIVANT, S.; BEYER, E. Differential expression of two gap junction protein in corneal epithelium. **European Journal Cell Biology**, v. 64, n. 1, p. 95-100, 1994.
- KIUPEL, M.; WEBSTER, J. D.; KANEENE, J. B.; MILLER, R.; YUZHASIYAN-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.; BAILEY, S.; BEST, S.; DeLAY, J.; DETRISAC, C. J.; FITZGERALD, S. D.; GAMBLE, D.; GINN, P. E.; GOLDSCHMITH, M. H.; HENDRICK, M. J.; HOWERTH, E. W.; JANOVITZ, E. B.; LANGOHR, I.; LENZ, S. D.; LIPSCOMP, T. P.; MILLER, M. A.; MISDORP, W.; MOROFF, S.; MULLANEY, T. P.; NEYENS, I.; O'TOOLE, D.; RAMOS-VARA, J.; SCASE, T. J.; SCHULMAN, F. Y.; SLEDGE, D.; SMEDLEY, R. C.; SMITH, K.; SNYDER, P. W.; SOUTHORN, E.; STEDMAN, N. L.; STEFICEK, B. A.; STROMBERG, P. C.; VALLI, V. E.; WEISBRODE, S. E.; YAGER, J.; HELLER, J.; MILLER, R. Proposal of a 2-Tier Histologic Grading System for Canine Cutaneous Mast Cell Tumours to More accurately Predict Biological Behavior. **Veterinary Pathology**, v. 48, p. 147-155, 2011.
- KOBIELAK, A.; FUCHS, E. α -Catenin: at the junction of intercellular adhesion and actin dynamics. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 5, n. 8, p. 614-625, 2004.
- KOTELEVETS, L.; HENGEL, J. V.; BRUYNEEL, E.; MAREEL, M.; ROY, F. V.; CHASTRE, E. Implication of the MAGI-1b/PTEN signalosome in stabilization of adherens junctions and suppression of invasiveness. **The Federation of American Societies For experimental Biology Journal**, v. 19, p. 115-117, 2005.
- KOZYRAKI, R.; SCOAZEC, J. Y.; FLEJOU, J. F.; D'ERRICO, A.; BEDOSSA, P.; TERRIS, B.; FIORENTINO, M.; BRINGUIER, A. F.; GRIGIONI, W. F.; FELDMANN, G. Expression of cadherins and α -catenin in primary epithelial tumors of the liver. **Gastroenterology**, v. 110, p. 1137-1149, 1996.
- KUBE, P.; AUDIGÉ, L.; KÜTHER, K.; WELLE, M. "Distribution, density and heterogeneity of canine mast cells and influence of fixation techniques." **Histochemistry Cell Biology**, v. 110, p. 120-135, 1998.
- KUMAR, N. M.; GILULA, N. B. The gap junction communication channel. **Cell**, v. 84, p. 381-388, 1996a.
- KUMAR, N. M.; GILULA, N. B. Cloning and characterization of human and rat liver cDNAs coding for a gap junction protein. **Journal Cell Biology**, v. 103, p. 767-776, 1986b.
- LAIRD, D. W.; FISTOURIS, P.; BATIST, G.; ALPERT, L.; HUYNH, H. T.; CARYSTINOS, G. D.; ALAOUJ-JAMALI, M. A. Deficiency of connexin 43 gap junctions is an independent marker for breast tumors. **Cancer Research**, v. 59, n. 16, p. 4104-4110, 1999.

- LAMPE, P. D.; KISTLER, J.; HEFTI, A.; BOND, J.; MÜLLER, S.; JOHNSON, R. G.; ENGEL, A. In vitro assembly of gap junctions. **Journal Structural Biology**, v. 107, p. 281-290, 1991.
- LAMPE, P. D.; LAU, A. F. The effects of connexin phosphorylation on gap junctional communication. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 36, p. 1171-1186, 2004.
- LANGENBACH, A.; MCMANUS, P. M.; HENDRICK, M. J.; SHOFR, F. S.; SORENMO, K. U. Sensitive and specificity of methods of assessing the regional lymph nodes for evidence of metastasis in dogs and cats with solid tumors. **Journal of American Medical Association**, v. 218, n. 9, p. 1424-1428, 2001.
- LAU, M-T.; KLAUSEN, C.; LEUNG, P. C. K. "E-cadherin inhibits tumor cell growth by suppressing PI3K/Akt signaling via beta-catenin-Egr1-mediated PTEN expression." **Oncogene**, v. 30, n. 24, p. 2753-2766, 2011.
- LAVALLE, G. E.; CARNEIRO, R. A.; PEREIRA, L. C. Punção aspirativa por agulha fina para diagnóstico de mastocitoma em cães. **Arquivos Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 55, n. 4, p. 500-502, 2003.
- LAVALLE, G. E.; ARAÚJO, R. B.; CARNEIRO, R. A. Tratamento clínico e cirúrgico de mastocitoma em cães. **A Hora Veterinária**, v. 23, n.138, p.21-28, 2004.
- LAZARUS, S. C.; DE VINNEY, R.; MCCABE, L. J.; FINKBEINER, W. E.; ELIAS, D. J.; GOLD, W. M. Isolated canine mastocytoma cells: propagation and characterization of two cell lines. **American Journal Physics**, v. 20, p. 935-944, 1986.
- LEE, S.W.; TOMASETTO, C.; PAUL, D.; KEYOMARSI, K.; SAGER, R. Transcriptional downregulation of gap-junction proteins blocks junctional communication in human mammary tumor cell lines. **Journal Cell Biology**, v. 118, n. 5, p. 1213-1221, 1992.
- LEEVERS, S. J.; VANHAESEBROECK, B.; WATERFIELD, M. D. "Signalling through phosphoinositide 3-kinases: the lipids take centre stage." **Current Opinion in Cell Biology**, v. 11, n. 2, p. 219-225, 1999.
- LEMARIÉ, R.; LEMARIÉ, S.; HEDLUND, C. Mast cell tumors: clinical management. **Compendium on Continuing Education of the Practicing Veterinarian**, v. 17, p. 1085-1101, 1995.
- LENNARTSSON, J.; JELACIC, T.; LINNEKIN, D.; SHIVAKPURA, R. "Normal and oncogenic forms of the receptor tyrosine kinase kit." **Stem Cells**, v. 23, p. 16-43, 2005.
- LEROY, X.; AUGUSTO, D.; LETEURTRE, E.; GOSSELIN, B. CD 30 and CD 117 (c-kit) used in combination are useful for distinguishing embryonal carcinoma from seminoma. **Journal Histochemistry Cytochemistry**, v. 150, p. 283-285, 1999.

- LI, J.; YEN, C.; LIAW, D.; PODSYSPANINA, K.; BOSE, S.; WANG, S. I.; PUC, J.; MILIARESIS, C.; RODGERS, L.; MCCOMBIE, R.; BIGNER, S. H.; GIOVANELLA, B. C.; ITTMANN, M.; TYCKO, B.; HIBSHOOSH, H.; WIGLER, M. H.; PARSONS, R. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. **Science**, v. 275, n. 5308, p. 1943-1947, 1997.
- LI, Q.; PARK, P. W.; WILSON, C. L.; PARKS, W. C. Matrilysin shedding of syndecan-1 regulates chemokine mobilization and transepithelial efflux of neutrophils in acute lung injury. **Cell**, v. 111, p. 635-646, 2002.
- LI, X.; WANG, Y.; WU, D. Expression of E-Cadherin and the PTEN Gene in Relation to Invasion and Metastasis of Gastric Carcinomas. **Chinese Journal of Clinical Oncology**, v. 5, p. 317-321, 2004.
- LIAW, D.; MARSH, D. J.; LI, J.; DAHIA, P. L. M.; WANG, S. I.; ZHENG, Z.; BOSE, S.; CALL, K. M.; TSOU, H. C.; PEACOCKE, M.; ENG, C.; PARSONS, R. Germline mutations of the PTEN gene in Cowden disease, an inherited breast and thyroid cancer syndrome. **Natural Genetics**, v. 16, p. 64-67, 1997.
- LIN, J. H.; TAKANO, T.; COTRINA, M. L.; ARCUINO, G.; KANG, J.; LIU, S.; GAO, Q.; JIANG, L.; LI, F.; LICHTENBERG-FRATE, H.; HAUBRICH, S.; WILLECKE, K.; GOLDMAN, S. A.; NEDERGAARD, M. Connexin 43 enhances the adhesivity and mediates the invasion of malignant glioma cells. **Journal Neuroscience**, v. 22, p. 4302-4311, 2002.
- LING, K.; BAIRSTOW, S. F.; CARBONARA, C.; TURBIN, D. A.; HUNTSMAN, D. G.; and ANDERSON, R. A. "Type I γ phosphatidylinositol phosphate kinase modulates adherens junction and E-cadherin trafficking via a direct interaction with μ 1B adaptin." **Journal of Cell Biology**, v. 176, n. 3, p. 343-353, 2007.
- LIU, F.; WAGNER, S.; CAMPBELL, R. B.; NICKERSON, J. A.; SCHIFFER, C. A.; ROSS, A. H. PTEN enters the nucleus by diffusion. **Journal Cell Biochemistry**, v. 96, p. 221-34, 2005.
- LOEWENSTEIN, W. R. Junctional intercellular communication: the cell-to-cell membrane channel. **Physiology Reviews**, v. 61, p. 829-913, 1981.
- LOHI, J.; HARRIMA, I.; KESKI-OJA, J. Pericellular substrates of human mast cell tryptase: 72 000 dalton gelatinase and fibronectin. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 50, p. 337-349, 1992.
- LAZARUS LONGLEY, B.; DUFFY, T.; KONHN, S. "The mast cell and mast cell disease." **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 32, n. 4, p. 545-61, 1995.
- LONGLEY, J.; DUFFY, T. P.; KOHN, S. The mast cell and mast cell disease. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 32, p. 546-561, 1995.

- LONGLEY, B. J.; REGUERA, M. J.; MA, Y. Classes of c-kit activating mutations: proposed mechanisms of action and implications for disease classification and therapy. **Leukemia Research Journal**, v. 25, p. 571-576, 2001.
- 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.; SEGUIN, B. Mast cell tumors in the dog. *Veterinary Clinics of North América*: **Small Animal Practice**, v. 33, n. 3, p. 473-489, 2003.
- LU, Q.; PAREDES, M.; MEDINA, M.; ZHOU, J.; CAVALLO, R.; PEIFER, M.; ORECCHIO, L.; KOSIK, K. S. Catenin, an adhesive junction-associated protein which promotes cell scattering. **Journal Cell Biology**, v. 144, p. 519-532, 1999.
- LUX, M. L.; RUBIN, B. P.; BIASE, T. L.; CHEN, C.-J.; MACLURE, T.; DEMETRI, G.; XIAO, S.; SINGER, S.; FLETCHER, C. D. M.; FLETCHER, J. A. KIT extracellular and kinase domain mutations in gastrointestinal stromal tumors. **American Journal Pathology**, v. 156, p. 791-795, 2000.
- LYNCH, C. C.; MATRISIAN, L. M. "Matrix metalloproteinases in tumor-host cell communication." **Differentiation**, v. 70, n. 9-10, p. 561-573, 2002.
- LYNCH, C. C.; VARGO-GOGOLA, T.; MATRISIAN, L. M.; FINGLETON, B. Cleavage of E-Cadherin by Matrix Metalloproteinase-7 Promotes Cellular Proliferation in Nontransformed Cell Lines via Activation of RhoA. **Journal of Oncology**, v. 2010, p. 1-11, 2010.
- LYONS, A. B.; PARISH, C. R. Determination of lymphocyte division by flow cytometry. **Journal of Immunology Methods**, v. 171, p. 131-137, 1994.
- MA, Y.; ZENG, S.; METCALFE, D. D.; AKIN, C.; DIMITRIJEVIC, S.; BUTTERFIELD, J. H.; McMAHON, G.; LONGLEY, B. J. The c-KIT mutation causing human mastocytosis is resistant to STI571 and other KIT kinase inhibitors; kinases with enzymatic site mutations show different inhibitor sensitivity profiles than wild-type kinases and those with regulatory-type mutations. **Blood**, v. 99, p. 1741-1744, 2002.
- MACHADO, G. F.; FIGUEIREDO, F. "Revisão: filamentos intermediários." **Medicina**, *Ribeirão Preto*, v. 29, p. 104-113, 1996.
- MACY, D. W. Canine mast cell tumors. **Veterinary Clinics of North America-Small Animal Practice**, v. 15, n. 4, p. 783-803, 1985.
- MACY, D. W.; MacEWEN, E. G. Mast cell tumors. In: WITHROW, S. J.; McEWEN, E. G. (Ed.). **Clinical veterinary oncology**. Philadelphia: J. B. Lippincott, 1989. p. 156-166.
- MACY, D. W. Canine and feline mast cell tumors. In: KAL KAN SYMPOSIUM, 10. Philadelphia, 1986, **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 1989. p. 101-111.

- MACHEIN, U.; CONCA, W. Expression of several matrix metalloproteinase genes in human monocytic cells, **Advances in Experimental Medicine Biology**, v. 421, p. 247-251, 1997.
- MacDONALD, B. T.; TAMAI, K.; HE, X. "Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases." **Developmental Cell**, v.17, n. 1, p. 9-26, 2009.
- MADEWELL, B. R.; THEILEN, G. H. Mast cell and melanocytic neoplasms. In: THEILEN, G. H. **Veterinary cancer medicine**. Philadelphia: Lea e Febiger, 1987. p. 310-317.
- MAEHAMA, T.; DIXON, J. E. "The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate." **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 22, p. 13375-13378, 1998.
- MASAKI, T.; MATSUOKA, H.; SUGIYAMA, M.; ABE, N.; GOTO, A.; SAKAMOTO, A.; ATOMI, Y. Matrilysin (MMP-7) as a significant determinant of malignant potential of early invasive colorectal carcinomas. **British Journal of Cancer**, v. 84, n. 10, p.1317-321, 2001.
- MATHIAS, R. T.; WHITE, T. W.; GONG, X. Lens Gap Junctions in Growth, Differentiation, and Homeostasis. **Physiology Reviews**, v. 90, p. 179-206, 2010.
- MATSUI, S.; SHIOZAKI, H.; INOUE, M.; TAMURA, S.; DOKI, Y.;KADOWAKI, T.; IWAZAWA, T.; SHIMAYA, K.; NAGAFUCHI, A.; TSUKITA, S.; MORI, T. Immunohistochemical evaluation of alpha-catenin expression in gastric cancer. **Virchows Archvs**, v. 424, p. 375-381, 1994.
- MAUDUIT, C.; HAMAMAH, S.; BENAHMED, M. Stem cell factor/c-Kit system in spermatogenesis. **Human Reproduction Update**, v. 5, p. 535-545, 1999.
- McCAW, D.; MILLER, M.; BERGMAN, P. "Vincristine therapy for mast cell tumors in dogs." **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 11, p. 375-378, 1997.
- McGUIRE, J. K.; LI, Q.; PARKS, W. C. Matrilysin (matrix metalloproteinase-7) mediates Ecadherin ectodomain shedding in injured lung epithelium. **American Journal Pathology**, v.162, p. 1831-1843, 2003.
- McQUIBBAN, G. A.; GONG, J. H.; TAM, E. M.; McCULLOCH, C. A.; CLARK-LEWIS, I.; and OVERALL, C. M. Inflammation dampened by gelatinase A cleavage of monocyte chemoattractant protein-3. **Science**, v. 289, p. 1202-1206, 2000.
- MEKORI, Y. A.; OH, C. K.; METCALFE, D. D. IL-3-dependent murine mast cells undergo apoptosis on removal of IL-3. Prevention of apoptosis by c-kit ligand. **The Journal of Immunology**, v. 151, n. 7, p. 3775-3784, 1993.
- MENDELSON, J.; HOWLEY, P. M.; ISRAEL, M. A.; LIOTTA, L. A. (Ed.). **The molecular basis of cancer**. 2nd ed. [S.l]: W. B. Saunders, 2001. p. 313-342.

- MENKE, A.; PHILIPPI, C.; VOGELMANN, R.; SEIDEL, B.; LUTZ, M. P.; ADLER, G.; WEDLICH, D. Down-regulation of E-cadherin gene expression by collagen type I and Type III in pancreatic cancer cell lines. **Cancer Research**, v. 61, n. 8, p. 3508-3517, 2001.
- MERLO, E. M. Mastocitoma cutâneo canino: un reto para el veterinário. **Profesión Veterinaria**, v. 12, n. 47, mayo-junio 2000. Disponível em: <http://www.colvet.es/Madrid/revista/may_jun_00/casoclinico.htm>. Acesso em: 23 jan. 2010.
- MESNIL, M. Connexins and cancer. **Biology Cell**, v. 94, p. 493-500, 2002.
- METCALFE, D. D.; BARAM, D.; MEKORI, Y. A. Mast cells. **Physiological Reviews**, v. 77, p. 1033-1079, 1997.
- MEYER, R. A.; LAIRD, D. W.; REVEL, J. P.; JOHNSON, R. G. Inhibition of gap junction and adherens junction assembly by connexin and A-CAM antibodies. **Journal Cell Biology**, v. 119, p. 179-189, 1992.
- MIETTINEN, M.; SOBIN, L. H.; SARLOMO-RIKALA, M. Immunohistochemical spectrum of GISTs at different sites and their differential diagnosis with a reference to CD117 (KIT). **Modern Pathology**, v. 13, p. 1134-1142, 2000.
- MISDORP, W. Mast cell and canine mast cell tumor. A review. **The Vererinary Quartely**, v. 26, n. 4, p. 156-169, 2004.
- MITSIADES, N.; YU, W. H.; POULAKI, V.; TSOKOS, M.; STAMENKOVIC, I. Matrix metalloproteinase-7 mediated cleavage of Fas ligand protects tumor cells from chemotherapeutics drug cytotoxicity. **Cancer Research**, v. 61, p. 577-581, 2001.
- MODIANO, J. F.; BREEN, M. The etiology of cancer. In: WITHROW, S. J.; VAIL, D. M. **Withrow & Macewen's Small Animal Clinical Oncology**. 4. ed. St. Louis: Saunders Elsevier, 2007. p. 3-30.
- MOLL, R.; MITZE, M.; FRIXEN, U. H.; BIRCHMEIER, W. Differential loss of E-cadherin expression in infiltrating ductal and lobular breast carcinomas. **American Journal Pathology**, v. 143, p. 1731-1742, 1993.
- MOL, C. D.; LIM, K. B.; SRIDHAR, V.; ZOU, H.; CHIEN, E. Y.; SANG, B. C.; NOWAKOWSKI, J.; KASSEL, D. B.; CRONIN, C. N.; MCREE, D. E. Structure of a c-kit product complex reveals the basis for kinase transactivation. **Journal Biology Chemistry**, v. 278, n. 3, p. 1461-1464, 2003.
- MOSKSLUK, C. A.; TIAN, Q.; MARSHALL, C. R.; RUMPEL, C. A.; FRANQUEMONT, D. W.; FRIERSON, H. F. Jr. Mutation of c-kit JM domain are found in a minority of human gastrointestinal stromal tumors. **Oncogene**, v. 18, p. 897-902, 1999.
- MOREY, A. L.; WANIGESEKERA, G. D.; HAWKINS, N. J.; WARD, R. L. C-Kit mutations in gastrointestinal stromal tumours. **Pathology**, v. 34, p. 315-9, 2002.

- MORIYAMA, Y.; TSUJIMURA, T.; HASHIMOTO, K.; MORIMOTO, M.; KITAYAMA, H.; MATSUZAWA, KITAMURA, Y.; KANAKURA, Y. Role of aspartic acid 814 in the function and expression of c-kit receptor tyrosine kinase. **Journal Biology Chemistry**, v. 271, p. 3347-50, 1996.
- MOON, R. T.; KOHN, A. D.; FERRARI, G. V. de.; KAYKAS, A. WNT and beta-catenin signaling: diseases and therapies. **Nature Reviews Genetic**, v. 5, n. 9, p. 691-701, 2004.
- MOORE, A. "Radiation therapy for the treatment of tumours in small companion animals." **Veterinary Journal**, v. 164, p. 176-187, 2002.
- MOTA, I. The mast cell revisited. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 28, p. 895-901, 1995.
- MOTA, E. F. F.; OLIVEIRA, S. R. Diagnóstico citológico em medicina veterinária. **Cadernos Técnicos da Escola de Veterinária da UFMG**, v. 1, n. 30, p. 29-47, 1999.
- MOTA, E. F. F. **Estudo da expressão de moléculas de adesão, de junções comunicantes e da matriz extracelular de mastocitomas da espécie canina**. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade De Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.
- MUNRO, S. B.; DUCLOS, A. J.; JACKSON, A. R.; BAINES, M. G.; BLASCHUK, O. W. Characterization of cadherins expressed by murine thymocytes. **Cell Immunology**, v. 169, p. 309-312, 1996.
- MUSIL, L. S.; CUNNINGHAM, B. A.; EDELMAN, G. M.; GOODENOUGH, D. A. Differential phosphorylation of the gap junction protein connexin43 in junctional communication-competent and -deficient cell lines. **Journal Cell Biology**, v. 111, p. 2077-2088, 1990.
- NAGAFUCHI, A.; TAKEICHI, M.; TSUKITA, S. The 102 kd cadherin-associated protein: Similarity to vinculin and posttranscriptional regulation of expression. **Cell**, v. 65, p. 849-857, 1991.
- NAGAFUCHI, A.; TSUKITA, S. H.; TAKEICHI, M. Transmembrane control of cadherin-mediated cell-cell adhesion. **Seminars in Cell Biology**, v. 4, p. 175-181, 1993.
- NAJY, A. J.; DAY, K. C.; DAY, M. L. "The ectodomain shedding of E-cadherin by ADAM15 supports ErbB receptor activation." **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 26, p. 18393-18401, 2008.
- NAKAGAWA, S.; KITO, T. Measurement of KIT ligand/stem cell factor:clinical and biochemical significance. **Current Opinion Hematology**, v. 7, p. 133-142, 2000.
- NASS, S. J.; HERMAN, J. G.; GABRIELSON, E.; IVERSEN, P. W.; PARL, F. F.;

- DAVIDSON, N. E.; GRAFF, J. R. Aberrant methylation of the estrogen receptor and E-cadherin 5' CpG islands increases with malignant progression in human breast cancer. **Cancer Research**, v. 60, p.4346-48, 2000.
- NAUS, C. C.; BANI-YAGHOUB, M. Gap junctions communication in the developing central nervous system. **Cell Biology Intitute**, v. 22, p. 751-763, 1998.
- NAVOLOTSKI, A.; RUMJNZEV, A.; LU, H.; PROFT, D.; BARTHOLMES, P.; ZANKER, K. S. Migration and gap junctional intercellular communication determine the metastatic phenotype of human tumor cell lines. **Cancer Letter**, v. 118, p. 181-187, 1997.
- NEIJSEN, J.; HERBERTS, C.; DRIJFHOUT, J. W.; REITS, E.; JANSSEN, L.; NEEFJES, J. Cross-presentation by intercellular peptide transfer through gap junctions. **Nature**, v. 434, p. 3-88, 2005.
- NEIJSEN, J.; PANG, B.; NEEFJES, J. Gap junction-mediated intercellular communication in the immune system. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 94, n. 1-2, p. 207-18, 2007.
- NISHIDA, K.; WANG, L.; MORII, E.; PARK, S. J.; NARIMATSU, M.; ITOH, S.; YAMASAKI, S.; FUJISHIMA, M.; ISHIHARA, K.; HIBI, M.; KITAMURA, Y.; HIRANO, T. Requirement of Gab2 for mast cell development and KitL/c-Kit signaling. **Blood**, v. 99, p. 1866-1869, 2002.
- NISHIDA, M.; KAWAI, K.; TANAKA, M.; TEGOSHI, T.; ARIZONO, N. Expression of E-cadherin in human mast cell line HMC-1. **Acta Pathologica Microbiologica et Immunologica Scandinavica**, v. 111, p. 1067-1074, 2003.
- NOË, V.; FINGLETON, B.; JACOBS, K.; CRAWFORD, H.C.; VERMEULEN, S.; STEELANT, W.; BRUYNEEL, E.; MATRISIAN, L. M.; MAREEL, M. "Release of an invasion promoter E-cadherin fragment bymatrilysin and stromelysin- 1." **Journal of Cell Science**, v. 114, n. 1, p. 111-118, 2001.
- NOLI, C.; MIOLO, A. "The mast cell in wound healing." **Veterinary Dermatology**, v. 12, p. 303-313, 2001.
- NOLLET, F.; BERX, G.; VAN ROY, F. The role of the e-cadherin/catenin adhesion complex in the development and progression of cancer. **Molecular Cell Biology Research Communications**, v. 2, p.77-85, 1999.
- NOVIANA, D.; MAMBA, K.; MAKIMURA, S.; HORII, Y. "Distribution, histochemical and enzyme histochemical characterization of mast cells in dogs." **Journal of Molecular Histology**, v. 35, p. 123-132, 2004.
- OCHIAI, A.; AKIMOTO, S.; SHIMOYAMA, Y.; NAGAFUCHI, A.; TSUKITA, S.; HIROHASHI, S. Frequent loss of α -catenin expression in scirrhous carcinomas with scattered cell growth. **Jpn. Journal Cancer Research**, v. 85, p. 266-273, 1994.

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

OLIVER, J.; BLOOM, F.; MANGIERI, C. On the Origin of Heparin. An Examination of the Heparin Content and the Specific Cytoplasmic Particles of Neoplastic Mast Cells. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 86, p. 107-124, 1947.

OVIEDO-ORTA, E.; GASQUE, P.; EVANS, W. H. Immunoglobulin and cytokine expression in mixed lymphocyte cultures is reduced by disruption of gap junction intercellular communication. *The Federation of American Societies For experimental Biology Journal*, v. 15, p. 768-774, 2001.

OZAWA, M.; BARBAULT, H.; KEMLER, R. The cytoplasmic domain of the cell adhesion molecule uvomorulin associates with three independent proteins structurally related in different species. *European Molecular Biology Organization Journal*, v. 8, p. 1711-1717, 1989.

PAGE-McCAW, A.; EWALD, A. J.; WERB, Z. Matrix metalloproteinase and the regulation of tissue remodeling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 8, p. 221-233, 2007.

PADAWER, J. The Reaction of Rat Mast Cells to Polylysine. *The Journal of Cell Biology*, v. 47, p. 352-372, 1970.

PALKER, T. J.; DONG, G.; LEITNER, W. W. Mast cells in innate and adaptive immunity to infection. *European Journal of Immunology*, v. 40, p. 13-18, 2010.

PALUMBO, C.; VAN ROOZENDAAL, K.; GILLIS, A. J.; VAN GURP, R. H.; DE MUNNIK, H.; OOSTERHUIS, J. W.; VAN ZOELLEN, E. J.; LOOIJENGA, L. H. Expression of the PDGF alpha-receptor 1.5 kb transcript, OCT-4, and c-KIT in human normal and malignant tissues. Implications for the early diagnosis of testicular germ cell tumours and for our understanding of regulatory mechanisms. *Journal Pathology*, v. 196, p. 467-467, 2002.

PARISH, C. R. Fluorescent dyes for lymphocyte migration and proliferation studies. *Immunology Cell Biology*, v. 77, p. 499-508, 1999.

PARISH, C. R.; GLIDDEN, M. H.; QUAH, B. J.; WARREN, H. S. Use of the intracellular fluorescent dye CFSE to monitor lymphocyte migration and proliferation. In: Coligan, J. E.; Bierer, B. E.; Margulies, D. H.; Shevach, E. M.; Strober, W.; (Ed.). *Current protocols in immunology*. John Wiley & Sons. Australian National University, Canberra, Australia: 2009. v. 84, n. 4.9, chap. 1- 4.9, p.13.

PARK, J. I.; KIM, S. W.; LYONS, J. P.; JI, H.; NGUYEN, T. T.; CHO, K.; BARTON, M.C.; DEROO, T.; VLEMINCKX, K.; MOON, R. T.; McCrea, P. D. Kaiso/p120-catenin and TCF/ β -catenin complexes coordinately regulate canonical Wnt gene targets. *Developmental Cell*, v. 8, p. 843-854, 2005.

PARKS, W. C.; WILSON, C. L.; LOPEZ-BOADO, Y. S. Matrix metalloproteinase as modulators of inflammation and innate immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 4, p. 617-629, 2004.

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.

PEINADO, H.; PORTILLO, F.; CANO, A. Transcriptional regulation of cadherins during development and carcinogenesis. **International Journal Developmental Biology**, v. 48, n. 5-6, p. 365-375, 2004.

PENG, Q.; MCEUEN, A. R.; BENYON, R. C.; WALLS, A. F. The heterogeneity of mast cell tryptase from human lung and skin. **European Journal of Biochemistry**, v. 270, p. 270-83, 2003.

PEREZ-MORENO, M.; FUNCHS, E. "Catenins: keeping cells from getting their signals crossed," **Developmental Cell**, v. 11, n. 5, p. 601-612, 2006.

PERREN, A.; WENG, L. P.; BOAG, A. H.; ZIEBOLD, U.; THAKORE, K.; DAHIA, P. L. M.; KOMMINOTH, P.; LEES, J. A.; MULLIGAN, L. M.; MUTTER, G. L.; ENG, C. "Immunohistochemical evidence of loss of PTEN expression in primary ductal adenocarcinomas of the breast," **American Journal of Pathology**, v. 155, n. 4, p. 1253-1260, 1999.

PERTZ, O.; BOZIC, D.; KOCH, A. W.; FAUSER, C.; BRANCACCIO, A.; ENGEL, J. "A new crystal structure, Ca²⁺ dependence and mutational analysis reveal molecular details of E-cadherin homoassociation." **European Molecular Biology Organization Journal**, v. 18, n. 7, p. 1738-1747, 1999.

PRIESTER, W. A. Skin tumors in domestic animals: data from 21 US and Canadian Colleges of Veterinary Medicine. **Journal National Cancer Institute**, v. 50, p. 457-466, 1973.

PRYER, N. K.; LEE, L. B.; ZADOVASKAYA, R.; YU, X.; SUKBUNTHERN, J.; CHERRINGTON, J. M.; LONDON, C. A. Proof of target for SU11654: inhibition of KIT phosphorylation in canine mast cell tumors. **Clinical Cancer Research**, v. 9, p. 5729-5734, 2003.

POLAKIS, P. Wnt signaling and cancer. **Genes Development**, v. 14, p. 1837-1851, 2000.

POLLACK, M. J.; FLANDERS, J. A.; JOHNSON, R. C. Disseminated malignant mastocytoma in a dog. **Journal of the American Hospital Association**, v. 27, p. 435-440, 1991.

POLLMAN, M. A.; SHAO, Q.; LAIRD, D. W.; SANDING, M. Connexin 43 mediated gap junctional communication enhances breast tumor cell diapedesis in culture. **Breast Cancer Research**, v. 7, p. 522-534, 2005.

- POKUTTA, S.; WEIS, W. I. Structure of the dimerization and β -catenin binding region of α -catenin. **Molecular Cell**, v. 5, p. 533-543, 2000.
- POKUTTA, S.; DREES, F.; TAKAI, Y.; NELSON, W. J.; WEIS, W. I. Biochemical and structural definition of the 1-afadin- and actin-binding sites of α -catenin. **Journal Biology Chemistry**, v. 277, p. 18868-18874, 2002.
- POWELL, W. C.; FINGLETON, B.; WILSON, C. L.; BOOTHBY, M.; MATRISIAN, L. M. The metalloproteinase matrilysin proteolytically generates active soluble Fas ligand and potentiates epithelial cell apoptosis. **Current Biology**, v. 9, p. 441-447, 1999.
- PUXEDDU, I.; PILIPONSKY, A.; BACHELET, I.; LEVI-SCHAFFER, F. "Mast cells in allergy and beyond." **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.35, p. 1601-07, 2003.
- QIU, F. H.; RAY, P.; BROWN, K.; BARKER, P. E.; JHANWAR, S.; RUDDLE, F. H.; BESMER, P. Primary structure of c-kit; relationship with the CSF-1/PDGF receptor kinase family-oncogenic activation of v-kit involves deletion of extracellular domain and C terminus. **European Molecular Biology Organization Journal**, v. 7, p. 1003-1011, 1988.
- QUAH, B. J. C.; WARREN, H. S.; PARISH, C. R. Monitoring lymphocyte proliferation in vitro and in vivo with the intracellular fluorescent dye carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester. **Nature Protocols**, v. 2, p. 2049-2056, 2007.
- QUAH, B. J. C.; PARISH, C. R. The use of carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (cfse) to monitor lymphocyte proliferation. **Journal Visualized Experiments**, v. 44, p. 2259, 2010.
- RA, H.-J.; HARJU-BAKER, S.; ZHANG, F.; LINHARDT, R. J.; WILSON, C. L.; PARKS, W. C. Control of Promatrilysin (MMP7) Activation and Substrate-specific Activity by Sulfated Glycosaminoglycans. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 41, p. 27924-27932, 2009.
- RABINOVITCH, P. S.; DNA content histogram and cell-cycle analysis. In: DARNZYNKIEWICZ, Z.; ROBINSON, J. P.; CRISSMAN, H. A. (Ed.). **Methods in cell biology: flow cytometry**, San Diego: Academic Press, 1994. v. 41, p. 263-296.
- RAMBURAM, A.; GOVENDER, D. Cadherins and catenin in pathology. **Current Diagnostic Pathology**, v. 8, p. 305-317, 2002.
- RAZIN, A.; CEDAR, H. DNA methylation and gene expression. **Microbiology Review**, v. 55, p. 451-458, 1991.
- RAMOS-VARA, J. A.; MILLER, M. A.; Immunohistochemical expression of Ecadherin does not distinguish canine cutaneous histiocytoma from other canine round cell tumors. **Veterinary Pathology**, v. 48, p. 758-763, 2011.

- RECH, R. R.; GRAÇA, D. L.; KOMMERS, G. D.; SALLIS, E. S. V.; RAFFI, M. B.; GARMATZ, S. L. Mastocitoma cutâneo canino. Estudo de 45 casos. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 56, n. 4, p. 441-448, 2004.
- REITH, A. D.; ELLIS, C.; LYMAN, S. D.; ANDERSON, D. M.; WILLIAMS, D. E.; BERNSTEIN, A.; PAWSON, T. Signal transduction by normal isoforms and W mutant variants of the Kit receptor tyrosine kinase. **European Molecular Biology Organization Journal**, v. 10, p. 2451-2459, 1991.
- REN, S.; SAKAI, K.; SCHWARTZ, L. B. Regulation of human mast cell b-tryptase: Conversion of inactive monomer to active tetramer at acid pH. **Journal of Immunology**, v. 160, p. 4561-4569, 1998.
- REYNOLDS, A. B.; DANIEL, J.; McCREA, P. D.; WHELOCK, M. J.; WU, J.; ZHANG, Z. Identification of a new catenin: the tyrosine kinase substrate p120cas associates with E-cadherin complexes. **Molecular Cell Biology**, v. 14, p. 8333-8342, 1994.
- REYNOLDS, A. B.; DANIEL, J. M.; MO, Y. Y.; WU, J.; ZHANG, Z. The novel catenin p120^{cats} binds classical cadherins and induces an unusual morphological phenotype in NIH3T3 fibroblasts. **Experimental Cell Research**, v. 225, p. 328-337, 1996.
- REYNOLDS, A. B.; CARNAHAN, R. H. Regulation of cadherin stability and turnover by p120ctn: implications in disease and cancer. **Seminars Cell Development Biology**, v. 15, p. 657-663, 2004a.
- REYNOLDS, A. B.; ROCZNIAK-FERGUSON, A. Emerging roles for p120-catenin in cell adhesion and cancer. **Oncogene**, v. 23, p. 7947-7956, 2004b.
- RIBEIRO-FILHO, L. A.; FRANKS, J.; SASAKI, M.; SHIINA, H.; LI, L. C.; NOJIMA, D.; ARAP, S.; CARROLL, P.; ENOKIDA, H.; NAKAGAWA, M.; YONEZAWA, S.; DAHIYA, R. CpG hypermethylation of promoter region and inactivation of E-cadherin gene in human bladder cancer. **Molecular Carcinogenesis**, v. 34, p. 187-98, 2002.
- RIMM, D. L.; SINARD, J. H.; MORROW, J. S. Reduced α -catenin E-cadherin Expression in breast cancer. **Laboratory Investigation**, v. 72, p. 506-512, 1995.
- ROCZNIAK-FERGUSON, A.; REYNOLDS, A. B. Regulation of p120-catenin nucleocytoplasmic shuttling activity. **Journal Cell Science**, v. 116, p. 4201-4212, 2003.
- ROGERS, K. S. Dilemmas of diagnosis and treatment. **Veterinary Clinics of North América: Small Animal Practice**, v. 26, p. 87-192, 1996.
- RONZITTI, G.; COLLEGARI, F.; MALAGUTI, C.; POSSINI, G. P. Selective disruption of the E-cadherin-catenin system by an algal toxin. **British Journal of cancer**, v. 90, p. 1100-1107, 2004.

ROTTEM, M.; FAUCI, A. S.; HALLAHAN, C. W.; KERR, G. S.; LEBOVICS, R.; LEAVITT, R. Y.; HOFFMAN, G. S. Wegener granulomatosis in children and adolescents: Clinical presentation and outcome. **The Journal of Pediatrics**, v. 122, n. 1, p. 26-31, 1993.

RUOSS, S. J.; HARTMAN, T.; CAUGHEY, G. H. Mast cell tryptase is a mitogen for cultured fibroblasts. **Journal of Clinical Investigation**, v. 88, p. 493-499, 1991.

RYGAARD, K.; NAKAMURA, T.; SPANG-THOMSEN, M.: Expression of the proto-oncogenes c-met and c-kit and their ligands, hepatocyte growth factor/scatter factor and stem cell factor in SCLC cell lines and xenografts. **British Journal of cancer**, v. 67, p. 37-46, 1993.

SAKAI, K.; REN, S.; SCHWARTZ, L. B. A novel heparin-dependent processing pathway for human tryptase: autocatalysis followed by activation with dipeptidyl peptidase I. **Journal of Clinical Investigation**, v. 97, p. 988-95, 1996.

SALAHSHOR, S.; NAIDOO, R.; SERRA, S.; SHIH, W.; TSAO, M.S.; CHETTY, R.; WOODGETT, J. R. Frequent accumulation of nuclear E-cadherin and alterations in the Wnt signaling pathway in esophageal squamous cell carcinomas. **Modern Pathology**, v. 21, p. 271-281, 2008.

SANO, T.; LIN, H.; CHEN X.; LANGFORD, L.A.; KOUL, D.; BONDY, M. L.; HESS, K. R.; MYERS, J. N.; HONG, Y-K.; YUNG, W. K. A.; STECK, P. A. "Differential expression of MMAC/PTEN in glioblastoma multiforme: relationship to localization and prognosis." **Cancer Research**, v. 59, n. 8, p. 1820-1824, 1999.

SATO, K.; OKAZAKI, Y.; TONOGI, M.; TANAKA, Y.; YAMANE, G. Y. Expression of B-catenin in rat oral epithelial dysplasia induced by 4-nitroquinoline 1-oxide. **Oral Oncology**, v. 38, n. 8, p. 771-778, 2002.

SAYED, B. A.; CHRISTY, A.; QUIRION, M. R.; BROWN, M. A. The master switch: the role of mast cells in autoimmunity and tolerance. **Annual Review of Immunology**, v. 26, p. 705-739, 2008.

SCHLIWA, M.; WOEHLKE, G. Molecular motors. **Nature**, v. 422, p. 759-765, 2003.

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, n. 1, p. 151-158, 2006.

SCHWARTZ, L. B. Clinical utility of tryptase levels in systemic mastocytosis and associated hematologic disorders. **Leukaemia Research**, v. 25, p. 553-62, 2001.

SCHWARTZ, L. "Monoclonal antibodies against human mast cell tryptase demonstrate shared antigenic sites on subunits of tryptase and selective localization of the enzyme to mast cells." **Journal Immunology**, v. 134, n. 1, p. 526-531, 1985.

- SCOTT, W. D.; MILLER, H. W.; GRIFFIN, E. C. Tumores neoplásicos e não neoplásicos. In: **Miller & Kirk - Dermatologia de pequenos animais**. 5. ed. Rio de Janeiro: Interlivros, 1996. p. 1130, cap. 19. Tumores neoplásicos e não neoplásicos: p. 926-1054.
- SCHWEIZER, L.; VARMUS, H. Wnt/wingless signaling through b-catenin requires the function of both LRP/arrow and frizzled classes of receptors. **BMC Cell Biology**, v. 2, n. 4, p. 4, 2003.
- SCULLY, C.; BAGAN, J-V.; BLACK, M.; CARROZZO, M.; EISEN, D.; ESCUDIER, M.; FARTHING, P.; KUFFER, R.; MUZIO, L. L.; MIGNOGNA, M.; PORTER, S.R. Number 1 Epithelial biology. **Oral Disease**, v. 11, n. 2, p. 58-71, 2005.
- SELYE, H. **Mast cell- Review**. Washington: Butterworths Inc., 1965. p. 275-278.
- SEMBA, S.; SATAKE, S.; MATSUSHITA, M.; YOKOZAKI, H. "Phosphatase activity of nuclear PTEN is required for CDX2-mediated intestinal differentiation of gastric carcinoma." **Cancer Letters**, v. 274, n. 1, p. 143-150, 2009.
- SERVE, H.; YEE, N. S.; STELLA, G.; SEPP-LORENZINO, C.; TAN, J.C.; BESMER, P. Differential roles of PI3-kinase and Kit tyrosine 821 in Kit receptor mediated proliferation, survival and cell adhesion in mast cell. **European Molecular Biology Organization Journal**, v. 14, p. 473-483, 1995.
- SILVA, A. F. S. O. **Expressão de c-kit (CD 117) em lesões benignas e malignas de mama**. 2003. 110p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, 2003.
- SIMON, M.; GRANDAGE, V. L.; LINCH, D. C.; KHWAJA, A. Constitutive activation of the Wnt/beta-catenin signalling pathway in acute myeloid leukaemia. **Oncogene**, v. 24, p. 2410-2420, 2005.
- SIMOES, J. P.; SCHONING, P.; BUTINE, M. Prognosis of canine mast cell tumors: a comparison of three methods. **Veterinary Pathology**, v. 31, p. 637-647, 1994.
- SCOTT, M. A.; STOCKHAM, S. L. Basophils and mast cells. In: FELDMAN, B. F.; ZINKL, J. G.; JAIN, N. C. **Schalm's: veterinary hematology**. 5. ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. cap. 48, p. 308-317.
- SHENG, Z. M.; MARCHETTI, A.; BUTTITTA, F.; CHAMPEME, M. H.; CAMPANI, D.; BISTOCCHI, M.; LIDEREAU, R.; CALLAHAN, R. "Multiple regions of chromosome 6q affected by loss of heterozygosity in primary human breast carcinomas," **British Journal of Cancer**, v. 73, n. 2, p. 144-147, 1996.
- SHIBAMOTO, S.; HAYKAWA, M.; TAKEUCHI, K.; HORI, T.; MIYAZAWA, K.; KITAMURA, N.; JOHNSON, K. R.; WHEELLOCK, M. J.; MATSUYOSHI, N.; TAKEICHE, M. Association of p120, a tyrosine kinase substrate, with E- cadherin/catenin complexes. **Journal Cell Biology**, v. 128, 949-957, 1995.

- SHIBANUMA, K.; TONG, Z. B.; VANDERHOOF, V. H.; VANEVSKI, K.; LAWRENCE M NELSON, L. M. Investigation of KIT gene mutations in women with 46, XX spontaneous premature ovarian failure. **BMC Womens Health**, v. 2, p. 8, 2002.
- SHIMAZUI, T.; GIROLDI, L. A.; BRINGUIER, P. P.; OOSTERWIJK, E.; SCHALKEN, J. A. Complex cadherin expression in renal cell carcinoma. **Cancer Research**, v. 56, p.3234-3237, 1996.
- SHIMOYAMA, Y.; NAGAFUCHI, A.; FUJITA, S.; GOTOH, M.; TAKEICHI, M.; TSUKITA, S.; HIROHASHI, S. Cadherin dysfunction in a human cancer cell line: possible involvement of loss of α -catenin expression in reduced cell-cell adhesiveness. **Cancer Research**, v. 52, p. 5770-5774, 1992.
- SHIOZAKI, H.; IIHARA, K.; OKA, H.; KADOWAKI, T.; MARSUI, S.; GOFUKU, J.; INOUE, M.; NAGAFUCHI, A.; TSUKITA, S.; MORI, T. Immunohistochemical detection of α -catenin expression in human cancers. **American Journal Pathology**, v. 144, p. 667-674, 1994.
- SMITH, M. A.; PALLISTER, C. J.; SMITH, J. G. Stem cell factor: biology and relevance to clinical practice. **Acta Haematology**, v. 105, p. 143-150, 2001.
- SPRING, C. M.; KELLY, K. F.; O'KELLY, I.; GRAHAM, M.; CRAWFORD, H. C.; DANIEL, J. M. The catenin p120^{ctn} inhibits Kaiso-mediated transcriptional repression of the β -catenin/TCF target gene matrilysin. **Experimental Cell Research**, v. 305, n. 2, p. 253-265, 2005.
- SÖHL, G.; WILLECKE, K. An update on connexin genes and their nomenclature in mouse and human. **Cell Communication and Adhesion**, v. 8, p.163-165, 2003.
- SOTER, N. A. Mastocytosis and the skin. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, v. 14, n. 3, p. 537-555, 2000.
- SOTO, D.; MALMSTEN, C.; BLOUNT, J. L.; MULLENBURG, D. J.; CAUGHEY, G. H. Genetic deficiency of human mast cell α -tryptase. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 32, p. 1000-1006, 2002.
- STAPPERT, J.; KEMLER, K. W. A short core region of E-cadherin is essential for catenin binding and is highly phosphorylated. **Cell Adhesion Communication**, v. 2, p. 319-327, 1994.
- STAMENKOVIC, I. Extracellular matrix remodelling: the role of matrix metalloproteinases. **Journal Pathology**, v. 200, n. 4, p. 448-464, 2003.
- STECK, P. A.; PERSHOUSE, M. A.; JASSER, S. A.; YUNG, W. K.; LIN, H.; LIGON, A. H.; LANGFORD, L. A.; BAUMGARD, M. L.; HATTIER, T.; DAVIS, T.; FRYE, C.; HU, R.; SWEDLUND, B.; TENG, D. H.; TAVTIGIAN, S. V. "Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers." **Nature Genetics**, v. 15, n. 4, p. 356-362, 1997.

STONE, D.; JACKY, P.; PRIEUR, D. "Cytogenetic Evaluation of Four Canine Mast Cell Tumors." **Cancer Genetics Cytogenetics**, v. 53, p. 105-112, 1991.

STROHMEYER, T.; PETER, S.; HARTMANN, M.; MUNEMITSU, S.; ACKERMANN, R.; ULLRICH, A.; SLAMON, D. J. Expression of the hst-1 and c-kit proto-oncogenes in human testicular germ cell tumors. **Cancer Research**, v. 51, p. 1811-1816, 1991.

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

STREFEZZI, R. F.S. **Indicadores de prognóstico para mastocitomas**: estudo morfométrico e imunoistoquímico. 2007. 93 f. Tese de Doutorado (Doutorado em Patologia Experimental e Comparada) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

SUBAUSTE, M. C.; NALBANT, P.; ADAMSON, E. D.; HAHN, K. M. "Vinculin controls PTEN protein level by maintaining the interaction of the adherens junction protein β -catenin with the scaffolding protein MAGI-2." **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 7, p. 5676-5681, 2005.

SUEIRO, F. A. R.; DALECK, C. R.; ALESSI, A. C. Ultra-estrututra dos mastócitos de diferentes tipos histológicos de mastocitomas em cães. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 54, n. 3, p. 255-258, 2002.

SZYMKIEWICZ, I.; KOWANETZ, K.; SOUBEYRAN, P.; DINARINA, A.; LIPKOWITZ, S.; DIKIC, I. CIN 85 participates in Cbl-b-mediated downregulation of receptor tyrosine kinases. **Journal Biology Chemistry**, v.12, p. 204-207, 2002.

TACHIBANA, M.; SHIBAKITA, M.; OHNO, S.; KINUGASA, S.; YOSHIMURA, H.; UEDA, S.; FUJII, T.; RAHMAN, M. A.; DHAR, D. K.; NAGASUE, N. "Expression and prognostic significance of PTEN product protein in patients with esophageal squamous cell carcinoma." **Cancer**, v. 94, n. 7, p. 1955-1960, 2002.

TAKAHASHI, T.; KADOSAWA, T.; NAGASE, M.; MATSUNAGA, S.; MACHIZUKI, M.; NISHIMURA, R.; SASAKI, N. Visceral mast cell tumors in dogs: 10 cases (1982-1997). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 216, n. 2, p. 222-226, 2000.

TAKAHASHI-YANAGA, F.; SASAGURI, T. The Wnt/ beta-catenin signaling pathway as a target in drug discovery. **Journal Pharmacology Science**, v. 104, n. 4, p. 293-302, 2007.

TAKEICHI, M. Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. **Science**, v. 251, p. 1451-1455, 1991.

TANIGUCHI, M.; NISHIDA, T.; HIROTA, S.; ISOZAKI, K.; ITO, T.; NOMURA, T.; MATSUDA, H.; KITAMURA, Y. Effect of c-Kit mutation on prognosis of gastrointestinal stromal tumors. **Cancer Research**, v. 59, p. 4297-4300, 1999.

- TARDY, S.; BRACCO, P.; GUGLIELMINO, R.; PEIRONE, B.; BONIOLI, A. Canine mast cell tumor: clinical Therapeutic and comparative features. **Veterinaria**, v. 6, p. 61-77, 1992.
- TAYLOR, M. L.; METCALFE, D. D. Kit signal transduction. **Hematology Oncology Clinicals North American**, v. 14, p. 517-535, 2000.
- TEGOSHI, T.; NISHIDA, M.; ISHIWATA, N. E-cadherin and cadherin-associated cytoplasmic proteins are expressed in murine mast cells. **Laboratory Investigation**, v. 80, p. 1571-1581, 2000.
- THAMM, D. H.; VAIL, D. M. Mast cell tumors. In: WITHROW, S. J.; MAC EWEN, E. G.; **Small animal clinical oncology**. Philadelphia: WB Saunders Company, 2001. p. 261-282.
- THAMM, D. H.; TUREK, M. M.; VAIL, D. M. Outcome and prognostic factors following adjuvant prednisone/vimblastine chemotherapy for highrish canine mast cell tumors: 61 cases. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 68, p. 581-587, 2006.
- THAMM, D. H.; VAIL, D. M. Mast cell tumors, In: WITHROW, S. J.; MACEWEN'S, E. G. **Small animal clinical oncology**. 4. ed. St Louis, MO: Saunders Elsevier, 2007. p. 402-424.
- THARP, M. "Mastocytosis." **Current Problems Dermatology**, v. 10, p. 117-210, 1998.
- THEILEN, G. H.; MADEWELL, B. R. Tumors of the skin and subcutaneous tissues. In: LEA & FEBIGER, **Veterinary cancer medicine**, Philadelphia, 1979. p. 155-191.
- THOMAS, T.; JORDAN, K.; SIMEK, J.; SHAO, Q.; JEDESZKO, C.; WALTON, P.; LAIRD, D. W. Mechanisms of Cx43 and Cx26 transport to the plasma membrane and gap junction regeneration. **Journal Cell Science**, v. 118, p. 4451-4462, 2005.
- THOMPSON, H. L.; BURBELO, P. D.; SEGUI-REAL, B.; YAMADA, Y.; METCALFE, D. D. Laminin promotes mast cell attachment. **Journal Immunology**, v. 143, p. 2323, 1989.
- THOMPSON, H. L.; BURBELO, P. D.; GABRIEL, G.; YAMADA, Y.; METCALFE, D. D. Murine mast cells synthesize basement membrane components: a potential role in early fibrosis. **Journal Clinical Investigation**, v. 87, p. 619-623, 1991.
- THORESON, M. A.; REYNOLDS, A. B. Altered expression of the catenin p120 in human cancer: implications for tumor progression. **Differentiation**, v. 70, p. 583-589, 2002.
- TIAN, Q.; FRIERSON, H. F.; KRYSTAL, G. W.; MOSKALUK, C. A. Activating c-kit gene mutations in human germ cell tumors. **American Journal Pathology**, v. 154, p. 1643-1647, 1999.
- TOLKACHEVA, T.; BODDAPATI, M.; SANFIZ, A.; TSUCHIDA, K.; KIMMELMAN, A. C.; CHAN, A. M. L. "Regulation of PTEN binding to MAGI-2 by two putative phosphorylation sites at threonine 382 and 383." **Cancer Research**, v. 61, n. 13, p. 4985-4989, 2001.

- TORTELLY, R.; CARVALHO, E. C. Q.; SICILIANO, A. V. Mastocitoma canino: aplicação do escore de Patnaik et al., para o diagnostico/prognostico de rotina. **Revista brasileira de ciência veterinária**, v. 7, n. 3, p. 159-161, 2000.
- TORRES, J.; PULIDO, R. "The tumor suppressor PTEN is phosphorylated by the protein kinase CK2 at its C terminus. Implications for PTEN stability to proteasome-mediated degradation," **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 2, p. 993-998, 2001.
- TROTMAN, L. C.; WANG, X.; ALIMONTI, A.; CHEN, Z.; TERUYA-FELDSTEIN, J.; YANG, H.; PAVLETICH, N. P.; CARVER, B. S.; CORDON-CARDO, C.; ERDJUMENT-BROMAGE, H.; TEMPST, P.; CHI, S. G.; KIM, H. J.; MISTELI, T.; JIANG, X.; PANDOLFI P. P. "Ubiquitination regulates PTEN nuclear import and tumor suppression," **Cell**, v. 128, n. 1, p. 141-156, 2007.
- TSUYSUI, J.; MORIYAMA, M.; ARIMA, N.; OHTSUBO, H.; TANAKA, H.; OZAWA, M. Expression of cadherin-catenin complexes in human leukemia cell lines. **Journal Biochemistry**, v. 120, p. 1034-1039, 1996.
- TSUJIMURA, T.; FURITSU, T.; MORIMOTO, M.; ISOZAKI, K.; NOMURA, S.; MATSUZAWA, Y.; KITAMURA, Y.; KANAKURA, Y. Ligand-Independent Activation of c-kit Receptor Tyrosine Kinase in a Murine Mastocytoma Cell Line P-815 Generated by a Point Mutation. **Blood**, v. 83, p. 2619-2626, 1994.
- TURIN, L.; ACOCELLA, F.; STEFANELLO, D.; OSELIERO, A.; FONDRINI, D.; BRIZZOLA, S.; RIVA, F. Expression of c-kit proto-oncogene in canine mastocytoma: a kinetic study using real-time polymerase chain reaction. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 18, n. 4, p. 343-349, 2006.
- VAIL, D. M. Mast cell tumors. In: WITHROW, S. J.; MACEWEN, E. G. (Ed.). **Small animal clinical oncology**. 2nd ed. Philadelphia: WB Saunders, 1996. p. 192-210.
- VALIUNAS, V.; POLOSINA, Y. Y.; MILLER, H.; POTAPOVA, I. A.; VALIUNIENE, L.; DORONIN, S.; MATHIAS, R. T.; ROBINSON, R. B.; ROSEN, M. R.; COHEN, I. S.; BRINK, P. R. Connexin- specific cell-to-cell transfer of short interfering RNA by gap junctions. **Journal Physiology**, v. 568, p. 459-468, 2005.
- VANDENBARK, G. R.; DE CASTRO, C. M.; TAYLOR, H.; DEW-KNIGHT, S.; KAUFMAN, R. E. Cloning and strutral analysis of the human c-kit gene. **Oncogene**, v. 7, p. 1259-1266, 1992.
- VAN DER HEYDEN, M. A. G.; ROOK, M. B.; HERMANS, M. M. P.; RIJSEN, G.; BOONSTRA, J.; DEFIZE, L. H. K.; DESTRE, O. H. J. Identification of connexin43 as a functional target for Wnt signaling. **Journal Cell Science**, v. 111, p. 1741-1749, 1998.
- VAN HENGEL, J.; VANHOENACKER, P.; STAES, K.; VAN ROY, F. Nuclear localization of the p120(ctn) Armadillo-like catenin is counteracted by a nuclear export signal and by E-cadherin expression. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96 p. 7980-7985, 1999.

- VAN LINT, P.; LIBERT, C. Chemokine and cytokine processing by matrix metalloproteinase and its effect on leukocyte migration and inflammation. **Journal Leukocyte Biology**, v. 82, p. 1375-1381, 2007.
- VAN ROY, F.; BERX, G. "The cell-cell adhesion molecule Ecadherin." **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 65, n. 23, p. 3756-3788, 2008.
- VINKEN, M.; PAPELEU, P.; SNYKERS, S.; DE ROP, E.; HENKENS, T.; CHIPMAN, J. K.; ROGIERS, V.; VANHAECKE, T. Involvement of cell junctions in hepatocyte culture functionality. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 36, p. 299-318, 2006.
- VERMEULEN, S. J.; BRUYNEEL, E. A.; BRACKE, M. E.; DE BRUYNE, G. K.; VENNEKENS, K. M.; VLEMINCKX, K. L.; BERX, G. J.; VAN ROY, F. M.; MAREEL, M. M. Transition from the noninvasive to the invasive phenotype and loss of α -catenin in human colon cancer cells. **Cancer Research**, v. 55, p. 4722-4728, 1995.
- VERWEIJ, J.; CASALI, P. G.; ZALCBURG, J.; LECESNE, A.; REICHARDT, P.; BLAY, J.-Y.; ISSELS, R.; OOSTEROM, A. V.; HOGENDOORN, P. C. W.; GLABBEKE, M. V.; BERTULLI, R.; JUDSON, I. Progression-free survival in gastrointestinal stromal tumours with high-dose imatinib: randomised trial. **The Lancet**, v. 364, p. 1127-1134, 2004.
- VIROLLE, T.; ADAMSON, E. D.; BARON, V.; BIRLE, D.; MERCOLA, D.; MUSTELIN, T.; BELLE, I. "The Egr-1 transcription factor directly activates PTEN during irradiation induced signaling." **Nature Cell Biology**, v. 3, n. 12, p. 1124-1128, 2001.
- VISSE, R.; NAGASE, H. Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases Structure, Function, and Biochemistry. **Circulation Research**, v. 92, p. 827-839, 2003.
- VLIAGOFTIS, H.; HUTSON, A. M.; MAHMUDI-AZER, S.; KIM, H.; RUMSAENG, V.; OH, C. K.; MOQBEL, R.; METCALFE, D. D. Mast cells express connexins on their cytoplasmic membrane. **Journal Allergy and Clinical immunology**, v. 103, p. 656-662, 1999.
- WAITE, K. A.; ENG, C. Protean PTEN: form and function. **American Journal Human Genetics**, v. 70, p. 829-844, 2002.
- WALLINGFORD, J. D.; HABAS, R. The development biology of Dishelled: an enigmatic protein governing cell fate and cell polarity. **Development**, v. 132, n. 20, p. 4421-4436, 2005.
- WALLS, A. F.; BRAIN, S. D.; DESAI, A.; JOSE, P. J.; HAWKINGS, E.; CHURCH, M. K.; WILLIAMS, T. J. Human mast cell tryptase attenuates the vasodilator activity of calcitonin gene-related peptide. **Biochemical Pharmacology**, v. 43, p. 1243-1248, 1992a.
- WALLS, A. F.; BENNET, A. R.; SUEIRAS-DIAZ, J.; OLSSON, H. The kininogenase activity of human mast cell tryptase. **Biochemical Society Transactions**, v. 20, p. 260S, 1992b.

- WEIDNER, N.; AUSTEN, K. "Heterogeneity of mast cells at multiple body sites: Fluorescent determination of avidin binding and immunofluorescent determination of chymase, tryptase and carboxypeptidase content." **Pathology Research and Practice**, v. 189, p. 156-62, 1993.
- WEBSTER, J. D.; KIUPEL, M.; YUZBASIYAN-GURKAN, V. Evaluation of the kinase domain of c-Kit in canine cutaneous mast cell tumors. **BMC Cancer**, v.6, n. 85, p.1-8, 2006a
- WEBSTER, J. D.; YUZBASIYAN-GURKAN, V.; KANEENE, J. B.; MILLER, R.; RESAU J. A.; KIUPEL, M. The role of c-KIT in tumorigenesis: evaluation in canine cutaneous mast cell tumors. **Neoplasia**, v. 8, p.104-111, 2006b.
- WEBSTER, J. D.; YUZBASIYAN-GURKAN, V.; MILLER, R. A.; 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, n. 3, p. 298-308, 2007.
- WELLE, M. Development, significance, and heterogeneity of mast cells with particular regard to the mast cell-specific proteases chymase and tryptase. **Journal Leukocyte Biology**, v. 61, p. 233-245, 1997.
- WELLE, M. M.; BLEY, C. R.; HOWARD, J.; RUFENACHT, S. Canine mast cell tumors: A review of the pathogenesis, clinical features, pathology and treatment. **Journal of Veterinary Oncology**, v. 19, n. 6, p. 321-339, 2008.
- WELLER, K.; FOITZIK, K.; PAUS, R.; SYSKA, W.; MAURER, M. Mast cells are required for normal healing of skin wounds in mice. **The Federation of American Societies For experimental Biology Journal**, v. 20, p. 2366–2368, 2006.
- WENG, L. P.; SMITH, W. M.; DAHIA, P. L. M. PTEN Suppresses Breast Cancer Cell Growth by PhosphataseActivity-dependent G 1 Arrest followed by Cell Death. **Cancer Research**, v. 59, p. 5808-5814, 1999.
- WHELOCK, M. J.; JOHNSON, K. R. Cadherins as modulators of cellular phenotype. **Annual Review Cell Development Biology**, v. 19, p. 207-235, 2003.
- WIJNHOFEN, B. P.; DINJENS, W. N.; PIGNATELLI, M. E-cadherin-catenin cell-cell adhesion complex and human cancer. **British Journal Surgery**, v. 87, n. 8, p. 992-1005, 2000.
- WILLIAMS, C. M.; GALLI, S. J. The diverse potential effector and immunoregulatory roles of mast cells in allergic disease. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 105, p. 847-859, 2000.
- WILLECKE, K.; EIBERGER, J.; DEGEN, J.; ECKARDT, D.; ROMUALDI, A.; GULDENAGEL, M.; DEUTSCH, U.; SOHL, G. Structural and functional diversity of connexin genes in the mouse and human genome. **Biology Chemistry**, v. 383, p. 725-737, 2002.

WILSON, C. L.; HEPPNER, H. J.; RUDOLPH, L. A.; MATRISIAN, L. M. The metalloproteinase matrilysin is preferentially expressed by epithelial cells in a tissue-restricted pattern in the mouse. **Molecular Biology Cell**, v. 6, p. 851-869, 1995.

WILSON, C. L.; MATRISIAN, L.M. Matrilysin: An epithelial matrix metalloproteinase with potentially novel functions. **International Journal Biochemistry Cell Biology**, v. 28, n. 2, p. 123-136, 1996.

WILSON, C. L.; OUELLETTE, A. J.; SATCHELL, D. P.; AYABE, T.; LO'PEZ-BOABO, Y. S.; STRATMAN, J. L.; HULTGREN, S. J.; MATRISIAN, L. M.; PARKS, W. C. Regulation of intestinal alpha-defensin activation by the metalloproteinase matrilysin in innate host defense. **Science**, v. 286, p. 113-117, 1999.

WILSON, C. L.; SCHMIDT, A. P.; PIRILA, E.; VALORE, E. V.; FERRI, N.; SORSA, T.; GANZ, T.; PARKS, W. C. Differential processing of α - and β -defensin precursors by matrix metalloproteinase-7 (MMP-7). **The Journal of Biological Chemistry**, v. 284, p. 8301-8311, 2009.

WHITEMAN, D. C.; ZHOU, X. P.; CUMMINGS, M. C.; PAVEY, S.; HAYWARD, N. K.; ENG, C. "Nuclear PTEN expression and clinicopathologic features in a population-based series of primary cutaneous melanoma." **International Journal of Cancer**, v. 99, n. 1, p. 63-67, 2002.

WITHROW, S. J. Why worry about cancer in pets? In: WITHROW, S. J.; MACEWEN, E. G. (Ed.). *Small animal clinical oncology*. 4. ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 2007. p. 15-17.

WU, X.; HEPNER, K.; CASTELINO-PRABHU, S.; DO, D.; KAYE, M. B.; YUAN, X-J.; WOOD, J.; ROSS, C.; SAWYERS, C. L.; WHANG, Y. E. "Evidence for regulation of the PTEN tumor suppressor by a membrandelocalized multi-PDZ domain containing scaffold protein MAGI-2." **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 8, p. 4233-4238, 2000.

XIAO, K.; ALLISON, D. F.; BUCKLEY, K. M.; KOTTKE, M. D.; VINCENT, P. A.; FAUNDEZ, V.; and KOWALCZYK, A. P. Cellular levels of p120 catenin function as a set point for cadherin expression levels in microvascular endothelial cells. **Journal Cell Biology**, v. 163, p. 535-545, 2003.

YAMASAKI, H.; NAUS, C. C. G. Role of connexin genes in growth control. **Carcinogenesis**, v. 17, n. 6, p. 1199-1213, 1996.

YANAGISAWA, M.; KAVERINA, I. N.; WANG, A.; FUJITA, Y.; REYNOLDS, A. B.; ANASTASIADIS, P. Z. A novel interaction between kinesin and p120 modulates p120 localization and function. **Journal Biology Chemistry**, v. 279, p. 9512-9521, 2004.

YANAGISAWA, N.; GEIRONSON, L.; AL-SOUD, W. A.; LJUNGH, A. Expression of matrix metalloproteinase-2, -7 and -9 on human colon, liver and bile duct cell lines by enteric

- nd gastric helicobacter species. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 44, n. 2, p. 197-204, 2005.
- YANAGISAWA, M.; ANASTASIADIS, P. Z. p120 catenin is essential for mesenchymal cadherin mediated regulation of cell motility and invasiveness. **Journal Cell Biology**, v. 174, p. 1087-96. 2006.
- YAP, A. S.; NIESSEN, C. M.; GUMBINER, B. M. The juxtamembrane region of the cadherin cytoplasmic tail supports lateral clustering, adhesive strengthening, and interaction with p120ctn. **Journal Cell Biology**, v. 141, p. 779-789, 1998.
- YARDEN, Y.; KUANG, W. J.; YANG-FENG, T.; COUSSENS, L.; MUNEMITSU, S.; DULL, T. J.; CHEN, E.; SCHLESSINGER, J.; FRANCKE, U.; ULLRICH, A. Human proto-oncogene c-kit: a new cell surface receptor tyrosine kinase for an unidentified ligand. **Embo Journal**, v. 6, n. 11 p. 3341-3351, 1987.
- YEE, N. S.; HSIAU, C. W. M.; SERVE, H.; VOSSELLER, K.; BESMER, P. Mechanism of down regulation of c-Kit receptor: roles of receptor tyrosine kinase, phosphatidylinositol 3'-kinase, and protein kinase C. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, p. 991-998, 1994.
- ZAVODOVSKAYA, R.; CHIEN, M. B.; LONDON, C. A. Use of Kit internal tandem duplications to establish mast cell tumor Clonality in 2 dogs. **Journal of veterinary Internal Medicine**, v. 18, n. 6, p. 915-917, 2004.
- ZAHLER, S.; HOFFMANN, A.; GLOE, T.; POHL, U. Gap-junctional coupling between neutrophils and endothelial cells: a novel modulator of transendothelial migration. **Journal Leukocyte Biology**, v. 73, p. 118-126, 2003.
- 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.
- ZHANG, Z.; ZHANG, R.; JOACHIMIAK, A.; SCHLESSINGER, J.; KONG, X. P. Crystal structure of human stem cell factor: implication for stem cell factor receptor dimerization and activation. **Proceedings National Academy of Science**, v. 97, p. 7732-7737, 2000.
- ZHANG, Y. W.; KANEDA, M.; MORITA, I. The gap junction-independent tumor-suppressing effect of connexin 43. **Journal Biology Chemistry**, v. 45, p. 44852-44856, 2003.
- ZHOU, X. P.; LOUKOLA, A.; SALOVAARA, R.; NYSTROM-LAHTI, M.; PELTOMÄKI, P.; CHAPELLE, A. DE. L.; AALTONEN, L.A.; ENG, C. "PTENmutational spectra, expression levels, and subcellular localization in microsatellite stable and unstable colorectal cancers." **American Journal of Pathology**, v. 161, n. 2, p. 439-447, 2002.
- ZHU, W. M.; DONG, W. F.; MINDEN, M. Alternate splicing creates two forms of the human kit protein. **Leukemia and Lymphoma**, v. 12, p. 441-447, 1994.

ZHU, W.; MIRONOV, N.; YAMASAKI, H. Increased genetic stability of HeLa cells after connexin 43 gene transfection. **Cancer Research**, v. 57, p. 2148-2150, 1997.

ZUCKER-FRANKLIN, D.; GRUSKY, G.; HIRAYAMA, N.; SCHNIPPER, E. "The presence of mast cell precursors in rat peripheral blood." **Blood**, v. 58, p. 544-551, 1981.

Glossário

GLOSSÁRIO

Blue Green Loading Dye = Corante verde e azul utilizado nas amostras de DNA para visualizar a reação de amplificação, tem alta afinidade pela dupla fita de DNA

DNA = ácido desoxirribonucleico.

Foward = *primer* que é lido pela Taq polimerase no sentido 5'-3' da fita de DNA senso.

Gap junction = junções comunicantes do tipo gap, ou hiato.

GenBank = banco de dados públicos onde estão contidos as sequências genômicas de várias espécies.

GJIC = comunicação intercelular através de junções do tipo gap.

In vitro = É uma expressão latina que designa todos os processos biológicos que têm lugar fora dos sistemas vivos.

In vivo = Significa que ocorre ou tem lugar dentro de um organismo.

Loops = alças da molécula de DNA ou no caso das Conexinas, se refere às alças extras e intracelulares que se dobram conectando cada domínio transmembrana.

Mesh = medida de aberturas nas grades das telas de microscopia eletrônica de transmissão.

Overnight = período de tempo correspondente há uma noite.

Polymerase Chain Reaction = reação de polimerização em cadeia.

Pocket = bolsão.

Primer = É uma sequência de geralmente 20 bp que é ponto inicial de reconhecimento pela polimerase na duplicação do DNA senso.

Stem cells = Células Progenitoras.

Stem Cell Factor = Fator de crescimento.

Splicing = É um processo que remove os íntrons e junta os éxons depois da transcrição do RNA.

Touchdown = é uma expressão para descrever uma reação de PCR, onde as temperaturas iniciais são bem altas e vai decrescendo a cada ciclo.