JENNIFER OSTRAND FREYTAG

**Valor prognóstico de marcadores imunohistoquímicos
em mastocitomas cutâneos caninos**

São Paulo

2017

JENNIFER OSTRAND FREYTAG

**Valor prognóstico de marcadores imunohistoquímicos em
mastocitomas cutâneos caninos**

Dissertação 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 Mestre em Ciências

Departamento:

Patologia

Área de concentração:

Patologia Experimental e Comparada

Orientador:

Prof. Dr. Bruno Cogliati

São Paulo

2017

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. 3457
FMVZ

Freytag, Jennifer Ostrand
Valor prognóstico de marcadores imunohistoquímicos em mastocitomas cutâneos caninos. / Jennifer Ostrand Freytag. -- 2017.
76 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, São Paulo, 2017.

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.

Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Prof. Dr. Bruno Cogliati.

1. Mastocitoma. 2. Cães. 3. Marcadores imunohistoquímicos. 4. Revisão sistemática.
5. Meta-análise. I. Título.

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Comissão de Ética no Uso de Animais

São Paulo, 26 de janeiro de 2017
CEUA N [2439290115](#)

Ilmo(a). Sr(a).
Responsável: Bruno Cogliati
Área: 0
Bruno Cogliati (orientador)

Título da proposta: "Valor prognóstico de marcadores imunohistoquímicos em mastocitomas cutâneos caninos".

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais FMVZ/USP

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** a Alteração do cadastro (versão de 19/janeiro/2017) da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "Houve uma mudança do foco do projeto, dessa forma se faz necessária a alteração do título e a diminuição do número de animais. A mudança no foco foi influenciada pela dificuldade técnica em coletar as amostras de mastocitomas cutâneos no momento cirúrgico e por restrição orçamentária para a realização do processo de extração e quantificação de DNA seguida da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para a amplificação dos éxons 8, 9 e 11 do gene c-KIT em um número grande de amostras. Sendo assim foi realizada a pesquisa da expressão de marcadores prognósticos para o mastocitoma cutâneo canino, incluindo os principais receptores de tirosina quinase, como o KIT e o VEGF bem como o marcador de proliferação Ki67 em amostras de mastocitomas cutâneos de 43 cães. "

Comentário da CEUA: "O título foi alterado em função da diminuição do número de animais amostrados e das técnicas utilizadas".

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes
Secretaria Executiva da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: FREYTAG, Jennifer Ostrand

Título: Valor prognóstico de marcadores imunohistoquímicos em mastocitomas cutâneos caninos.

Dissertação 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 Mestre em Ciências

Data: ____ / ____ / ____

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

A minha família, o meu porto seguro.

Ao meu pai Percy (Ronny), que incentivador, sempre meu deu o todo suporte e o encorajamento necessário para que eu começasse com energia a minha jornada na profissão e em todos outros aspectos da minha vida. Seu enorme apoio repleto de amor fazem toda a diferença no meu caminho.

A minha doce mãe Jill, um poço de paciência, meu exemplo de compaixão e simplicidade. É o ouvido mais disponível e interessado nas minhas curiosidades e dificuldades profissionais e pessoais. Seu espírito elevado, companheirismo e sua torcida pela minha felicidade estão sempre em meu coração.

Ao melhor presente que o universo poderia ter me dado, os meus parceiros de ninho e de vôo, meus irmãos. Stephanie (Fâninha), Jessica (Sissi) e Daniel (Dan). A nossa parceria não precisa sequer ser verbalizada para ser sentida, e a sinto 100% do tempo. Ter vocês é ter a certeza de que sempre terei com quem contar e para quem correr durante a minha vida.

Fâninha, minha parceira de útero, mas fazendo o papel da irmã mais velha e super-protetora, acompanha os passos (e vôos) de todos nós com amor.

Sissi a personalidade forte, divertida e doce numa mistura perfeita, a irmã mais nova com os conselhos mais sábios.

Dan, meu caçula, meu parceiro de sintonia tranquila. A mente brilhante, transbordo de orgulho.

Ao meu melhor amigo e amor, Daniel Robles, meu exemplo de parceria e paciência. Agradeço por tê-lo por perto me dando força e amor a todo momento.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Bruno Cogliati, por ter sido orientador no sentido mais completo da palavra. Sempre presente e atencioso me guiou durante esses anos com sua ampla sabedoria e carinho. Agradeço pela preocupação a cada momento e pelo exemplo de pesquisador dedicado e criterioso.

À Dra. Isabel Veloso Alves Pereira, por todo suporte na realização deste trabalho, seu carinho e dedicação foram fundamentais para que ele fosse concluído com êxito. Agradeço pela convivência e amizade construída nesse período e pelo exemplo de pesquisadora e pessoa que é.

À Dra. Tereza Cristina, por todo apoio e atenção dedicados a mim desde o início desta jornada, pela companhia e amizade fortalecida todos os dias (e noites) que convivemos no laboratório, sempre me dando suporte com muito conhecimento. Admiro e agradeço a sua paciência e carinho.

A todos os colegas do LAPMOL, que tornaram essa jornada repleta de ensinamentos, solidariedade e amizade. Sem os quais esses anos não teriam sido preenchidos de tantos bons momentos e cumplicidade. Cada um fez uma diferença enorme para mim nesses anos. Isis Paixão, com seu coração enorme, Verônica Mollica, com seu carinho e parceria, Juliana Guerra, sempre somando com seus amplos conhecimentos, Bruna, Andressa, Valéria, Sara, Julieta, Guilherme, Ana e Valter.

Aos meus grandes amigos e parceiros, Marcelo Monte Mór Rangel e Krishna Duro de Oliveira, por estarem sempre ao meu lado dando todo o suporte para que eu entrasse no mestrado e realizasse todo esse caminho. Exemplos de profissionais dedicados, competentes e pessoas do bem que fazem parte da minha vida somando em diversos sentidos. Serei sempre grata pelo carinho e força.

Ao Prof. Dr. Isac de Castro, pelo grande apoio na condução criteriosa deste estudo. Agradeço pela atenção e disponibilidade em cada etapa onde transmitiu seus amplos conhecimentos.

Ao Prof. Dr. Ricardo Strefezzi e a Doutoranda Lidia Pulz, pela colaboração com este projeto.

Ao meu amigo e colega Marcello Tedardi, por sempre me auxiliar com generosidade e simpatia ímpares.

Ao programa de pós-graduação de Patologia Experimental e Comparada do departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – USP.

A secretaria e todos os funcionários do VPT, pelo suporte e paciência.

Aos funcionários da biblioteca da FMVZ/USP, em especial a Evadne, pelo apoio, disponibilidade e gentileza.

A todos os professores que fizeram parte da minha formação desde a escola, graduação e pós-graduação. Agradeço por todo o conhecimento transmitido.

A toda minha amorosa e unida família, que estão sempre torcendo por mim e me dando forças. Aos meus tios: Tia Kim, Tio Pedro e Tio Ako e aos meus primos queridos: Thomas, Christian, Lays, Alessandra, Jenny e Mathias.

A minha prima e melhor amiga, Mel Saloio que sempre emana a mim um apoio enorme com carinho e preocupação constantes. É um presente tê-la em minha vida.

A minha madrinha, Tia Ivete e meus primos Melina e Thomas. Agradeço pela maravilhosa energia que sinto desta família.

Ao meu tio do coração e o veterinário que fez com que eu quisesse ser veterinária, Angelo Zapparoli. Um exemplo de profissional e principalmente de pessoa.

A família querida e amiga que a vida me trouxe e sempre me dão forças, Luciana, Guilherme e Theo.

As minhas queridas amigas Renata Barton, Gleyce Sampaio, Katarina Yamada e Mariana Miata por toda a amizade e parceria que mantivemos desde a graduação, são os presentes que a veterinária me trouxe.

A minha amiga e parceira Camila Souza, por sempre estar por perto e me apoiar nos meus estudos e obstáculos. Agradeço pelo exemplo de carinho.

A Deus e aos meus amigos espirituais, sinto sua proteção em cada passo que dou.

As pessoas que não estão presentes fisicamente, mas sempre as sinto por perto me enchendo de energia e amor, Tio Kuki, Vovó Tere e Tio Dani.

Ao meu melhor amigo canino Bonifácio, o maior exemplo de amor incondicional que já recebi de um animal. Acompanhou-me durante muitos anos, enchendo cada pedacinho dos meus dias com seu amor. E partiu no final desta jornada que concluo agora, depois de uma vida longa e linda.

A minha anjinha da oncologia, Dondoca, a gatinha que me fez entrar nesta área com todo o coração.

Enfim, a todos os colegas, amigos e familiares que de alguma forma colaboraram e torceram por mim.

“Everyone you meet is fighting
a battle you know nothing
about. Be kind. Always.”

Ian Maclaren

RESUMO

FREYTAG, J. O. **Valor prognóstico de marcadores imunohistoquímicos em mastocitomas cutâneos caninos.** [Prognostic value of immunohistochemical markers in canine cutaneous mast cell tumors] 2017. 76 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

O mastocitoma (MCT) é um dos tumores mais frequentes em cães, compreendendo de 16 a 21% de todas as neoplasias cutâneas nesta espécie. A graduação histológica é considerada o padrão ouro na avaliação prognóstica dos MCTs, porém seu comportamento biológico variado ressalta a necessidade de métodos complementares para uma avaliação precisa. Atualmente, identifica-se na literatura indexada uma série de estudos propondo novos marcadores moleculares como fatores prognósticos em MCTs caninos, porém poucos estão consolidados na rotina clínica e/ou diagnóstica. Assim, este trabalho teve como objetivo principal investigar o valor prognóstico de marcadores imunohistoquímicos publicados em artigos científicos através de uma revisão sistemática e meta-análise, assim como avaliar o valor prognóstico do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) em MCTs caninos. O processo de revisão sistemática se iniciou com 124 estudos identificados em 5 bases de dados e, após a aplicação dos critérios de inclusão e exclusão, 7 artigos foram selecionados para a meta-análise. Os resultados demonstraram que o marcador de proliferação celular Ki67 pode ser considerado um bom fator prognóstico nos MCTs caninos. Porém, a baixa qualidade dos artigos e a insuficiência de dados publicados impossibilitaram a avaliação de outros marcadores, incluindo o receptor de tirosina quinase KIT. No estudo retrospectivo, a imunoexpressão dos marcadores KIT, Ki67 e VEGF foi avaliada em MCTs cutâneos de 43 cães. O marcador Ki67 apresentou correlação significativa com a taxa de mortalidade e sobrevida e o marcador KIT apresentou diferença significativa de sobrevida entre o padrão membranoso e citoplasmático difuso, porém não foram observadas diferenças no VEGF. Em conclusão, estes estudos validaram os marcadores de proliferação celular Ki67 e o receptor de tirosina quinase KIT como principais fatores prognósticos em MCTs caninos, enquanto o VEGF não foi indicado. Por fim, a revisão sistemática permitiu uma análise crítica da qualidade dos trabalhos publicados na área, ressaltando a importância da padronização de metodologias analíticas e da documentação completa de dados clínicos, patológicos e estatísticos empregados em estudos controlados na oncologia veterinária.

Palavras-chave: mastocitoma, cães, marcadores imunohistoquímicos, VEGF, fatores prognósticos, oncologia veterinária, revisão sistemática, meta-análise.

ABSTRACT

FREYTAG, J. O. **Prognostic value of immunohistochemical markers in canine cutaneous mast cell tumors.** [Valor prognóstico de marcadores imunohistoquímicos em mastocitomas cutâneo canino] 2017. 76 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Mast cell tumor (MCT) is one of the most frequent tumors in dogs, accounting for 16 to 21% of all cutaneous tumors in this species. Histological grading is considered the standard evaluation method to access the prognostic of MCTs. However, its varied biological behavior highlights the need of complementary methods for an accurate evaluation. Currently, a number of studies proposing new molecular markers as prognostic factors in canine MCTs is identified in the indexed literature, but few are consolidated in the clinical and/or diagnostic routine. The aim of this study was to investigate the prognostic value of immunohistochemical markers published in scientific articles through a systematic review and meta-analysis, as well as to evaluate the prognostic value of vascular endothelial growth factor (VEGF) in canine MCTs. The systematic review process has started with 124 studies identified in 5 databases and, after applying the inclusion and exclusion criteria, 7 articles were selected for the meta-analysis. The results demonstrated that the cell proliferation marker Ki67 can be considered a good prognostic factor in canine MCTs. However, poor quality of the articles and insufficient published data made it impossible to evaluate other markers, including the tyrosine kinase receptor KIT. In the retrospective study, immunoexpression of KIT, Ki67 and VEGF markers was evaluated in cutaneous MCTs from 43 dogs. The Ki67 marker showed a significant correlation with the mortality and survival rates, and the KIT marker showed a significant difference in survival between the membranous and diffuse cytoplasmic patterns groups, but no differences were observed in VEGF. In conclusion, these studies validated the cell proliferation marker Ki67 and the KIT tyrosine kinase receptor as major prognostic factors in canine MCTs, whereas VEGF was not indicated. Finally, the systematic review allowed a critical analysis of the quality of the published studies in this area, emphasizing the importance of the standardization of analytical methodologies and the complete documentation of clinical, pathological and statistical data used in controlled studies in veterinary oncology.

Keywords: mast cell tumor, dogs, immunohistochemical markers, VEGF, prognostic factors, veterinary oncology, systematic review, meta-analysis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Fluxograma demonstrando as fases da revisão sistemática e a seleção dos estudos para meta-análise.	28
Figura 2- Resultado da meta-análise para Ki67, positividade/negatividade relacionado ao desfecho de sobrevida/óbito.	37
Figura 3- Curva de sobrevida (Kaplan-Meier) dos pacientes estudados em função da graduação histológica (Patnaik et al. e Kiupel et al.)	52
Figura 4 – Curva de sobrevida (Kaplan-Meier) dos pacientes estudados em função da expressão da proteína KIT.....	56
Figura 5 – Curva de sobrevida (Kaplan-Meier) dos pacientes estudados em função da expressão da proteína KIT.....	57
Figura 6 - Curva de sobrevida (Kaplan-Meier) dos pacientes estudados em função da expressão do marcador de proliferação Ki67 (cut-off 1,3%).	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Descrição da aplicação de terapias adjuvantes e neoadjuvantes ao procedimento cirúrgico nos artigos selecionados. São Paulo, 2017.....	33
Tabela 2- Dados extraídos dos artigos sobre o Ki67 submetidos à meta-análise. São Paulo, 2017.	34
Tabela 3- Dados extraídos dos artigos sobre o KIT submetidos à meta-análise. São Paulo, 2017.	35
Tabela 4- Valores de Odds ratio não ajustados e respectivos tamanhos amostrais. São Paulo, 2017.	36
Tabela 5- Dados clínicos, histopatológicos, imunohistoquímicos e sobrevida de cada paciente. São Paulo, 2017.....	53
Tabela 6- Correlação da taxa de mortalidade e análise de óbito associadas ao MCT com as variáveis gênero, grau histológico, VEGF e KIT pelo teste Qui-quadrado de Pearson. São Paulo, 2017.....	55
Tabela 7- Correlação da taxa de mortalidade e análise de óbito associadas ao MCT com as variáveis idade e Ki67 pelo teste Mann-Whitney. São Paulo, 2017.....	55

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	15
2	OBJETIVOS	19
2.1	OBJETIVO GERAL.....	19
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
CAPÍTULO 1		21
3	INTRODUÇÃO	23
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
4.1	ESTRATÉGIA DE BUSCA.....	25
4.2	CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO E INCLUSÃO	26
4.3	EXTRAÇÃO DE DADOS	29
4.4	QUALIDADE DOS ARTIGOS SELECIONADOS	29
4.5	META-ANÁLISE	30
5	RESULTADOS.....	32
5.1	CARACTERÍSTICAS DOS ESTUDOS SELECIONADOS	32
5.2	KI67.....	36
5.3	KIT	37
6	DISCUSSÃO	38
CAPÍTULO 2		44
7	INTRODUÇÃO	46
8	MATERIAIS E MÉTODOS.....	49
8.1	ANIMAIS	49
8.2	GRADUAÇÃO HISTOLÓGICA	49
8.3	IMUNOHISTOQUÍMICA	50
8.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	50
9	RESULTADOS.....	51
10	DISCUSSÃO	59
REFERÊNCIAS		62
APÊNDICES		75

1 INTRODUÇÃO GERAL

Dentre as doenças mais prevalentes em cães atualmente, o câncer tem ocupado um espaço importante na medicina veterinária devido sua elevada mortalidade. O mastocitoma (MCT) é uma neoplasia maligna que tem origem nos mastócitos, células inflamatórias de origem hematopoiética que respondem aos sinais do sistema imunológico através da liberação de mediadores inflamatórios (STONE; PRUSSIN; METCALFE, 2010). Como os mastócitos geralmente estão associados aos vasos sanguíneos e superfícies epiteliais, os MCTs podem ser encontrados em uma ampla variedade de tecidos, sendo mais comumente diagnosticados em derme, tecidos subcutâneos e mucosos (LONDON; SEGUIN, 2003). O MCT é uma neoplasia comum em cães, representando até 21% de todas as neoplasias cutâneas nesta espécie (BRODEY, 1970; FINNIE; BOSTOCK, 1979; MISDORP, 2004; SHOOP et al., 2015). O MCT também é descrito em cerca de 20% dos tumores cutâneos em felinos, porém seu comportamento biológico é menos agressivo na grande maioria dos casos (MILLER et al., 1991).

Macroscopicamente, o MCT apresenta-se muito variado, podendo ser localizado na derme de forma circunscrita, firme e proeminente, com sua superfície eritematosa e ulcerada; pode também apresentar invasão e metástase local ou, ainda, se originar no tecido subcutâneo e assemelhar-se com um lipoma. Estas diferentes apresentações dificultam o diagnóstico presuntivo feito apenas pelas características morfológicas (LONDON; SEGUIN, 2003; WELLE et al., 2008). O estadiamento clínico do MCT é dividido em 4 estágios, dos quais o estágio 1 representa tumores solitários que estão confinados à derme e não apresentam metástase para linfonodos regionais ou órgãos distantes; o estágio 2 também são tumores confinados a derme, mas que acometem os linfonodos regionais; o estágio 3 representa tumores cutâneos múltiplos ou grandes e infiltrados, com ou sem acometimento de linfonodo regional e, por fim, o estágio 4 caracteriza animais diagnosticados com metástases distantes (MISDORP, 2004; SLEDGE; WEBSTER; KIUPEL, 2016).

Os sinais clínicos relacionados ao MCT, geralmente, estão associados à liberação de substâncias vasoativas pelos mastócitos neoplásicos, como a histamina e a heparina (LONDON; SEGUIN, 2003). Assim, a degranulação mastocitária pode resultar em síndromes paraneoplásicas, incluindo hipotensão, úlceras gastrointestinais e

hemorragias (PRIESTER, 1973; O'KEEFE, 1990; MISDORP, 2004). Foram descritos que 35 a 83% dos cães com MCT apresentavam concentrações plasmáticas elevadas de histamina e úlceras gástricas ao exame necroscópico (HOWARD et al., 1969; FOX et al., 1990). Os MCTs cutâneos devem ser avaliados separadamente da sua variação subcutânea por apresentarem melhor prognóstico e menor taxa de recidiva e metástase (NEWMAN et al., 2007). Outras síndromes que podem, ocasionalmente, estar associadas ao MCT incluem coagulopatias, anafilaxia, hipergamaglobulinemia e doenças glomerulares (ROGERS, 1996).

O diagnóstico do MCT pode ser realizado pela análise citológica do nódulo cutâneo, empregando o método de punção aspirativa por agulha fina (PAAF) (BARRETT, 1976; MACY, 1986). No entanto, a graduação histológica da neoplasia ainda é considerada o padrão ouro na avaliação prognóstica dos MCTs (MURPHY et al., 2004; SCHULTHEISS et al., 2011; TAKEUCHI et al., 2013; SLEDGE; WEBSTER; KIUPEL, 2016). As primeiras classificações histológicas foram propostas por Bostock (1973) e Patnaik et al. (1984), os quais demonstraram relação significativa entre o grau histológico e a sobrevida dos animais. Ambos os autores classificaram os MCTs em 3 graus histológicos: (I) bem diferenciado, (II) moderadamente diferenciado e (III) pouco diferenciado. Esta classificação foi determinada por características citológicas, como grau de granulação e pleomorfismo, índice mitótico e extensão do infiltrado neoplásico nos tecidos subjacentes (BOSTOCK, 1973; PATNAIK; EHLER; MACEWEN, 1984). Segundo o sistema proposto por Patnaik et al. (1984), 40% dos MTCs diagnosticados são classificados como grau II, o que resulta em uma grande variabilidade no comportamento biológico tumoral dentro deste subgrupo. Com o objetivo de reduzir a incerteza prognóstica no grau intermediário de Patnaik et al. (1984), Kiupel et al. (Kiupel *et al.*, 2011) propuseram uma nova classificação, a qual divide os MCTs em alto e baixo grau, utilizando critérios citológicos. Atualmente, as classificações de Patnaik et al. (1984) e Kiupel et al. (2011) são amplamente difundidas e aplicadas na rotina diagnóstica dos MTCs caninos.

Apesar do refinamento nos parâmetros celulares e a facilidade de sua aplicação na rotina diagnóstica, a graduação histológica pode não ser suficiente para a determinação precisa do prognóstico de cada paciente, sendo necessária a utilização de métodos complementares como, por exemplo, os marcadores imunohistoquímicos (SÉGUIN et al., 2001; SABATTINI et al., 2015). Atualmente, identifica-se na literatura uma série de estudos propondo marcadores imunohistoquímicos como fatores prognósticos nos

MCTs caninos (SCASE et al., 2006; REBUZZI et al., 2007; WEBSTER et al., 2007; VASCELLARI et al., 2013). Porém, com exceção das proteínas KIT e Ki67, ainda existem muitas controversas no real valor prognóstico destes marcadores, principalmente pela pequena quantidade de estudos realizados, muitas vezes com poucos animais, grande heterogeneidade racial, além da diversidade de características teciduais e genéticas dos tumores.

Para avaliação da proliferação celular em MCTs caninos, diversos métodos são aplicados na rotina diagnóstica e estão associados com a sobrevida, como a avaliação do índice mitótico, detecção histoquímica por impregnação pela prata das regiões organizadores de nucléolos (AgNOR) e índice de proliferação celular pela detecção imunohistoquímica de marcadores nucleares, como PCNA ou Ki67 (ABADIE; AMARDEILH; DELVERDIER, 1999; WEBSTER et al., 2007; MAGLENNON et al., 2008; VASCELLARI et al., 2013). O índice mitótico é o parâmetro mais utilizado para estimar a proliferação celular e é um importante critério da classificação histológica, todavia, este índice apenas indica as células que estão na fase de mitose do ciclo celular, o que pode levar a subestimação da proliferação (SLEDGE; WEBSTER; KIUPEL, 2016). Por sua vez, a detecção histoquímica de AgNOR reflete a taxa relativa na qual as células estão progredindo pelo ciclo celular (SLEDGE; WEBSTER; KIUPEL, 2016). Adicionalmente, o marcador de proliferação Ki67 é uma proteína presente em todas as fases do ciclo celular, proporcionando um índice de proliferação celular mais preciso (GERDES et al., 1984; SCHOLZEN; GERDES, 2000; SLEDGE; WEBSTER; KIUPEL, 2016). O Ki67 e a quantificação de AgNOR foram relacionados com prognóstico em MCTs caninos em diversos estudos (SIMOES; SCHONING; BUTINE, 1994; ABADIE; AMARDEILH; DELVERDIER, 1999; SCASE et al., 2006; OZAKI et al., 2007; WEBSTER et al., 2007; MAGLENNON et al., 2008; VASCELLARI et al., 2013; BERLATO et al., 2015).

Outro marcador molecular muito utilizado nestes tumores é o gene c-Kit, que codifica a proteína do receptor de tirosina quinase KIT (YARDEN et al., 1987). Sua ativação constitutiva pode iniciar a cascata de sinalização celular, levando a proliferação e invasão das células tumorais, independentemente da presença de seu ligante, o fator de células tronco (*stem cell factor*, *SCF*) (WEBSTER et al., 2006). A presença de mutações no gene c-Kit foi identificada em MCTs caninos (MA et al., 1999; ZEMKE; YAMINI; YUZBASIYAN-GURKAN, 2002), bem como a expressão aberrante da proteína KIT nos mastócitos neoplásicos (REGUERA et al., 2000; PREZIOSI; MORINI; SARLI,

2004; WEBSTER et al., 2006; TAKEUCHI et al., 2013), e ambas foram correlacionadas com o pior prognóstico da doença. Mutações do tipo duplicação interna em tandem (DIT) no éxon 11 do gene c-Kit podem estar presentes entre 20 a 30% dos MCTs em cães (WEBSTER et al., 2006; LETARD et al., 2008). Animais portadores desta mutação tem maiores chances de responder ao tratamento com inibidores de tirosina quinase, como o Toceranic e Masitinib (LONDON, 2009), ressaltando sua importância na conduta clínica no contexto da medicina personalizada.

Frente à variedade do seu comportamento biológico e a necessidade pela busca de fatores prognósticos, muitos estudos são direcionados a pesquisa de novos marcadores moleculares que possam colaborar na elucidação do prognóstico individualizado de cada paciente (ABADIE; AMARDEILH; DELVERDIER, 1999; KIUPEL et al., 2004; PREZIOSI; MORINI; SARLI, 2004; WEBSTER et al., 2007; MAGLENNON et al., 2008; GIANTIN et al., 2012a; BERLATO et al., 2015; COSTA CASAGRANDE et al., 2015; FONSECA-ALVES et al., 2015). Desta forma, além dos marcadores rotineiramente avaliados (KIT e Ki67), outras moléculas já foram testadas e demonstraram, mesmo que em poucos estudos, correlação com a evolução e sobrevida de animais com MCT. Dentre eles, destacam-se a expressão do gene supressor de tumores p53, marcadores de proliferação ou ciclo celular, como PCNA e ciclina D1, o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), os marcadores endoteliais fator VIII e CD31, as proteínas relacionadas a apoptose, como BAX, Bcl-2 e survivina, o inibidor de ciclooxigenase 2, COX-2, dentre outros (SIMOES; SCHONING; BUTINE, 1994; ABADIE; AMARDEILH; DELVERDIER, 1999; GINN et al., 2000; JAFFE et al., 2000; PREZIOSI; SARLI; PALTRINIERI, 2004; SCASE et al., 2006; WU; INOUE, 2006; PATRUNO et al., 2009; GIANTIN et al., 2012b; PRADA et al., 2012; STREFEZZI et al., 2012; VASCELLARI et al., 2013).

Frente à clara importância do MCT em cães e a grande variedade de marcadores imunohistoquímicos propostos na literatura como fatores prognósticos nesta neoplasia, faz-se necessária uma investigação criteriosa sobre a aplicação destes marcadores na oncologia veterinária. Neste contexto, o presente estudo se propôs a realizar uma revisão sistemática e meta-análise dos marcadores imunohistoquímicos em MCTs caninos, sendo esta a metodologia científica mais apropriada para este fim. Ao final, pretende-se detectar quais marcadores apresentam real valor prognóstico no MCT canino, além de direcionar a realização de trabalhos que considerem aspectos clínicos e estatísticos importantes para a definição de novos marcadores moleculares.

Adicionalmente, foi realizado um estudo complementar para avaliar o valor prognóstico do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) no MCT canino, sendo este um dos marcadores com resultados controversos segundo a literatura veterinária. Os estudos serão apresentados em dois capítulos, sendo o primeiro relacionado à avaliação de marcadores imunohistoquímicos em MCTs caninos pela revisão sistemática e meta-análise e o segundo relacionado ao estudo retrospectivo da expressão do VEGF em amostras de MCTs em 43 cães.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o valor prognóstico de marcadores imunohistoquímicos publicados em artigos científicos indexados, assim como avaliar o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) como potencial fator prognóstico em MCTs caninos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 2.2.1 Identificar quais marcadores imunohistoquímicos apresentam valor prognóstico em MCTs caninos pela revisão sistemática da literatura indexada e meta-análise;
- 2.2.2 Avaliar a qualidade e deficiências dos artigos científicos selecionados sobre marcadores imunohistoquímicos em MCTs caninos pela revisão sistemática e meta-análise;

- 2.2.3 Determinar a imunoexpressão do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) em uma casuística de MCTs caninos, correlacionando-a com seus aspectos clínicos e histopatológicos para a determinação de seu valor prognóstico.

CAPÍTULO 1

Valor prognóstico de marcadores imunohistoquímicos em mastocitomas cutâneos caninos: Revisão sistemática e meta-análise

RESUMO

O mastocitoma (MCT) é um dos tumores mais frequentes em cães, compreendendo de 16 a 21% de todas as neoplasias cutâneas. A graduação histológica ainda é considerada o padrão ouro na avaliação prognóstica dos MCTs, porém seu comportamento biológico variado ressalta a necessidade de métodos complementares para uma avaliação precisa. Atualmente, identifica-se na literatura indexada uma série de estudos propondo novos marcadores moleculares como fatores prognósticos em MCTs caninos, porém poucos estão consolidados na rotina clínica e/ou diagnóstica. No presente estudo, iremos avaliar o valor prognóstico destes marcadores através de uma revisão sistemática e meta-análise. Inicialmente, foram identificados 124 artigos científicos pela busca booleana em 5 bases de dados (Pubmed, Ovid-MEDLINE, Embase, Scopus e Web of Science). Após seleção dos artigos pelos critérios de exclusão e inclusão, 16 estudos compreendendo 4 marcadores (p53, PCNA, Ki67 e KIT) foram submetidos à revisão sistemática. Destes, apenas 7 apresentaram, ou forneceram quando solicitados, os dados para o cálculo do *Odds Ratio* (OD). Sendo assim, artigos com os marcadores KIT e Ki67 foram submetidos à meta-análise. O KIT foi avaliado em dois estudos e, devido este baixo número, apresentou alta heterogeneidade entre os grupos e não pode ser incluída na meta-análise. O Ki67 foi avaliado em 5 estudos e demonstrou correlação com o prognóstico no MCT, com $p < 0,0001$ para um valor de *Odds Ratio* de 7,60 (4,07 - 14,16). Em conclusão, demonstramos que o Ki67 é um forte fator prognóstico nos MCTs caninos e destacamos uma série de deficiências observadas nos trabalhos publicados, principalmente em relação à ausência de dados importantes da análise estatística e apresentação dos resultados.

Palavras-chave: Mastocitoma, revisão sistemática, meta-análise, biomarcadores, prognóstico, imunohistoquímica.

3 INTRODUÇÃO

O mastocitoma (MCT) é uma das neoplasias malignas mais frequentes em cães, compreendendo de 16 a 21% de todas as neoplasias cutâneas (BRODEY, 1970; FINNIE; BOSTOCK, 1979; BOSTOCK, 1986; ROTHWELL et al., 1987; LONDON; SEGUIN, 2003) e com prevalência de 0,27% na população canina (SHOOP et al., 2015). A sua etiologia ainda é desconhecida, mas uma predileção racial indica que características genéticas associadas a diferentes raças podem estar envolvidas (MISDORP, 2004; WARLAND; DOBSON, 2013). Estudos prévios demonstraram maior incidência do MCT em cães das raças *Boxer*, *Golden Retriever*, *Labrador Retriever*, *Cocker Spaniel*, *Schnauzer*, *Beagle*, *Sharpei*, *Rhodesian Ridgebacks*, *Weimaraner* e *Staffordshire Bull Terrier* (BOSTOCK, 1986; ROTHWELL et al., 1987; KIUPEL et al., 2005; WHITE et al., 2011; WARLAND; DOBSON, 2013; SHOOP et al., 2015).

A graduação histológica é considerada o padrão ouro na avaliação prognóstica dos MCTs (MURPHY et al., 2004; SCHULTHEISS et al., 2011; TAKEUCHI et al., 2013; SLEDGE; WEBSTER; KIUPEL, 2016). As primeiras classificações histológicas foram propostas por Bostock (1973) e Patnaik et al. (1984), os quais demonstraram relação significativa entre o grau histológico e a sobrevida dos animais. O sistema proposto por Patnaik et al. (1984) classifica os MCTs em três graus, considerando seus aspectos morfológicos e seu comportamento em relação ao tecido. Segundo esta classificação, aproximadamente 40% dos MCTs diagnosticados são classificados como grau II (PATNAIK; EHLER; MACEWEN, 1984). No entanto, observa-se uma grande variabilidade no comportamento biológico tumoral dentro deste subgrupo. Com o objetivo de reduzir a incerteza prognóstica no grau intermediário de Patnaik et al. (1984), Kiupel et al. (2011) propuseram uma nova classificação, a qual divide os MCTs em alto e baixo grau, utilizando critérios citológicos bem definidos.

Apesar do refinamento nos parâmetros celulares e a facilidade de sua aplicação na rotina diagnóstica, a graduação histológica pode não ser suficiente para a determinação precisa do prognóstico de cada paciente, sendo necessária a utilização de métodos complementares (SÉGUIN et al., 2001; SABATTINI et al., 2015). Atualmente, identifica-se na literatura uma série de estudos propondo marcadores

imunohistoquímicos como fatores prognósticos nos MCTs caninos (SCASE et al., 2006; REBUZZI et al., 2007; WEBSTER et al., 2007; VASCELLARI et al., 2013). Dentre eles, destacam-se os marcadores de proliferação celular, como Ki67 e PCNA (ABADIE; AMARDEILH; DELVERDIER, 1999; SCASE et al., 2006; BERLATO et al., 2015), o receptor de tirosina quinase KIT, dentre diversos outros marcadores (KIUPEL et al., 2004; PREZIOSI; MORINI; SARLI, 2004; REBUZZI et al., 2007; AMORIM et al., 2010; GIANTIN et al., 2012a). Porém, com exceção das proteínas KIT e Ki-67, ainda existem poucas evidências sobre o valor prognóstico dos demais marcadores imunohistoquímicos.

A quantificação das células neoplásicas positivas para o marcador Ki-67, uma proteína nuclear presente nas fases ativas do ciclo celular (GERDES et al., 1984; SCHOLZEN; GERDES, 2000) permite a determinação de um índice de proliferação celular (GERDES et al., 1984; MADEWELL, 2001; MUKARATIRWA, 2005). Este índice tem sido relacionado como fator prognóstico em MCTs caninos em diversos estudos (SIMOES; SCHONING; BUTINE, 1994; ABADIE; AMARDEILH; DELVERDIER, 1999; SCASE et al., 2006; OZAKI et al., 2007; WEBSTER et al., 2007; MAGLENNON et al., 2008; VASCELLARI et al., 2013; BERLATO et al., 2015). Outro importante marcador molecular nos MCTs caninos é o gene c-KIT, que codifica a proteína do receptor de tirosina quinase KIT (YARDEN et al., 1987). A presença de mutações no gene c-Kit foi identificada em MCTs caninos (MA et al., 1999; ZEMKE; YAMINI; YUZBASIYAN-GURKAN, 2002), bem como a expressão aberrante da proteína KIT nos mastócitos neoplásicos (REGUERA et al., 2000; PREZIOSI; MORINI; SARLI, 2004; WEBSTER et al., 2006; TAKEUCHI et al., 2013), e ambas apresentaram correlação com o pior prognóstico da doença.

Frente à variedade do seu comportamento biológico e a necessidade de novos fatores prognósticos, diversos estudos vêm buscando marcadores moleculares que possam colaborar na elucidação do prognóstico preciso de cada paciente. Neste cenário, destacam-se a expressão do gene supressor de tumores p53 (GINN et al., 2000; JAFFE et al., 2000; WU; HAYASHI; INOUE, 2006), marcadores de proliferação ou ciclo celular, como PCNA e ciclina D1 (SIMOES; SCHONING; BUTINE, 1994; ABADIE; AMARDEILH; DELVERDIER, 1999; WEBSTER et al., 2007), fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) (PATRUNO et al., 2009; GIANTIN et al., 2012b), os marcadores endoteliais fator VIII e CD31 (PREZIOSI; SARLI; PALTRINIERI, 2004), as proteínas relacionadas a apoptose, como BAX, Bcl-2 e

survivina (SCASE et al., 2006; STREFEZZI et al., 2012; VASCELLARI et al., 2013) e proteínas relacionadas a inflamação, como prostaglandina E2 e o inibidor de ciclooxigenase 2, COX-2 (AMORIM et al., 2010; PRADA et al., 2012). No entanto, o valor prognóstico destes marcadores ainda é inconsistente, principalmente pela pequena quantidade de estudos realizados, muitas vezes com poucos animais, grande heterogeneidade racial e diversidade de características teciduais e genéticas dos tumores.

Frente à clara importância do MCT em cães e a grande variedade de marcadores imunohistoquímicos propostos na literatura como fatores prognósticos nesta neoplasia, faz-se necessária uma investigação criteriosa sobre a potencial aplicação destes marcadores na rotina clínica e/ou diagnóstica. Neste contexto, o presente estudo se propôs a realizar uma revisão sistemática e meta-análise dos marcadores imunohistoquímicos em MCTs caninos. Ao final, pretende-se detectar quais marcadores apresentam real valor prognóstico no MCT canino, além de direcionar a realização de trabalhos que considerem aspectos clínicos e estatísticos importantes para a definição de novos marcadores moleculares.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado segundo as diretrizes para realização de revisão sistemática e meta-análise PRISMA (*Cochrane Collaboration and Preferred Reporting Items for Systematic Review and Meta-analysis guidelines*) (MOHER et al., 2009).

4.1 ESTRATÉGIA DE BUSCA

A pesquisa dos artigos científicos indexados foi realizada através das bases de dados Pubmed, Ovid-MEDLINE, Embase, Scopus e Web of Science. Foram selecionados artigos publicados até agosto de 2016. A seguinte combinação booleana de palavras foi desenvolvida para a pesquisa: *(mast cell or mastocytoma) and (cance* or neoplas* or tumor*) and (canine or dog) and (protei* or marke* or biomark*) and*

(*prognos* or surviv* or mortal**). A seleção dos artigos foi realizada por quatro pesquisadores independentes e as discrepâncias resolvidas por um quinto avaliador.

4.2 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO E INCLUSÃO

Este trabalho teve como objetivo identificar os artigos científicos publicados em medicina veterinária que correlacionavam marcadores imunohistoquímicos em MCTs caninos ao seu prognóstico. Apenas artigos publicados em língua inglesa e em revistas indexadas foram incluídos. Em uma primeira etapa, os artigos foram avaliados pelo título e resumo de acordo com os seguintes critérios de exclusão: artigos sobre qualquer outra espécie que não a canina; estudos *in vitro*; estudos que não realizaram imunohistoquímica em tecido fixado em formol e incluídos em parafina; revisões de literatura e relatos de caso. Em uma segunda etapa, os artigos restantes foram lidos na íntegra e avaliados de acordo com os critérios de inclusão adaptado das diretrizes do REMARK (“*REporting recommendations for tumour MARKer prognostic studies*”) (MCSHANE et al., 2005), sendo eles: (1) avaliação de mastocitomas cutâneos em cães (*Canis lupus familiaris*), com diagnóstico comprovado por análise histopatológica; (2) associação entre marcadores imunohistoquímicos e as características clínicas; (3) expressão de marcadores moleculares avaliados por imunohistoquímica em tecidos tumorais fixados em formol e incluídos em parafina; (4) realização de estudos retrospectivos ou prospectivos, com população definida e justificativa para casos excluídos; (5) descrição das técnicas de imunohistoquímica, incluindo diluição dos anticorpos primários, tampões, anticorpos secundários e sistemas de detecção; (6) emprego de análise estatística utilizando modelagem de riscos uni ou multivariadas; e (7) apresentação de dados estatísticos com relação a sobrevida dos animais.

O total de 124 artigos foram identificados após a busca booleana nas cinco bases de dados. Após avaliação dos títulos e resumos, 78 artigos foram excluídos e 46 artigos foram considerados relevantes para o estudo. Nos 46 artigos avaliados na íntegra, foram estudados 26 marcadores imunohistoquímicos diferentes, sendo eles: KIT, Ki-67, PCNA, p53, Triptase, Fator VIII, Survivina, Ciclina D1, CD1, TSLC1, MCM7, Bax, Bcl-2, COX-2, MCM3, MMP-2, OCT-4, p-62, VEGF, PGE-2, CD31, LIMS1, p16, E-

caderina, receptor de Vitamina D e MDM2. A partir desta avaliação, 30 artigos foram excluídos por não apresentarem os critérios de inclusão, principalmente pela ausência de dados relacionados à sobrevida dos animais e/ou por serem artigos únicos que avaliam um determinado marcador. Ao final, 16 artigos atenderam aos critérios de inclusão e seguiram para a extração de dados (Figura 1).

Figura 1- Fluxograma demonstrando as fases da revisão sistemática e a seleção dos estudos para meta-análise.

Fonte: (FREYTAG, 2017)

4.3 EXTRAÇÃO DE DADOS

As variáveis que foram extraídas dos artigos selecionados incluíram o nome do primeiro autor, alvo molecular (imunohistoquímica), ano de publicação, número de casos, anticorpo primário utilizado e sua diluição, intervalo de referência para a análise estatística, número de casos considerados positivos, análise uni ou multivariada, *Hazard Ratio* (HR), intervalo de confiança (95%, IC), valor de P, localização da marcação e tipo de sobrevida utilizado, como tempo de sobrevida (TS) ou intervalo livre da doença (ILD).

A principal limitação encontrada no estudo foi o fato de que há uma grande heterogeneidade nas análises estatísticas e formas de apresentação dos resultados na literatura veterinária estudada. Por exemplo, um número muito pequeno de artigos apresentam o valor de *Hazard Ratio* ou as informações necessárias para que este valor pudesse ser calculado. Assim, o próximo passo do estudo foi entrar em contato com os autores de correspondência dos artigos incluídos, via e-mail, convidando-os a colaborar e solicitando as informações necessárias para o cálculo do *Odds Ratio*. Dos 16 artigos selecionados, 6 estudos apresentaram os dados completos e para os 10 restantes foram enviados e-mails solicitando as informações. Dois autores retornaram o contato, porém apenas um forneceu os dados solicitados. Ao final, um total de sete artigos possuíam as informações necessárias para serem submetidos à meta-análise, e incluíam os marcadores de proliferação celular Ki-67 e o receptor de tirosina quinase KIT (Figura 1).

4.4 QUALIDADE DOS ARTIGOS SELECIONADOS

Para avaliação da qualidade dos 7 artigos selecionados, os estudos deveriam ter sido submetidos à avaliação por pares em revistas indexadas e possuírem a aprovação do comitê de ética. Adicionalmente, foi aplicada a escala NOS (*Newcastle-Ottawa Scale*) (GA, 2005), que busca avaliar a qualidade dos estudos não randomizados utilizados em meta-análises. Um “sistema de estrelas” é usado para avaliar cada estudo sob três perspectivas: (1) seleção do grupo estudado; (2) comparabilidade dos grupos; e

(3) determinação da exposição. Cada estudo pode pontuar o máximo de 9 estrelas, sendo que estudos com pontuação menor do que 7 são considerados de baixa qualidade. Os estudos avaliados nesta meta-análise pontuaram entre uma e duas estrelas no total. Essa baixa pontuação se deu pelo fato da escala aplicada ter sido desenvolvida para estudos de caso-controle e os estudos selecionados da literatura veterinária e incluídos nesta meta-análise são estudos de sobrevivência, sem um grupo controle. Na ausência de comparação com grupos controle, os estudos incluídos poderiam pontuar até 3 estrelas. Após a aplicação da escala NOS, seis estudos obtiveram duas estrelas referentes à definição adequada de caso, com validação independente e representatividade (ABADIE; AMARDEILH; DELVERDIER, 1999; KIUPEL et al., 2004), (WEBSTER et al., 2008), (BERLATO et al., 2015), (VASCELLARI et al., 2013) e (COSTA CASAGRANDE et al., 2015). O estudo de Taylor et al. (2010) obteve apenas uma estrela, deixando de pontuar no tópico de representatividade por estudar apenas um grupo de graduação histológica (grau II de Patnaik et al., 1984). Estes dados refletem a baixa qualidade metodológica dos artigos publicados em medicina veterinária e selecionados por esta revisão sistemática.

4.5 META-ANÁLISE

As estimativas do efeito foram obtidas comparando as taxas de *Odds* ao final do estudo para cada grupo; e foram expressas como *Odds ratio*, com seus respectivos intervalos de confiança entre os grupos. Os cálculos foram realizados utilizando um modelo de efeito randômico. A heterogeneidade estatística dos efeitos do tratamento entre os estudos foi avaliada usando o teste Qui-Quadrado de Mantel-Henzel e o teste de inconsistência de Der Dimonion-Laird. Todas as análises foram realizadas utilizando o programa *Review Manager* versão 5.1 (*Cochrane Collaboration*) (MOHER et al., 2009).

A análise da heterogeneidade entre os estudos foi realizada através de duas estratégias: 1) a meta-análise foi executada novamente, retirando-se um artigo de cada vez para verificar se algum estudo individual explicava a heterogeneidade; 2) foram realizadas análises de sensibilidade para avaliar subgrupos de estudos com maior probabilidade de produzir estimativas válidas de intervenção, com base em informações

clínicas pré-especificadas relevantes que tenham influência nos efeitos sobre os resultados. O valor de $\alpha \leq 0.05$ foi considerado para erro tipo I e risco $\beta \leq 20\%$ para erro tipo II.

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERÍSTICAS DOS ESTUDOS SELECIONADOS

Os sete estudos selecionados para a meta-análise foram realizados nos Estados Unidos, Reino Unido, Brasil, França ou Itália, totalizando 512 amostras de tumores de 510 animais incluídos nos estudos. Diversos tamanhos de coortes foram usados, variando entre 28 e 120 casos. Dos 510 animais incluídos, as raças com maior incidência nos estudos foram *Boxer* (≈ 95 animais) e *Labrador Retriever* (≈ 53 animais). O gênero dos animais se distribuiu da seguinte forma, 269 fêmeas, 236 machos e para cinco animais não foi registrado o gênero. A média de idade dos animais diagnosticados foi de 8,2 anos, sendo que um trabalho não citou este dado.

Todos os estudos reportam coortes de pacientes que foram submetidos a procedimento cirúrgico como principal tratamento para o MCT, cinco autores relatam que os pacientes não foram submetidos à quimioterapia antineoplásica neoadjuvante e dois não citam este dado. Um dos trabalhos relata que instituiu terapia anti-neoplásica sistêmica, com vimblastina no pós-operatório em todos os animais (WEBSTER et al., 2008), dois autores relatam que alguns animais foram submetidos à terapia adjuvante no pós-operatório (TAYLOR et al., 2010; VASCELLARI et al., 2013), um autor afirma que nenhum fármaco além de prednisolona foi usado (BERLATO et al., 2015), outros dois autores afirmam não ter havido nenhuma terapia além da cirurgia (ABADIE; AMARDEILH; DELVERDIER, 1999; KIUPEL et al., 2004) e um autor não cita este dado (Tabela 1).

De acordo com o sistema de graduação proposto por Patnaik et al. (1984), dos 512 MTCs, 124 (24,3%) foram classificados como grau I (bem diferenciado), 309 (60,3%) grau II (moderadamente diferenciado) e 79 (15,4%) grau III (pouco diferenciado).

Dos sete estudos selecionados para a meta-análise, cinco avaliaram o marcador de proliferação Ki67 e dois o receptor de tirosina quinase KIT. Os dados extraídos dos sete trabalhos incluídos na fase da meta-análise estão descritos na tabela 2 (Ki67) e tabela 3 (KIT).

Tabela 1- Descrição da aplicação de terapias adjuvantes e neoadjuvantes ao procedimento cirúrgico nos artigos selecionados. São Paulo, 2017.

Autor	Ano	Alvo IHQ	N	Químio neoadjuvante	Quimioterapia	Qual?	Radioterapia
Abadie, J. J.	1999	Ki67	120	Não	Não	-	Não
Kiupel, M	2004	KIT	100	Não	Não	-	Não
Webster, J. D.	2008	Ki67	28	Não	Sim (todos)	Prednisona + Vimblastina	Sim (14 casos)
Taylor, F.	2010	Ki67	35	Não	Sim	Prednisolona (4) Vimblastina (1)	Sim (2 casos)
Vascellari, M.	2012	Ki67	51	s/n	Sim	-	s/n
Berlato, D.	2013	Ki67	95	Não	Não	Prednisolona	Não
Costa-Casagrande, T. A.	2010	KIT	81	s/n	s/n	-	Não

Fonte: (FREYTAG, 2017)

Legenda: s/n = não informado.

Tabela 2- Dados extraídos dos artigos sobre o Ki67 submetidos à meta-análise. São Paulo, 2017.

Autor	Abadie, J. J.	Webster, J. D.	Taylor, F.	Vascellari, M.	Berlato, D.
Ano	1999	2008	2010	2012	2013
Alvo IHQ	Ki67	Ki67	Ki67	Ki67	Ki67
N (animais)	120	28	35	51	95
N (tumores)	120	28	35	53	95
Intervalos de referência	<93 / ≥93 (núcleos positivos por 1000 células tumorais)	<23 / >23 (células positivas por área de 100 mm ²)	<1,8 / ≥1,8 (% células positivas)	<10,6 / >10,6 (% células positivas)	≤1 / >1 (% células positivas)
Clone	MIB-1	MIB-1	MIB-1	MIB-1	MIB-1
Marca	DAKO (M7240)	DAKO (M7240)	DAKO (M7240)	DAKO (M7240)	DAKO (M7240)
Diluição	1:50	1:50	1:150	1:50	1:150
Clonalidade	Monoclonal	Monoclonal	Monoclonal	Monoclonal	Monoclonal
IHQ (positivos)	<93 (33) / ≥93 (27)	<23 (14) / >23 (14)	<1,8% (30) / ≥1,8% (5)	<10,6% (40) / >10,6% (13)	≤1% (69) / >1% (26)
Valor de p	<0,001	0,0097	0,381	0,049	<0,001
Marcação	Nuclear	Nuclear	Nuclear	Nuclear	Nuclear
Sobrevida	TS	TS	TS	TS	TS

Fonte: (FREYTAG, 2017)

TS= Tempo de sobrevida.

Tabela 3- Dados extraídos dos artigos sobre o KIT submetidos à meta-análise. São Paulo, 2017.

Autor	Kiupel, M	Costa-Casagrande, T. A.
Ano	2004	2010
Alvo IHQ	KIT	KIT
n(animais)	100	81
n(tumores)	100	81
Intervalos de referência	Padrão KIT 1, KIT 2 e KIT 3	Padrão KIT 1, KIT 2 e KIT 3
Marca	DAKO (A4502)	DAKO (A4502)
Diluição	1:100	1:100
Clonalidade	Policlonal	Policlonal
IHQ (positivos)	98 (KIT 1 - 42, KIT 2 - 43, KIT 3 - 13)	81 (KIT 1 - 9, KIT 2 - 50, KIT 3 - 22)
Valor de p	KIT II (0,0056) KIT III (0,0004)	0,680
Marcação	Membranosa/citoplasmática	Membranosa/citoplasmática
Sobrevida	TS	ILD

Fonte: (FREYTAG, 2017)

TS= Tempo de sobrevida e ILD= Intervalo livre da doença.

5.2 KI67

Os cinco estudos reunidos compreenderam um total de 329 animais e 331 tumores (ABADIE; AMARDEILH; DELVERDIER, 1999; WEBSTER et al., 2008; TAYLOR et al., 2010; VASCELLARI et al., 2013; BERLATO et al., 2015). Em apenas em um dos estudos, a correlação com a sobrevida não foi significativa (TAYLOR et al., 2010). Este estudo também foi o único que avaliou uma coorte constituída apenas por MCTs grau II (Patnaik et al., 1984) e instituiu tratamento sistêmico em todos os animais após a ressecção cirúrgica (Tabela 2).

Após a seleção das publicações que apresentavam todas as condições de inclusão, e não tendo achado nenhum fator que os excluísse, procedeu-se a meta-análise propriamente dita. Estabelecendo-se os valores dos *Odds ratio* individuais para cada trabalho e, considerando o seu peso no modelo determinando pelo tamanho amostral, obteve-se os achados descritos na tabela 4, onde se observa que o trabalho com maior *Odds ratio* (12,3) não foi o que apresentou maior peso na equação (3,85), o que contribuiu para uma boa coesão dos dados.

Tabela 4- Valores de Odds ratio não ajustados e respectivos tamanhos amostrais. São Paulo, 2017.

Autores	<i>Odds Ratio</i>	IC 95% Inferior	IC95% Superior	n	Peso
Abadie, J. J. (1999)	12,30	3,30	45,50	110	2,26
Webster, J. D. (2008)	8,00	1,30	50,10	28	1,14
Taylor, F. (2010)	2,60	0,40	18,00	35	1,02
Berlato, D. (2013)	7,40	2,70	20,10	95	3,85
Vascellari, M. (2012)	7,70	1,50	39,10	53	1,46
Combinado	7,59	4,07	14,16		

Fonte: (FREYTAG, 2017)

O valor de Qui-Quadrado de Mantel-Henzel foi relevante (43,9), o que levou o modelo a apresentar uma significância importante, com $p < 0,0001$ para um valor de *Odds* de 7,60 (4,07 - 14,16) e um NNH=3. O modelo fala a favor da hipótese onde animais com valores elevados de Ki67 apresentam uma maior probabilidade de óbito, sendo inversamente associado aos animais com valores baixos de Ki67, que possuem maior probabilidade de sobrevivência (Figura 2).

Observa-se um intervalo de confiança bem satisfatório, considerando o baixo tamanho amostral dos trabalhos participantes do modelo, bem como uma boa performance do teste de Heterocedasticidade de Der Dimonian-Laird, com valor de Qui-Quadrado de 1,90 para um valor de $p=0,754$, que indica uma boa coesão dos valores de *Odds*, considerando os seus respectivos pesos na modelagem.

Figura 2- Resultado da meta-análise para Ki67, positividade/negatividade relacionado ao desfecho de sobrevida/óbito.

Fonte: (FREYTAG, 2017)

5.3 KIT

A expressão da proteína KIT foi avaliada em dois dos sete trabalhos incluídos e compreenderam 181 animais. A expressão da proteína KIT é avaliada de acordo com a sua localização: mastócitos normais apresentam sua expressão predominantemente na membrana celular, enquanto mastócitos neoplásicos também podem apresentar expressão perinuclear ou difusa em citoplasma (REGUERA et al., 2000). Os dois estudos avaliaram a localização da proteína seguindo o padrão descrito por Kiupel et al. (2004), sendo este, inclusive, um dos estudos avaliados nesta revisão, com o padrão KIT 1 - marcação associada à membrana com pouca ou nenhuma coloração citoplasmática; padrão KIT 2 - marcação citoplasmática focal peri-nuclear intensa e KIT 3 - marcação

citoplasmática difusa. No mesmo estudo, a correlação entre o padrão de KIT 2 e KIT 3 e a sobrevida foi sinificativa (KIUPEL et al., 2004) e no outro estudo não foi observada associação significativa entre o padrão de KIT e a sobrevida (COSTA CASAGRANDE et al., 2015). Dos 181 animais descritos, 179 tiveram marcação positiva e foram classificados, sendo no total, 51 animais como padrão KIT 1, 93 como padrão KIT 2 e 35 como padrão KIT 3 (Tabela 3). Devido a alta heterogeneidade dos grupos, não foi possível seguir o estudo deste marcador na meta-análise.

6 DISCUSSÃO

Em nosso conhecimento, este é o primeiro estudo que propõem avaliar o valor prognóstico de marcadores imunohistoquímicos em mastocitomas cutâneos caninos através da realização de revisão sistemática e meta-análise. O estudo foi desenhado com ampla busca booleana de palavras-chaves estratégicas em cinco bases de dados, nas quais foram identificados 124 estudos. Após a primeira avaliação de títulos e resumos, 46 estudos foram selecionados e submetidos a rigorosos critérios de inclusão e exclusão, os quais foram baseados nas diretrizes do REMARK (“*RE*porting *re*commendations for *tumour MARKer* prognostic studies studies”) (MCSHANE et al., 2005).

Inicialmente, a maior deficiência observada na revisão sistemática foi referente à ausência de dados importantes nos trabalhos publicados, principalmente relacionados às recomendações de análise estatística e apresentação dos resultados. Os critérios estabelecidos pelo REMARK recomendam que os artigos apresentem a relação entre o marcador imunohistoquímico e a sobrevida dos animais, incluindo seu respectivo *Hazard ratio*, intervalo de confiança e valor de p. Como medida alternativa, sugerimos que ao menos os trabalhos forneçam os dados estatísticos necessários para o cálculo manual do *Odds Ratio*, que incluem o número de animais que morreram pelo MCT e o número de animais que estavam vivos em cada grupo de marcação ao final do estudo. Após a leitura e análise completa dos 46 artigos selecionados na primeira etapa, observou-se que 50% (23/46) dos estudos não correlacionaram o marcador imunohistoquímico com a sobrevida dos animais, por vezes fazendo essa correlação com outros fatores, como alterações morfológicas (PASSANTINO et al., 2008), recorrência local (SÉGUIN et al., 2006), presença de mutações no gene c-Kit

(WEBSTER et al., 2006) e graduação histológica (GIL DA COSTA et al., 2007; REBUZZI et al., 2007; PATRUNO et al., 2009; KANDEFER-GOLA et al., 2015). Assim, estes artigos foram excluídos da meta-análise por não atenderem os critérios mínimos de inclusão.

Outro fator importante evidenciado nesta revisão sistemática foi que, na literatura veterinária analisada, o valor de *Hazard ratio* não é calculado pelos autores ou fornecido nos estudos com a frequência equivalente à sua importância. Apenas 10,9% (5/46) de todos os estudos inteiramente revisados apresentavam o valor de *Hazard ratio* descrito no artigo (KIUPEL et al., 2004; SCASE et al., 2006; WEBSTER et al., 2007; MAGLENNON et al., 2008; BERLATO et al., 2015). Adicionalmente, 13% (6/46) dos trabalhos foram excluídos por serem os únicos trabalhos que avaliaram um determinado alvo como marcador imunohistoquímico (PREZIOSI; SARLI; PALTRINIERI, 2004; BERLATO et al., 2012; MACKOWIAK et al., 2012; STREFEZZI et al., 2012; VARGAS et al., 2015). Ainda que cinco destes artigos tenham correlacionado os resultados com a sobrevivência, a inexistência de outros trabalhos com o mesmo marcador impede que os mesmos sejam incluídos em uma meta-análise. Por fim, 1/46 (2,1%) dos trabalhos foi excluído por abordar mastocitomas subcutâneos (NEWMAN et al., 2007). É importante mencionar um viés do trabalho em relação à classificação dos MCT em cutâneo e subcutâneo. Newman et al. (2007) relataram a importância em separar o MCT cutâneo da variação subcutânea, uma vez que este último apresenta um melhor prognóstico. Por sua vez, Thompson et al. (2011) propuseram um novo modelo de classificação para o MCT subcutâneo canino. Desta forma, é importante salientar que, provavelmente, artigos anteriores a esta data não realizaram essa diferenciação entre os subtipos histológicos do MCT, representando um possível viés neste estudo. No total, 65,2% (30/46) dos artigos selecionados previamente foram excluídos deste estudo e os critérios de exclusão de cada artigo estão descritos no Apêndice A.

Neste contexto, 34,8% (16/46) dos artigos revisados integralmente foram selecionados para a revisão sistemática e extração dos dados de interesse, os quais avaliaram o total de quatro marcadores imunohistoquímicos: PCNA, Ki67, KIT e p53 (SIMOES; SCHONING; BUTINE, 1994; ABADIE; AMARDEILH; DELVERDIER, 1999; GINN et al., 2000; JAFFE et al., 2000; KIUPEL et al., 2004; PREZIOSI; MORINI; SARLI, 2004; SCASE et al., 2006; OZAKI et al., 2007; WEBSTER et al., 2008; TAYLOR et al., 2010; GIANTIN et al., 2012a; BERLATO et al., 2015; COSTA CASAGRANDE et al., 2015; VAN LELYVELD et al., 2015). Porém, apenas 18,7%

(3/16) destes estudos apresentaram o *Hazard ratio* e os intervalos de confiança (SCASE et al., 2006; MAGLENNON et al., 2008; BERLATO et al., 2015). Mediante as limitações encontradas pelo baixo número de trabalhos fornecendo o valor de *Hazard ratio*, optou-se por usar o valor de *Odds ratio* para a realização desta meta-análise. Os dados para o cálculo do *Odds ratio* foram extraídos dos estudos ou solicitados aos autores correspondentes, via e-mail, quando o artigo não os fornecia.

Ao final, apenas 43,8% (7/16) dos artigos apresentaram as informações suficientes, ou responderam ao nosso pedido com os dados adicionais, para serem submetidos à meta-análise. Destes trabalhos, 71,4% (5/7) avaliaram o marcador de proliferação celular Ki67 (ABADIE; AMARDEILH; DELVERDIER, 1999; WEBSTER et al., 2008; TAYLOR et al., 2010; VASCELLARI et al., 2013; BERLATO et al., 2015) e 28,6% (2/7) avaliaram o receptor de tirosina quinase KIT (KIUPEL et al., 2004; COSTA CASAGRANDE et al., 2015). Outros dois trabalhos que avaliaram o marcador de proliferação celular Ki67 forneceram os valores de *Hazard ratio* (SCASE et al., 2006; MAGLENNON et al., 2008), porém, de acordo com nossa decisão, não entraram na meta-análise por não fornecerem os dados necessários para o cálculo do *Odds ratio*. Este fato representa um importante viés neste trabalho, principalmente porque estes dois estudos demonstraram alta significância deste marcador com a sobrevida dos animais ($p < 0,001$ e $p < 0,0001$). Considerando todos os fatores de exclusão e inclusão mencionados, além dos possíveis vieses, este trabalho será focado na meta-análise de artigos que englobam os marcadores imunohistoquímicos Ki67 e KIT.

Os cinco trabalhos que avaliaram o marcador de proliferação Ki67 utilizaram o mesmo anticorpo (DAKO M7240, clone MIB-1), em duas concentrações diferentes (1:50 e 1:150). Um ponto importante foi que todos os trabalhos utilizaram diferentes métodos de avaliação e/ou pontos de corte para a avaliação das células neoplásicas em proliferação, representando um potencial viés entre os resultados. Abadie et al. (1999) e Vascellari et al. (2013) realizaram a avaliação da proliferação celular pela porcentagem de células positivas em campos aleatórios do tumor, utilizando a mesma concentração de anticorpo (1:50). Ambos propuseram pontos de corte próximos, entre 9,3% (ABADIE; AMARDEILH; DELVERDIER, 1999) e 10,6% (VASCELLARI et al., 2013). Interessantemente, esses dois trabalhos foram publicados com 14 anos de diferença entre si. Berlato et al. (2015) e Taylor et al. (2010) apresentaram protocolos de avaliação similares entre si, utilizando um sistema digital de captura de imagens e avaliando a porcentagem de células positivas, porém apenas em regiões tumorais

distantes das margens, localizadas a pelo menos um terço da distância entre a margem profunda e a lateral. Ambos os autores utilizaram a mesma concentração de anticorpo (1:150) e adotaram pontos de corte próximos entre si, entre 1,8% (TAYLOR et al., 2010) e 1,0% (BERLATO et al., 2015), porém inferiores aos descritos anteriormente (ABADIE; AMARDEILH; DELVERDIER, 1999; VASCELLARI et al., 2013). Por fim, Webster et al. (2008) avaliaram a quantidade de células positivas por áreas histológicas determinadas (100mm²), em regiões nas quais as marcações se apresentavam mais intensas (*hotspots*). Neste, os autores adotaram como ponto de corte a média de 23 células positivas por área histológica e a concentração do anticorpo adotada foi de 1:50.

Apesar das discrepâncias nos métodos de avaliação das células positivas para o marcador de proliferação celular Ki67 e o baixo número de animais, a análise estatística demonstrou baixa heterogeneidade entre os estudos e permitiu a realização da meta-análise. Assim, demonstrou-se que o marcador Ki67 pode ser considerado como um forte fator prognóstico em MCT caninos (Figura 2). Este dado reforça os estudos já publicados sobre o valor prognóstico do Ki67 em tumores caninos, não apenas no MCT, mas também em diversos outros tumores, como melanomas orais (BERGIN et al., 2011), tumores mamários (SANTOS et al., 2013) e tumores gastrointestinais (GILLESPIE et al., 2011). No entanto, apesar do anticorpo para detecção do Ki67 (clone, marca) ser o mesmo entre os trabalhos, as observações deste estudo ainda ressaltaram a necessidade da padronização nos métodos de avaliação e do ponto de corte (*cut-off*) deste índice de proliferação no MCT canino, uma vez que os valores adotados foram distintos entre os grupos.

Em relação ao receptor de tirosina quinase KIT, normalmente utilizado na avaliação do prognóstico dos MTCs caninos, não foi possível avaliar este marcador pela meta-análise proposta devido ao baixo número de trabalhos que apresentaram os dados necessários para o cálculo do *Odds ratio* e a elevada heterogeneidade entre estes grupos. Diferentemente do marcador Ki-67, os animais envolvidos nos dois estudos selecionados sobre o KIT (KIUPEL et al., 2004; COSTA CASAGRANDE et al., 2015) foram avaliados segundo os padrões propostos por Kiupel et al. (2004), sendo eles: KIT 1 - marcação associada à membrana com pouca ou nenhuma coloração citoplasmática; KIT 2 - marcação citoplasmática focal peri-nuclear intensa; e KIT3 - marcação citoplasmática difusa. Da mesma forma, foi utilizado o mesmo anticorpo (marca) e concentração nos trabalhos.

Diversos trabalhos já relataram a relação entre a localização aberrante da proteína KIT e a presença de mutações no gene c-Kit com o pior prognóstico do MCT canino (KIUPEL et al., 2004; WEBSTER et al., 2006; TAKEUCHI et al., 2013). Este é um marcador relacionado a terapias emergentes, uma vez que dois inibidores de tirosina quinase, Toceranic e Masitinib, já foram aprovados para uso na medicina veterinária e podem trazer benefícios no tratamento do MCT, especialmente em casos de identificação de mutação do gene c-Kit (LONDON, 2009) ou tumores classificados como padrões KIT 2 ou 3 ao exame imunohistoquímico (SLEDGE; WEBSTER; KIUPEL, 2016). Ainda que não tenha sido possível a avaliação da proteína KIT como um fator prognóstico para o MTC nesta meta-análise, este é um marcador já amplamente utilizado em painéis imunohistoquímicos, principalmente para a indicação da terapia alvo com os inibidores de tirosina quinase. Assim, a realização de novos estudos que sigam os critérios de qualidade, ou mesmo a complementação de dados aos estudos já publicados, se faz necessária para que seja possível a validação deste marcador através da meta-análise.

Assim, chegamos a principal questão elucidada por este estudo, a falta de critério e padrões de qualidade na maioria dos estudos publicados nesta área do conhecimento em medicina veterinária. Este resultado ressalta a necessidade de padronização destes critérios para a publicação de estudos que investigam o valor prognóstico de marcadores imunohistoquímicos, não apenas nos MCTs, mas nos estudos em oncologia veterinária de maneira geral. Uma grande discrepância observada entre os trabalhos foi em relação ao desenho do estudo, seleção da coorte, diferenças metodológicas gerais, apresentação dos dados clínicos, descrição do *follow-up* e métodos de análise estatística. Através desta padronização, a avaliação do valor prognóstico dos marcadores moleculares seria muito mais ampla e fidedigna. No atual contexto, há muitas informações que se perdem pela falta de padronização e baixa qualidade dos estudos, dificultando a validação dos marcadores prognósticos pela meta-análise. As diretrizes descritas no REMARK (MCSHANE et al., 2005) são uma ferramenta validada para direcionar a realização de estudos com marcadores tumorais como fatores prognósticos, podendo ser adotada nos estudos veterinários. Assim como os critérios de qualidade, demonstrados pela aplicação da escala NOS, poderiam ser adaptados e empregados rotineiramente em estudos clínicos veterinários.

Em conclusão, nesta revisão sistemática e meta-análise foi possível validar o marcador de proliferação celular Ki67 como um forte fator prognóstico em MCTs

caninos, destacando sua importante aplicação na prática clínica e diagnóstica deste tumor. Os dados insuficientes e a baixa qualidade dos artigos publicados impossibilitaram a avaliação de outros marcadores imunohistoquímicos, incluindo o receptor de tirosina quinase KIT, frequentemente empregado como fator prognóstico no MCT canino. Finalmente, este trabalho permite uma análise crítica da qualidade dos trabalhos publicados nesta área do conhecimento, incentivando, por sua vez, a realização de trabalhos cada vez mais controlados e com a inclusão de informações clínicas, de seguimento e dados estatísticos relevantes ao trabalho.

CAPÍTULO 2

Imunoexpressão do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) no mastocitoma cutâneo canino

RESUMO

A angiogênese é um processo fundamental para o crescimento e disseminação de tumores sólidos devido ao maior aporte de nutrientes e oxigênio, além de permitir a migração de células metastáticas. O fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) se destaca como a principal chave da neovascularização e sua participação já foi descrita em uma variedade de tumores em humanos e cães. O mastocitoma (MCT) é a neoplasia cutânea mais frequente em cães e apresenta altas taxas recidivas locais e, eventualmente, metástases em linfonodos ou à distância. A imunoexpressão do VEGF tem sido proposta como fator prognóstico nos MCTs caninos, porém os resultados ainda são controversos. No presente estudo, MCTs cutâneos de 43 cães foram submetidos à gradação histológica e avaliação imunohistoquímica para KIT, Ki67 e VEGF. O KIT não apresentou correlação significativa com a taxa de mortalidade, porém o padrão KIT 3 foi significativamente associado à menor sobrevida quando comparado ao KIT 1 ($p=0,011$). O marcador de proliferação celular Ki67 mostrou associação significativa com a taxa de mortalidade ($p=0,005$) e sobrevida ($p=0,002$). Por outro lado, a expressão do VEGF não foi significativa em relação a taxa de mortalidade ou sobrevida. Em conclusão, este estudo reforçou a importância dos marcadores Ki67 e KIT na avaliação prognóstica dos MCTs caninos, porém não demonstrou a participação do VEGF. Assim, este marcador não pode ser considerado um fator prognóstico adequado nesta casuística de MCTs caninos, indicando a baixa participação da neovascularização nesta neoplasia.

Palavras-chave: mastocitoma, cães, angiogênese, fator prognóstico, VEGF

7 INTRODUÇÃO

A neoangiogênese ou neovascularização é o processo de formação de novos vasos a partir do endotélio de vasos existentes (FOLKMAN; SHING, 1992), apresentando importante papel em condições fisiológicas e patológicas (FERRARA; DAVIS-SMYTH, 1997; WOLFESBERGER et al., 2008). A neoangiogênese é um dos “hallmarks” da biologia tumoral (FOLKMAN, 1990; HANAHAN; WEINBERG, 2011) e é essencial para crescimento de tumores sólidos e disseminação de suas metástases (FOLKMAN, 1990; ELPEK et al., 2001; IAMAROON et al., 2003; ROSEN, 2005; KONDO et al., 2006). Este processo é regulado pelo balanço entre fatores pró e anti-angiogênicos secretados por células tumorais e células presentes no microambiente, como células endoteliais, pericitos e células inflamatórias (ROSEN, 2005). Dentre os fatores pró-angiogênicos, o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) se destaca como a principal chave da neovascularização (FOLKMAN, 1990; DVORAK et al., 1995; SIEMEISTER; MARTINY-BARON; MARMÉ, 1998; ROSEN, 2002).

A família do VEGF é composta por diversos membros, os quais tem especificidade relativamente estreita e exercem suas atividades, principalmente, em células endoteliais relacionadas à hemangiogênese (VEGF-A e VEGF-B) e a linfangiogênese (VEGF-C) (FERRARA; DAVIS-SMYTH, 1997; HANAHAN, 1997; KORPELAINEN; ALITALO, 1998; NEUFELD et al., 1999; CARMELIET; JAIN, 2000). Sabe-se que as células neoplásicas podem expressar VEGF, bem como seus receptores e, desta forma, usá-lo como fator de crescimento autócrino (GILES, 2001; GERBER; FERRARA, 2003; SHINKARUK et al., 2003). Estudos vêm demonstrando a participação do VEGF no desenvolvimento de uma grande variedade de tumores sólidos em humanos (HYODO et al., 1998; HEFLER et al., 1999; ELPEK et al., 2001; IAMAROON et al., 2003; KONDO et al., 2006), além de estar diretamente relacionada com o desenvolvimento de metástases distantes (MAEDA et al., 1996; GUANG-WU et al., 2000; SHENG et al., 2000; ROSEN, 2005; AISHIMA et al., 2008; BEŞTAŞ; KAPLAN; IŞIKDOĞAN, 2014; CHANG; XU; SUN, 2014; XIA et al., 2016). Sua expressão também vem sendo estudada em diferentes tumores em cães, incluindo mastocitomas (MCTs) (RESTUCCI et al., 2002; RESTUCCI et al., 2004; GENTILINI et al., 2005; QIU et al., 2008; WOLFESBERGER et al., 2008).

O MCT cutâneo é uma das neoplasias mais frequentes em cães, compreendendo de 16 a 21% de todas as neoplasias cutâneas nesta espécie (BRODEY, 1970; FINNIE; BOSTOCK, 1979; BOSTOCK, 1986; ROTHWELL et al., 1987; LONDON; SEGUIN, 2003) e com prevalência de 0,27% na população canina (SHOOP et al., 2015). Atualmente, o padrão ouro para avaliação prognóstica do MCT é a graduação histológica, juntamente com a avaliação do índice de proliferação celular pelo Ki67 e do receptor de tirosina quinase KIT (MURPHY et al., 2004; SCHULTHEISS et al., 2011; TAKEUCHI et al., 2013; SLEDGE; WEBSTER; KIUPEL, 2016). No entanto, a busca por novos marcadores moleculares ainda se faz necessária devido a diversidade no comportamento biológico deste tumor, além de sinalizar potenciais alvos terapêuticos (RESTUCCI et al., 2002; RESTUCCI et al., 2004; WERGIN; KASER-HOTZ, 2004). O MCT pode apresentar comportamento menos agressivo e persistir por longos períodos sem progredir, contudo, sua variante agressiva pode apresentar crescimento acelerado e promover disseminação tumoral (MISDORP, 2004). Stefanello et al. (2015) demonstraram que 18,7% (72/386) dos MCTs estudados apresentaram metástases, sendo 18,1% (70/386) para linfonodos regionais e 4,1% (16/386) para órgãos distantes. Assim, a busca por marcadores preditivos da disseminação tumoral poderia proporcionar uma abordagem terapêutica mais agressiva nestes pacientes.

Em cães, a expressão do VEGF tem sido estudada através de reações imunohistoquímica, ensaio imunoenzimático (ELISA) e expressão gênica, mostrando-se expresso no citoplasma dos mastócitos neoplásicos (REBUZZI et al., 2007; PATRUNO et al., 2009; AMORIM et al., 2010; MEDERLE et al., 2010; GIANTIN et al., 2012b). Rebuzzi et al. (2007) avaliaram a expressão do VEGF e seus receptores (Flt1 e KDR) em MCTs caninos e na linhagem de mastócitos neoplásicos C2. Ambos expressaram VEGF e seus receptores, porém este estudo concluiu que os mastócitos não utilizam o VEGF como regulador de crescimento autócrino. Outro estudo comparou a expressão do VEGF em MCTs com a graduação histológica em 53 cães e não encontrou correlação entre estes marcadores (AMORIM et al., 2010). Giantin et al. (2012) avaliaram a expressão do VEGF em MTCs caninos e demonstraram correlação significativa com a maior graduação histológica dos tumores. No entanto, a relação do VEGF com o prognóstico e comportamento biológico do MCT ainda não foi esclarecido.

Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar a imunoexpressão do KIT, Ki67 e VEGF em 43 amostras de MCTs cutâneos caninos, correlacionando-a com a sobrevida destes animais.

8 MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo foi desenvolvido no Laboratório de Patologia Morfologia e Molecular (LAPMOL), nas dependências do Departamento de Patologia (VPT) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP).

8.1 ANIMAIS

Foram utilizadas amostras de MCTs cutâneo provenientes de 43 cães, as quais foram enviadas para diagnósticos histopatológico no laboratório particular VetCâncer, São Paulo, Brasil, entre 2013 e 2016. Os fragmentos de tecido foram colhidos em até 30 minutos após excisão cirúrgica e imediatamente fixados em formol a 10% durante 24 a 48 horas. O *follow-up* e histórico clínico de cada animal foi obtido através de um formulário preenchido pelo veterinário requisitante e complementado por conversas telefônicas. Os registros médicos foram analisados individualmente e os dados extraídos incluíram gênero, raça, idade ao momento do diagnóstico, instituição de terapia sistêmica adjuvante e qual fármaco utilizado em caso positivo, tempo de sobrevivência e causa da morte, quando aplicável. O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FMVZ-USP, sob protocolo de pesquisa nº 2439290115.

8.2 GRADUAÇÃO HISTOLÓGICA

Os fragmentos do tecido tumoral fixados em solução de formol 10% foram processados histologicamente e incluídos em parafina. Cortes de 5µm de cada amostra foram processados e corados pelas técnicas de Hematoxilina e Eosina (HE) e Azul de Toluidina para a avaliação histológica. Todos os tumores foram graduados de acordo com a classificação de Patnaik et al. (1984) e Kiupel et al. (2011).

8.3 IMUNOHISTOQUÍMICA

Todos os tumores foram submetidos à reação imunohistoquímica para o receptor de tirosina quinase KIT, marcador de proliferação celular Ki67 e o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF). Os cortes histológicos preparados em lâminas silanizadas foram desparafinizados e rehidratados, sendo em seguida submetidos ao procedimento de recuperação antigênica em solução de tampão citrato (10 mM, pH 6.0) por 5 minutos em panela de pressão. Após, as lâminas foram lavadas e submetidas ao bloqueio da peroxidase endógena em solução aquosa de peróxido de hidrogênio 6%, por 30 minutos e protegido da luz. Após lavagens em PBS 1x com Tween20[®] (pH 7,4), os cortes foram incubados em câmara úmida, com o anticorpo monoclonal anti-Ki67 (1:100, Clone MIB-1, Dako A7240, EUA), anticorpo policlonal anti-CD117/KIT (1:800, Dako A4502, EUA) e anticorpo policlonal anti-VEGF (1:200, Santa Cruz A-20, EUA) por 18h à 4°C. Posteriormente, as lâminas foram lavadas em PBS e incubadas com o polímero SuperPicture Poly HRP conjugate (Life Technologies, EUA) durante 30 minutos em estufa à 37°C. Após lavagens, as lâminas foram reveladas em solução de diaminobenzidina (Sigma, EUA) e contracoradas com Hematoxilina de Harris. Foram realizados controles negativos de todas as reações pela omissão do anticorpo primário.

8.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados contínuos, semicontínuos e semicategóricos foram inicialmente comparados com a Curva Normal pelo teste de Distância K-S e de Shapiro e classificados quanto à normalidade pela aderência a Curva de Gauss. Os dados não paramétricos foram representados por mediana de quartis inferior e superior e comparados entre si através do teste de Mann-Whitney para duas amostras. Os dados contínuos, semicontínuos e semicategóricos foram categorizados através da curva ROC, estabelecendo quando havia assimetria significativa para os dados a soma da especificidade e sensibilidade, para obter o ponto de corte para a categorização dos dados (não se utilizou o produto para não hiper-estimar a sensibilidade). Para a análise de sobrevida, utilizou-se a Curva de Kaplan-Meier com teste de Log-Rank para

determinação das variáveis de influência no desfecho. Os dados categóricos foram representados por frequência absoluta (n) e relativa (%) e analisados pelo teste de Qui-quadrado de Pearson. Foi considerado para todo o estudo risco alfa menor ou igual a 5% de cometer erro tipo I ou de 1ª espécie e risco Beta menor ou igual a 20% de cometer erro tipo II ou de 2ª espécie.

9 RESULTADOS

As raças representadas neste estudo foram cães sem raça definida (n = 12), *pit bull* (n = 5), *golden retriever* (n = 4), *pug* (n = 3), *boxer* (n = 2), *labrador retriever* (n = 2) e um de cada umas das seguintes raças: *bulldogue inglês*, *shi tzu*, *pastor de shetland*, *dachshund*, *york shire*, *fox paulistinha*, *chow-chow*, *tekel*, *bulldogue francês*. Um caso não apresentou esta informação (Tabela 5). A mediana de idade foi de 8 (6-10) anos e 27 (62,8%) animais eram fêmeas. Foi possível observar uma associação significativa do aumento da taxa de mortalidade com o gênero masculino (p=0,042) (Tabelas 6 e 7).

Quarenta e dois animais foram submetidos ao procedimento cirúrgico para ressecção do tumor e apenas um caso realizou biopsia incisional, o qual veio a óbito após 19 dias devido progressão tumoral. A quimioterapia sistêmica foi instituída em 18 (41,9%) pacientes, sendo realizada com vimblastina (2mg/m²) e prednisona (2mg/kg) em todos os casos. Dois casos também receberam a terapia alvo com masitinib. Em 30 (69,8%) pacientes foi realizada a técnica de eletroquimioterapia na margem cirúrgica comprometida por infiltração microscópica, avaliada pela biopsia transcirúrgica por congelação. Vinte e sete (62,8%) animais estavam vivos ao fim do estudo, 13 (30,2%) vieram a óbito ou foram eutanasiados em decorrência da progressão da doença e 3 (7%) morreram por outras causas. Os animais foram acompanhados por uma mediana de 578 (174-745) dias. A mediana do tempo de sobrevida foi de 578 (174-730) dias (Tabela 5).

De acordo com a graduação histológica de Patnaik et al. (1984), cinco (11,6%) tumores foram classificados como grau I, 31 (72,1%) como grau II e sete (16,5%) como grau III. Já pela classificação proposta por Kiupel et al. (2011), nove (20,9%) tumores eram de alto grau e 34 (79%) de baixo grau (Tabela 6). Observou-se que todos os tumores de grau I por Patnaik eram de baixo grau por Kiupel, bem como todos do grau

III de Patnaik eram classificados com alto grau por Kiupel. No total, 27 (62,8%) de todos os tumores incluídos neste estudo foram classificados com grau II de Patnaik e baixo grau de Kiupel (Tabela 5). Ambos os métodos de classificação histológica de Patnaik et al. (1984) e Kiupel et al. (2011) apresentaram importante associação com a taxa de mortalidade dos animais ($p < 0,0001$) (Tabela 6). Os dados de sobrevida estão representados pelos gráficos de Kaplan Meier (Figura 3).

Figura 3— Curva de sobrevida (Kaplan-Meier) dos pacientes estudados em função da graduação histológica (Patnaik et al. e Kiupel et al.)

Fonte: (FREYTAG, 2017)

Tabela 5- Dados clínicos, histopatológicos, imunohistoquímicos e sobrevida de cada paciente. São Paulo, 2017.

(Continua)

GRAU HISTOLÓGICO							IMUNOHISTOQUÍMICA								
ID	Raça	Sexo	Idade	Localização	Patnaik	Kiupel	IM	KIT	Ki67 %	VEGF	QUIMIOTERAPIA	Fármaco	EQT ABORDA GEM	Óbito Causa	SOBREVIDA (dias)
A01	Buldogue Inglês	F	10	MP	II	Baixo	s/n	2	<1	1	Não		Trans	Vivo	760
A02	SRD	F	14	Abdômen	II	Baixo	Raras	2	2,16	0	Sim	V + P	Trans	MCT	215
A03	Golden Retriever	F	8	MP	II	Baixo	Raras	1	<1	1	Não		Trans	Vivo	745
A04	SRD	M	15	s/n	II	Alto	s/n	1	3,3	1	Não		Trans	Outros	464
A05	Pug	F	3	Abdômen	II	Baixo	Raras	1	3,35	1	Não		Trans	Vivo	708
A06	Pastor de Shetland	F	10	Tórax	II	Baixo	2	2	2,5	0	Sim	V + P	Trans	Vivo	679
A07	Shi tzu	M	3	Prepúcio	II	Baixo	4	2	<1	1	Sim	V + P	Trans	Vivo	674
A08	Golden Retriever	M	5	MT	II	Baixo	Raras	3	4,92	1	Sim	V + P	Não	MCT	19
A09	York Shire	M	13	s/n	II	Baixo	s/n	2	1,9	0	Sim	V + P	Trans	Vivo	668
A10	Dachshund	M	15	Inguinal	II	Alto	7	3	2,9	2	Sim	V + P	Trans	MCT	149
A11	Golden Retriever	F	8	MT	II	Baixo	3	1	<1	1	Não		Trans	Vivo	610
A12	Golden Retriever	M	7	MP	I	Baixo	0	2	<1	1	Não		Trans	Vivo	593
A13	Fox Paulistinha	F	8	s/n	II	Baixo	s/n	1	1,2	0	Sim	V + P	Trans	Vivo	591
A14	Lhasa Apso	M	9	Inguinal	II	Baixo	0	3	2,5	1	Sim	V + P + ITQ	Trans	MCT	84
A15	SRD	F	9	s/n	II	Baixo	s/n	3	<1	2	Não		Trans	Vivo	435
A16	SRD	M	12	Focinho	III	Alto	15	2	9,27	0	Não		Trans	MCT	174
A17	Pitbull	F	7	s/n	II	Baixo	s/n	3	2,4	2	Não		Trans	Outros	28
A18	SRD	M	12	s/n	II	Baixo	s/n	3	3,1	1	Sim	V + P	Trans	Vivo	367
A19	boxer	F	6	s/n	II	Baixo	s/n	2	2,8	1	Não		Trans	Vivo	338
A20	SRD	F	10	s/n	II	Baixo	s/n	2	2,4	3	Não		Trans	Vivo	327
A21	Labrador	F	7	Axila	I	Baixo	0	2	2,95	2	Não		Trans	Vivo	1194

(Conclusão)

GRAU HISTOLÓGICO																IMUNOHISTOQUÍMICA															
ID	Raça	Sexo	Idade	Localização	Patnaik	Kiupel	IM	KIT	Ki67 %	VEGF	QUIMIOTERAPIA	Fármaco	EQT ABORDA GEM	Óbito Causa	SOBREVIDA (dias)																
A22	Lhasa Apso	M		9 Prepúcio	I	Baixo		0	2	0,6	2 Não		Não	Vivo	660																
A23	Pug	F		8 MP	I	Baixo		0	2	0,3	1 Sim	V + P	Não	Vivo	985																
A24	Pug	F		4 Abdômen	I	Baixo		0	1	0,4	3 Não		Não	Vivo	670																
A25	Pit Bull	F		6 Abdômen	II	Baixo		0	1	2,2	1 Sim	V + P	Trans	Outros	1169																
A26	Chow-Chow	F		5 Inguinal	II	Baixo	Raras		1	1,53	3 Não		Trans	Vivo	1174																
A27	Pit Bull	F		8 MP	II	Baixo		3	2 NM		2 Sim	V + P	Não	Vivo	1072																
A28	Boxer	F		8 Flanco	II	Baixo		0	1	2,14	2 Não		Não	Outros	578																
A29	Pit Bull	F		13 Cervical	II	Baixo	Raras		1	2,05	2 s/n		Não	Vivo	578																
A30	SRD	M	s/n	Cauda	II	Baixo	Raras		1	0,6	2 s/n		Não	Vivo	548																
A31	Pit Bull	M	s/n	BE	II	Baixo		0	3 NM		1 s/n		Não	Vivo	1004																
A32	Pit Bull	F	s/n	MP	II	Baixo		0	2	4,07	1 Não		Trans	Vivo	706																
A33	Boxer	M	s/n	Dígito	II	Baixo		4	3	0,4	1 s/n		Não	Vivo	1074																
A34	Labrador	M	s/n	s/n	II	Baixo	s/n		1	2,33	3 Não		Não	Vivo	548																
A35	s/n	F	s/n	Axila	II	Baixo		4	3	5,45	1 Não		Trans	Vivo	790																
A36	Tekel	M		15 MP	II	Baixo	Raras		2	5,89	2 Sim	V + P	Trans	MCT	31																
A37	SRD	F		8 MP	II	Baixo		0	3	0,75	2 Sim	V + P	Trans	Vivo	953																
A38	SRD	F	s/n	Abdômen	III	Alto		9	3	1,43	1 s/n		Não	MCT	119																
A39	SRD	F	s/n	Tórax	III	Alto		30	2	1,7	1 Não		Não	MCT	123																
A40	Boxer	F		2 MP	III	Alto		8	2	2,45	0 Sim	V + P	Trans	MCT	61																
A41	SRD	M		10 MP	III	Alto	Raras		3	4,82	1 Sim	V + P	Trans	MCT	58																
A42	SRD	F		6 MP	III	Alto		22	3	10,3	1 Sim	V + P + ITQ	Trans	MCT	93																
A43	Buldogue F.	F		3 Flanco	III	Alto	s/n		3	2,01	1 Sim	V + P	Trans	MCT	284																

Fonte: (FREYTAG, 2017) ID = identificação; s/n = não informado; IM = índice mitótico; MP = membro pélvico; MT = membro torácico; BE = bolsa escrotal; QUIMIO = quimioterapia; V+P = vimblastina + prednisona; V+P+ITQ = vimblastina + prednisona + inibidor de tirosina quinase; EQT = eletroquimioterapia; Trans = trans-operatória; MCT = mastocitoma.

Tabela 6- Correlação da taxa de mortalidade e análise de óbito associadas ao MCT com as variáveis gênero, grau histológico, VEGF e KIT pelo teste Qui-quadrado de Pearson. São Paulo, 2017.

		Óbito				Qui-quadrado de Pearson
		Não		sim		
		n	%	n	%	
Gênero	F	20	66,7%	7	53,8%	0,042
	M	10	33,3%	6	46,2%	
Patnaik	I	5	16,7%	0	0,0%	<0,0001
	II	25	83,3%	6	46,2%	
	III	0	0,0%	7	53,8%	
Kiupel	Alto	1	3,3%	8	61,5%	<0,0001
	Baixo	29	96,7%	5	38,5%	
Quimioterapia	n/s	4	13,3%	1	7,7%	0,055
	Não	17	56,7%	3	23,1%	
	Sim	9	30,0%	9	69,2%	
VEGF	0	3	10,0%	3	23,1%	0,405
	1	15	50,0%	7	53,8%	
	2	8	26,7%	3	23,1%	
	3	4	13,3%	0	0,0%	
KIT	1	11	36,7%	1	7,7%	0,070
	2	12	40,0%	5	38,5%	
	3	7	23,3%	7	53,8%	

Fonte: (FREYTAG, 2017)

Notas: n/s = não informado.

Tabela 7- Correlação da taxa de mortalidade e análise de óbito associadas ao MCT com as variáveis idade e Ki67 pelo teste Mann-Whitney. São Paulo, 2017.

	Óbito						Mann-Whitney
	Não			sim			
	Mediana	Percentil 25	Percentil 75	Mediana	Percentil 25	Percentil 75	
Idade	8	7	10	9	5	14	0,604
Ki67	1,4	0,8	2,5	2,5	2,1	4,9	0,005

Fonte: (FREYTAG, 2017)

A proteína KIT teve marcação positiva em todas as amostras e foi avaliada de acordo com a localização prevalente da marcação nos mastócitos, como descrito anteriormente (KIUPEL et al., 2004). De acordo com esta classificação, 12 (27,9%) tumores apresentaram padrão de marcação KIT 1, 17 (39,5%) tumores com padrão KIT 2 e 14 (32,6%) tumores com padrão KIT 3. A avaliação global desta proteína não apresentou relação significativa com a taxa de mortalidade ($p=0,07$) (Tabela 6), porém, através do método de comparação de *pairwise* (com *Log Rank (Mantel-Cox)*), observou-se diferença significativa da sobrevida entre os animais com tumores padrão KIT 3 e 1. Os animais com MTCs padrão KIT 1 apresentaram expectativa de vida de $713,1 \pm 15,9$ dias, com uma taxa de sobrevida de 91,7%. Já os animais com MCTs padrão KIT 3 tiveram uma expectativa de vida de $401,2 \pm 86,2$ dias, com uma taxa de sobrevida de 50%, havendo diferença significativa entre eles ($p=0,011$). Assim, os padrões imunohistoquímicos de KIT demonstraram valor prognóstico para o MCT canino (Figura 4).

Figura 4 – Curva de sobrevida (Kaplan-Meier) dos pacientes estudados em função da expressão da proteína KIT

Fonte: (FREYTAG, 2017)

Em relação ao marcador de proliferação celular Ki67, o ponto de corte foi determinado em 1,3% através da análise da curva ROC (sensibilidade = 1,000; especificidade = 0,500). Sendo assim, quinze (34,9%) tumores apresentaram baixo índice de proliferação celular (<1,3%) e 28 (65,1%) com alto índice ($\geq$ 1,3%) (Tabela 5). Este marcador demonstrou relação significativa com a taxa de mortalidade ($p=0,005$) (Tabela 7). Os animais com MTCs com baixo índice de proliferação apresentaram expectativa de vida de $710,3 \pm 19,0$ dias, com uma taxa de sobrevida de 100%. Já os animais com MCTs com altos índices de proliferação tiveram uma expectativa de vida de $449,9 \pm 58,3$ dias, com uma taxa de sobrevida de 53,6%, havendo diferença significativa entre os grupos ($p=0,002$) (Figura 5). Desta forma, o Ki67 configura-se como um forte fator prognóstico no MCT canino.

Figura 5 – Curva de sobrevida (Kaplan-Meier) dos pacientes estudados em função da expressão da proteína KIT.

Fonte: (FREYTAG, 2017)

A marcação do VEGF foi predominantemente citoplasmática nos mastócitos e sua avaliação foi realizada de acordo com a sua intensidade (0-3). Seis (13,9%) tumores não apresentaram marcação e foram consideradas grau 0; 22 (51,2%) tumores foram classificadas como grau 1; 11 (25,6%) como grau 2; e 4 (9,3%) como grau 3. Apesar dos animais com tumores grau 3 apresentarem uma maior sobrevida, não foi encontrada associação significativa do VEGF com a taxa de mortalidade ($p=0,405$) na casuística estudada (Tabela 6), tampouco foi encontrada qualquer relação significativa de sobrevida quando feita a comparação entre os graus de marcação propostos através do método de *pairwise* (com *Log Rank (Mantel-Cox)*) (Figura 6).

Figura 6 - Curva de sobrevida (Kaplan-Meier) dos pacientes estudados em função da expressão do marcador de proliferação Ki67 (cut-off 1,3%).

Fonte: (FREYTAG, 2017)

Os animais que não realizaram terapia sistêmica adjuvante tiveram uma expectativa de vida de $657,5 \pm 41,5$ dias, com uma taxa de sobrevida de 85%. Já os animais que foram submetidos à terapia sistêmica adjuvante apresentaram uma expectativa de vida de $420,2 \pm 74,3$ dias, com uma taxa de sobrevida de 50%, havendo

diferença significativa entre eles ($p=0,019$). Apesar da diferença entre os grupos, deve-se salientar que os animais submetidos à terapia sistêmica adjuvante devem ser entendidos como um grupo que teve a indicação a terapia sistêmica adicional, devido a sua classificação histológica e estadiamento clínico mais avançados. Neste contexto, os animais deste grupo apresentaram uma chance 69,2% maior de virem a óbito ($p=0,055$) (Tabela 6).

10 DISCUSSÃO

Estudos vêm demonstrando a participação do VEGF no desenvolvimento de uma grande variedade de tumores sólidos em humanos (HYODO et al., 1998; HEFLER et al., 1999; ELPEK et al., 2001; IAMAROON et al., 2003; KONDO et al., 2006) e em cães (RESTUCCI et al., 2002; RESTUCCI et al., 2004; GENTILINI et al., 2005; QIU et al., 2008; WOLFESBERGER et al., 2008). Apesar desta proteína se mostrar expressa em mastócitos neoplásicos (REBUZZI et al., 2007; AMORIM et al., 2010; GIANTIN et al., 2012b), não foi elucidada até o momento sua relação com o prognóstico no MCT. Giantin et al. (2012) e Patruno et al. (2009) demonstraram correlação significativa entre a expressão citoplasmática do VEGF nos MTCs grau III, quando comparados aos graus I e II, além de correlação com aumento da densidade microvascular nos tumores grau III. No entanto, os resultados de nosso estudo não demonstraram correlação significativa da expressão do VEGF com a sobrevida dos animais, apesar deste fator de crescimento ser expresso nos mastócitos neoplásicos em cães. Estes resultados estão de acordo com os achados de Rebuzzi *et al.* (2007) e Amorim *et al.* (2010), demonstrando que o VEGF ainda não pode ser empregado como fator prognóstico em MCTs caninos.

Estudos em tumores humanos revelaram que o VEGF atua como adjuvante na progressão tumoral ao exercer a função de fator de crescimento autócrino pelas células tumorais (LICHTENBERGER et al., 2010; PERROT-APPLANAT; DI BENEDETTO, 2012; KOCH et al., 2014; VARNEY; SINGH, 2015; SZABO et al., 2016; LIN et al., 2017). A presença de mastócitos em tumores sólidos tem sido associada a um pior prognóstico e maior ocorrência de metástases em humanos, principalmente pela expressão de mediadores pró-angiogênicos, como proteases, histamina, citocinas e

fatores de crescimento (VEGF) (IAMAROON et al., 2003; KONDO et al., 2006; TUNA et al., 2006; CIUREA et al., 2011). Neste contexto, os mastócitos não neoplásicos estão apenas exercendo sua ação inflamatória no microambiente tumoral. Adicionalmente, Rebuzzi *et al.* (2007) demonstraram que os mastócitos neoplásicos em cães não utilizam o VEGF como fator de crescimento autócrino. Sabendo que os mastócitos saudáveis produzem VEGF como parte de suas funções normais (RIBATTI et al., 2004), especulamos que a sua expressão também poderia ser maior nos MTCs caninos bem diferenciados, nos quais as células neoplásicas são menos indiferenciadas em relação às células normais. Essa seria uma hipótese plausível para o fato dos animais com maior expressão de VEGF terem apresentando maior sobrevida, ainda que sem diferença significativa entre os graus. Porém, estudos de densidade microvascular são necessários para validar esta hipótese.

O receptor de tirosina quinase, KIT, não se mostrou significativo com a taxa de mortalidade dos animais no presente estudo, porém os tumores com padrão KIT 3 foram significativamente relacionados à sobrevida quando comparados ao padrão KIT 1. Estes resultados reafirmam a importância do padrão de marcação difuso e citoplasmático ao pior prognóstico da doença. Estudos sobre mutações no gene c-Kit sugerem sua prevalência em 20 a 30 % dos MCT caninos (WEBSTER et al., 2006; LETARD et al., 2008), sendo associadas com a localização aberrante da proteína KIT no citoplasma dos mastócitos neoplásicos (WEBSTER et al., 2006). A localização aberrante da proteína KIT já foi associada ao mau prognóstico em diversos estudos (REGUERA et al., 2000; PREZIOSI; MORINI; SARLI, 2004; WEBSTER et al., 2006; TAKEUCHI et al., 2013). Animais com a presença destas mutações nos MTCs tem chances duas vezes maiores de responder ao tratamento com os inibidores de tirosina quinase, como o Masitinib e Toceranib (LONDON, 2009). Apesar do marcador KIT já ser amplamente empregado na rotina diagnóstica e clínica do MCT, nossos resultados reafirmam seu potencial como marcador prognóstico, além de auxiliarem na indicação de terapias alvo emergentes para esta neoplasia.

O marcador de proliferação celular Ki67 é amplamente estudado em MCTs e diversos autores demonstraram sua associação com o prognóstico da doença (SIMOES; SCHONING; BUTINE, 1994; ABADIE; AMARDEILH; DELVERDIER, 1999; SCASE et al., 2006; OZAKI et al., 2007; WEBSTER et al., 2007; MAGLENNON et al., 2008; VASCELLARI et al., 2013; BERLATO et al., 2015). No presente estudo, esta proteína confirmou-se como marcador prognóstico para o MCT, altamente relacionado

à taxa de mortalidade e a sobrevida dos animais. Nós estabelecemos o ponto de corte de 1,3% para o índice de proliferação celular através da análise da curva ROC, com alta sensibilidade (1,000), porém baixa especificidade (0,500), sendo este o ponto que melhor discriminou a associação do Ki67 com a taxa de mortalidade. No entanto, diferentes métodos de avaliação e pontos de corte são descritos para o índice de proliferação no MTC canino (ABADIE; AMARDEILH; DELVERDIER, 1999; SCASE et al., 2006; MAGLENNON et al., 2008; TAYLOR et al., 2010; BERLATO et al., 2015), o que ressalta a importância de padronização dos métodos de contagem e pontos de corte para este tumor.

Em conclusão, nosso estudo demonstrou que o VEGF não é um marcador prognóstico indicado para os MCTs caninos, uma vez que também está presente em mastócitos saudáveis e sua expressão pode ser mal interpretada dentre as graduações histológicas. Por outro lado, nossos dados reforçam o marcador de proliferação celular Ki67 e o receptor de tirosina quinase KIT como bons marcadores prognósticos para este tumor. Frente à grande variação no comportamento biológico dos MCTs, ressalta-se a necessidade de um conjunto de classificações histológicas e marcadores moleculares para prever com mais detalhes o desenvolvimento tumoral de cada paciente, auxiliando na prescrição de terapias alvo.

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. **American Veterinary Medical Association**, v. 215, n. 11, p. 1629-1634, 1999.
- AISHIMA, S.; NISHIHARA, Y.; IGUCHI, T.; TAGUCHI, K.; TAKETOMI, A.; MAEHARA, Y.; TSUNEYOSHI, M. Lymphatic spread is related to VEGF-C expression and D2-40-positive myofibroblasts in intrahepatic cholangiocarcinoma. **Modern Pathology**, v. 21, n. 3, p. 256-264, 2008.
- AMORIM, R. L.; PINCZOWSKI, P.; NETO, R. T.; RAHAL, S. C. Immunohistochemical evaluation of prostaglandin E2 and vascular endothelial growth factor in canine cutaneous mast cell tumours. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 8, n. 1, p. 23-27, 2010.
- BARRETT, R. P. Biopsy cytology of mast cell tumor. **Veterinary Medicine, Small Animal Clinician**, v. 71, n. 7, p. 926-927, 1976.
- BERGIN, I. L.; SMEDLEY, R. C.; ESPLIN, D. G.; SPANGLER, W. L.; KIUPEL, M. Prognostic evaluation of Ki67 threshold value in canine oral melanoma. **Veterinary Pathology**, v. 48, n. 1, p. 41-53, 2011.
- BERLATO, D.; STEWART, J.; NEWTON, R.; MAGLENNON, G. A.; MONTI, P.; FLINDALL, A.; MURPHY, S. Evaluation of minichromosome maintenance protein 7 as a prognostic marker in canine cutaneous mast cell tumours. **Vet Comp Oncol**, v. 10, n. 2, p. 135-142, 2012.
- BERLATO, D.; MURPHY, S.; MONTI, P.; STEWART, J.; NEWTON, J. R.; FLINDALL, A.; MAGLENNON, G. A. Comparison of mitotic index and Ki67 index in the prognostication of canine cutaneous mast cell tumours. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 13, n. 2, p. 143-150, 2015.
- BEŞTAŞ, R.; KAPLAN, M. A.; İŞIKDOĞAN, A. The correlation between serum VEGF levels and known prognostic risk factors in colorectal carcinoma. **Hepatogastroenterology**, v. 61, n. 130, p. 267-271, 2014.
- BOSTOCK, D. E. The prognosis following surgical removal of mastocytomas in dogs. **Journal of Small Animal Practice**, v. 14, n. 1, p. 27-41, 1973.
- BOSTOCK, D. E. Neoplasms of the skin and subcutaneous tissues in dogs and cats. **British Veterinary Journal**, v. 142, n. 1, p. 1-19, 1986.

BRODEY, R. S. Canine and feline neoplasia. **Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine**, v. 14, n., p. 309-354, 1970.

CARMELIET, P.; JAIN, R. K. Angiogenesis in cancer and other diseases. **Nature**, v. 407, n. 6801, p. 249-257, 2000.

CHANG, D. F.; XU, Z. Q.; SUN, B. Relationship between VEGF protein expression and lymph node metastasis in papillary thyroid carcinoma among Asians: a meta-analysis. **Tumour Biol**, v. 35, n. 6, p. 5511-5518, 2014.

CIUREA, R.; MĂRGĂRITESCU, C.; SIMIONESCU, C.; STEPAN, A.; CIUREA, M. VEGF and his R1 and R2 receptors expression in mast cells of oral squamous cells carcinomas and their involvement in tumoral angiogenesis. **Romanian Journal of Morphology and Embryology**, v. 52, n. 4, p. 1227-1232, 2011.

COSTA CASAGRANDE, T. A.; DE OLIVEIRA BARROS, L. M.; FUKUMASU, H.; COGLIATI, B.; CHAIBLE, L. M.; DAGLI, M. L.; MATERA, J. M. The value of molecular expression of KIT and KIT ligand analysed using real-time polymerase chain reaction and immunohistochemistry as a prognostic indicator for canine cutaneous mast cell tumours. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 13, n. 1, p. 1-10, 2015.

DVORAK, H. F.; BROWN, L. F.; DETMAR, M.; DVORAK, A. M. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. **American Journal of Pathology**, v. 146, n. 5, p. 1029-1039, 1995.

ELPEK, G. O.; GELEN, T.; AKSOY, N. H.; ERDOĞAN, A.; DERTSİZ, L.; DEMIRCAN, A.; KELEŞ, N. The prognostic relevance of angiogenesis and mast cells in squamous cell carcinoma of the oesophagus. **Journal of Clinical Pathology**, v. 54, n. 12, p. 940-944, 2001.

FERRARA, N.; DAVIS-SMYTH, T. The biology of vascular endothelial growth factor. **Endocrine Reviews**, v. 18, n. 1, p. 4-25, 1997.

FINNIE, J. W.; BOSTOCK, D. E. Skin neoplasia in dogs. **Australian Veterinary Journal**, v. 55, n. 12, p. 602-604, 1979.

FOLKMAN, J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? **Journal of the National Cancer Institute**, v. 82, n. 1, p. 4-6, 1990.

FOLKMAN, J.; SHING, Y. Angiogenesis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 16, p. 10931-10934, 1992.

FONSECA-ALVES, C. E.; BENTO, D. D.; TORRES-NETO, R.; WERNER, J.; KITCHELL, B.; LAUFER-AMORIM, R. Ki67/KIT double immunohistochemical staining in cutaneous mast cell tumors from Boxer dogs. **Res Vet Sci**, v. 102, n., p. 122-126, 2015.

FOX, L. E.; ROSENTHAL, R. C.; TWEDT, D. C.; DUBIELZIG, R. R.; MACEWEN, E. G.; GRAUER, G. F. Plasma histamine and gastrin concentrations in 17 dogs with mast cell tumors. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 4, n. 5, p. 242-246, 1990.

WELL, G. A.; SHEA, B.; O'CONNELL, D.; PETERSON, J.; WELCH, V.; LOSOS, M.; TUGWELL, P. The Newcastle-Ottawa Scale (NOS) for assessing the quality of nonrandomised studies in meta-analyses. Ottawa: Ottawa Hospital Research Institute, 2014. Disponível em: <http://www.ohri.ca/programs/clinical_epidemiology/oxford.asp>. Acesso em 21 dez. 2016.

GENTILINI, F.; CALZOLARI, C.; TURBA, M. E.; AGNOLI, C.; FAVA, D.; FORNI, M.; BERGAMINI, P. F. Prognostic value of serum vascular endothelial growth factor (VEGF) and plasma activity of matrix metalloproteinase (MMP) 2 and 9 in lymphoma-affected dogs. **Leukemia Research**, v. 29, n. 11, p. 1263-1269, 2005.

GERBER, H. P.; FERRARA, N. The role of VEGF in normal and neoplastic hematopoiesis. **Journal of Molecular Medicine**, v. 81, n. 1, p. 20-31, 2003.

GERDES, J.; LEMKE, H.; BAISCH, H.; WACKER, H. H.; SCHWAB, U.; STEIN, H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. **Journal of Immunology**, v. 133, n. 4, p. 1710-1715, 1984.

GIANTIN, M.; VASCELLARI, M.; MORELLO, E. M.; CAPELLO, K.; VERCELLI, A.; GRANATO, A.; LOPPARELLI, R. M.; NASSUATO, C.; CARMINATO, A.; MARTANO, M.; MUTINELLI, F.; DACASTO, M. c-KIT messenger RNA and protein expression and mutations in canine cutaneous mast cell tumors: correlations with post-surgical prognosis. **Journal of Veterinary Diagnostic**, v. 24, n. 1, p. 116-126, 2012a.

GIANTIN, M.; ARESU, L.; BENALI, S.; ARICÒ, A.; MORELLO, E. M.; MARTANO, M.; VASCELLARI, M.; CASTAGNARO, M.; LOPPARELLI, R. M.; ZANCANELLA, V.; GRANATO, A.; MUTINELLI, F.; DACASTO, M. Expression of matrix metalloproteinases, tissue inhibitors of metalloproteinases and vascular endothelial growth factor in canine mast cell tumours. **Journal of Comparative Pathology**, v. 147, n. 4, p. 419-429, 2012b.

GIL DA COSTA, R. M.; 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 Vet Res**, v. 3, n., p. 19, 2007.

GILES, F. J. The vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling pathway: a therapeutic target in patients with hematologic malignancies. **Oncologist**, v. 6 Suppl 5, n., p. 32-39, 2001.

GILLESPIE, V.; BAER, K.; FARRELLY, J.; CRAFT, D.; LUONG, R. Canine gastrointestinal stromal tumors: immunohistochemical expression of CD34 and examination of prognostic indicators including proliferation markers Ki67 and AgNOR. **Veterinary Pathology**, v. 48, n. 1, p. 283-291, 2011.

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

GUANG-WU, H.; SUNAGAWA, M.; JIE-EN, L.; SHIMADA, S.; GANG, Z.; TOKESHI, Y.; KOSUGI, T. The relationship between microvessel density, the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF), and the extension of nasopharyngeal carcinoma. **Laryngoscope**, v. 110, n. 12, p. 2066-2069, 2000.

HANAHAN, D. Signaling vascular morphogenesis and maintenance. **Science**, v. 277, n. 5322, p. 48-50, 1997.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.

HEFLER, L.; TEMPFER, C.; OBERMAIR, A.; FRISCHMUTH, K.; SLIUTZ, G.; REINTHALLER, A.; LEODOLTER, S.; KAINZ, C. Serum concentrations of vascular endothelial growth factor in vulvar cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 5, n. 10, p. 2806-2809, 1999.

HOWARD, E. B.; SAWA, T. R.; NIELSEN, S. W.; KENYON, A. J. Mastocytoma and gastroduodenal ulceration. Gastric and duodenal ulcers in dogs with mastocytoma. **Veterinary Pathology**, v. 6, n. 2, p. 146-158, 1969.

HYODO, I.; DOI, T.; ENDO, H.; HOSOKAWA, Y.; NISHIKAWA, Y.; TANIMIZU, M.; JINNO, K.; KOTANI, Y. Clinical significance of plasma vascular endothelial growth factor in gastrointestinal cancer. **European Journal of Cancer**, v. 34, n. 13, p. 2041-2045, 1998.

IAMAROON, A.; PONGSIRIWET, S.; JITTIDECHARAKS, S.; PATTANAPORN, K.; PRAPAYASATOK, S.; WANACHANTARARAK, S. Increase of mast cells and tumor angiogenesis in oral squamous cell carcinoma. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 32, n. 4, p. 195-199, 2003.

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

KANDEFER-GOLA, M.; MADEJ, J. A.; DZIMIRA, S.; NOWAK, M.; JANUS, I.; CIAPUTA, R. Comparative analysis of markers of cell proliferation in canine mast cell tumours according to current classifications. **Pol J Vet Sci**, v. 18, n. 2, p. 241-247, 2015.

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, n. 4, p. 371-377, 2004.

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

KIUPEL, M.; WEBSTER, J. D.; BAILEY, K. L.; BEST, S.; DELAY, J.; DETRISAC, C. J.; FITZGERALD, S. D.; GAMBLE, D.; GINN, P. E.; GOLDSCHMIDT, M. H.; HENDRICK, M. J.; HOWERTH, E. W.; JANOVITZ, E. B.; LANGOHR, I.; LENZ, S. D.; LIPSCOMB, 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.; W SNYDER, P.; 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 tumors to more accurately predict biological behavior. **Veterinary Pathology**, v. 48, n. 1, p. 147-155, 2011.

KOCH, K. R.; REFAIAN, N.; HOS, D.; SCHLERETH, S. L.; BOSCH, J. J.; CURSIEFEN, C.; HEINDL, L. M. Autocrine impact of VEGF-A on uveal melanoma cells. **Investigative Ophthalmology & Visual**, v. 55, n. 4, p. 2697-2704, 2014.

KONDO, K.; MURAMATSU, M.; OKAMOTO, Y.; JIN, D.; TAKAI, S.; TANIGAWA, N.; MIYAZAKI, M. Expression of chymase-positive cells in gastric cancer and its correlation with the angiogenesis. **Journal of Surgical Oncology**, v. 93, n. 1, p. 36-42; discussion 42-33, 2006.

KORPELAINEN, E. I.; ALITALO, K. Signaling angiogenesis and lymphangiogenesis. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 10, n. 2, p. 159-164, 1998.

LETARD, S.; YANG, Y.; HANSSENS, K.; PALMÉRINI, F.; LEVENTHAL, P. S.; GUÉRY, S.; MOUSSY, A.; KINET, J. P.; HERMINE, O.; DUBREUIL, P. Gain-of-function mutations in the extracellular domain of KIT are common in canine mast cell tumors. **Molecular Cancer Research**, v. 6, n. 7, p. 1137-1145, 2008.

LICHTENBERGER, B. M.; TAN, P. K.; NIEDERLEITHNER, H.; FERRARA, N.; PETZELBAUER, P.; SIBILIA, M. Autocrine VEGF signaling synergizes with EGFR in tumor cells to promote epithelial cancer development. **Cell**, v. 140, n. 2, p. 268-279, 2010.

LIN, Y.; ZHAI, E.; LIAO, B.; XU, L.; ZHANG, X.; PENG, S.; HE, Y.; CAI, S.; ZENG, Z.; CHEN, M. Autocrine VEGF signaling promotes cell proliferation through a PLC-dependent pathway and modulates Apatinib treatment efficacy in gastric cancer. **Oncotarget**, v., n., p., 2017.

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

LONDON, C. A. Tyrosine kinase inhibitors in veterinary medicine. **Topics in Companion Animal Medicine**, v. 24, n. 3, p. 106-112, 2009.

MA, Y.; LONGLEY, B. J.; WANG, X.; BLOUNT, J. L.; LANGLEY, K.; CAUGHEY, G. H. Clustering of activating mutations in c-KIT's juxtamembrane coding region in canine mast cell neoplasms. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 112, n. 2, p. 165-170, 1999.

MACKOWIAK, I. I.; GENTILE, L. B.; CHAIBLE, L. M.; NAGAMINE, M. K.; GUERRA, J. M.; MOTA, E. F.; MATERA, J. M.; MENNECIER, G.; SANCHES, D. S.; DAGLI, M. L. E-cadherin in canine mast cell tumors: decreased expression and altered subcellular localization in Grade 3 tumors. **Vet J**, v. 194, n. 3, p. 405-411, 2012.

MACY, D. W. Canine and feline mast cell tumors: biologic behavior, diagnosis, and therapy. **Seminars in veterinary medicine and surgery (small animal)**, v. 1, n. 1, p. 72-83, 1986.

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

MAEDA, K.; CHUNG, Y. S.; OGAWA, Y.; TAKATSUKA, S.; KANG, S. M.; OGAWA, M.; SAWADA, T.; SOWA, M. Prognostic value of vascular endothelial growth factor expression in gastric carcinoma. **Cancer**, v. 77, n. 5, p. 858-863, 1996.

MAGLENNON, G. A.; MURPHY, S.; ADAMS, V.; MILLER, J.; SMITH, K.; BLUNDEN, A.; SCASE, T. J. Association of Ki67 index with prognosis for intermediate-grade canine cutaneous mast cell tumours. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 6, n. 4, p. 268-274, 2008.

MCSHANE, L. M.; ALTMAN, D. G.; SAUERBREI, W.; TAUBE, S. E.; GION, M.; CLARK, G. M.; DIAGNOSTICS, S. S. O. T. N.-E. W. G. O. C. REporting recommendations for tumour MARKer prognostic studies (REMARK). **British Journal of Cancer**, v. 93, n. 4, p. 387-391, 2005.

MEDERLE, O.; MEDERLE, N.; BOCAN, E. V.; CEAUȘU, R.; RAICA, M. VEGF expression in dog mastocytoma. **Revista Medico-Chirurgicala a Societatii De Medici Si Naturalisti Din Iasi**, v. 114, n. 1, p. 185-188, 2010.

MILLER, M. A.; NELSON, S. L.; TURK, J. R.; PACE, L. W.; BROWN, T. P.; SHAW, D. P.; FISCHER, J. R.; GOSSER, H. S. Cutaneous neoplasia in 340 cats. **Veterinary Pathology**, v. 28, n. 5, p. 389-395, 1991.

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

MOHER, D.; LIBERATI, A.; TETZLAFF, J.; ALTMAN, D. G.; GROUP, P. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement. **Annals of Internal Medicine**, v. 151, n. 4, p. 264-269, W264, 2009.

MUKARATIRWA, S. Prognostic and predictive markers in canine tumours: rationale and relevance. A review. **Vet Q**, v. 27, n. 2, p. 52-64, 2005.

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

NEUFELD, G.; COHEN, T.; GENGRINOVITCH, S.; POLTORAK, Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. **The FASEB Journal**, v. 13, n. 1, p. 9-22, 1999.

NEWMAN, S. J.; MRKONJICH, L.; WALKER, K. K.; ROHRBACH, B. W. Canine subcutaneous mast cell tumour: diagnosis and prognosis. **Journal of Comparative Pathology**, v. 136, n. 4, p. 231-239, 2007.

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

OZAKI, K.; YAMAGAMI, T.; NOMURA, K.; NARAMA, I. Prognostic significance of surgical margin, Ki-67 and cyclin D1 protein expression in grade II canine cutaneous mast cell tumor. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 69, n. 11, p. 1117-1121, 2007.

PASSANTINO, L.; PASSANTINO, G.; CIANCIO, A.; RIBAUD, M. R.; LO PRESTI, G.; RANIERI, G.; PERILLO, A. Expression of proto-oncogene C-kit and correlation with morphological evaluations in canine cutaneous mast cell tumors. **Immunopharmacol Immunotoxicol**, v. 30, n. 3, p. 609-621, 2008.

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, n. 5, p. 469-474, 1984.

PATRUNO, R.; ARPAIA, N.; GADALETA, C. D.; PASSANTINO, L.; ZIZZO, N.; MISINO, A.; LUCARELLI, N. M.; CATINO, A.; VALERIO, P.; RIBATTI, D.; RANIERI, G. VEGF concentration from plasma-activated platelets rich correlates with microvascular density and grading in canine mast cell tumour spontaneous model. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 13, n. 3, p. 555-561, 2009.

PERROT-APPLANAT, M.; DI BENEDETTO, M. Autocrine functions of VEGF in breast tumor cells: adhesion, survival, migration and invasion. **Cell Adhesion & Migration**, v. 6, n. 6, p. 547-553, 2012.

PRADA, J.; QUEIROGA, F. L.; GREGÓRIO, H.; PIRES, I. Evaluation of cyclooxygenase-2 expression in canine mast cell tumours. **J Comp Pathol**, v. 147, n. 1, p. 31-36, 2012.

PREZIOSI, R.; SARLI, G.; PALTRINIERI, M. Prognostic value of intratumoral vessel density in cutaneous mast cell tumors of the dog. **Journal of Comparative Pathology**, v. 130, n. 2-3, p. 143-151, 2004.

PREZIOSI, R.; MORINI, M.; SARLI, G. Expression of the KIT protein (CD117) in primary cutaneous mast cell tumors of the dog. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 16, n. 6, p. 554-561, 2004.

PRIESTER, W. A. Skin tumors in domestic animals. Data from 12 United States and Canadian colleges of veterinary medicine. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 50, n. 2, p. 457-466, 1973.

QIU, C. W.; LIN, D. G.; WANG, J. Q.; LI, C. Y.; DENG, G. Z. Expression and significance of PTEN and VEGF in canine mammary gland tumours. **Veterinary Research Communications**, v. 32, n. 6, p. 463-472, 2008.

REBUZZI, L.; WILLMANN, M.; SONNECK, K.; GLEIXNER, K. V.; FLORIAN, S.; KONDO, R.; MAYERHOFER, M.; VALES, A.; GRUZE, A.; PICKL, W. F.; THALHAMMER, J. G.; VALENT, P. Detection of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptors Flt-1 and KDR in canine mastocytoma cells. **Veterinary Immunology and Immunopathology** v. 115, n. 3-4, p. 320-333, 2007.

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

RESTUCCI, B.; PAPPARELLA, S.; MAIOLINO, P.; DE VICO, G. Expression of vascular endothelial growth factor in canine mammary tumors. **Veterinary Pathology**, v. 39, n. 4, p. 488-493, 2002.

RESTUCCI, B.; BORZACCHIELLO, G.; MAIOLINO, P.; MARTANO, M.; PACIELLO, O.; PAPPARELLA, S. Expression of vascular endothelial growth factor receptor Flk-1 in canine mammary tumours. **Journal of Comparative Pathology**, v. 130, n. 2-3, p. 99-104, 2004.

RIBATTI, D.; CRIVELLATO, E.; ROCCARO, A. M.; RIA, R.; VACCA, A. Mast cell contribution to angiogenesis related to tumour progression. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 34, n. 11, p. 1660-1664, 2004.

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

ROSEN, L. S. Clinical experience with angiogenesis signaling inhibitors: focus on vascular endothelial growth factor (VEGF) blockers. **Cancer Control**, v. 9, n. 2 Suppl, p. 36-44, 2002.

ROSEN, L. S. VEGF-targeted therapy: therapeutic potential and recent advances. **Oncologist**, v. 10, n. 6, p. 382-391, 2005.

ROTHWELL, T. L.; HOWLETT, C. R.; MIDDLETON, D. J.; GRIFFITHS, D. A.; DUFF, B. C. Skin neoplasms of dogs in Sydney. **Australian Veterinary Journal**, v. 64, n. 6, p. 161-164, 1987.

SABATTINI, S.; SCARPA, F.; BERLATO, D.; BETTINI, G. Histologic grading of canine mast cell tumor: is 2 better than 3? **Veterinary Pathology**, v. 52, n. 1, p. 70-73, 2015.

SANTOS, A. A.; LOPES, C. C.; RIBEIRO, J. R.; MARTINS, L. R.; SANTOS, J. C.; AMORIM, I. F.; GÄRTNER, F.; MATOS, A. J. Identification of prognostic factors in canine mammary malignant tumours: a multivariable survival study. **BMC Veterinary Research**, v. 9, n., p. 1, 2013.

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.

SCHOLZEN, T.; GERDES, J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. **Journal of Cellular Physiology**, v. 182, n. 3, p. 311-322, 2000.

SCHULTHEISS, P. C.; GARDINER, D. W.; RAO, S.; OLEA-POPELKA, F.; TUOHY, J. L. Association of histologic tumor characteristics and size of surgical margins with clinical outcome after surgical removal of cutaneous mast cell tumors in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 238, n. 11, p. 1464-1469, 2011.

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

SÉGUIN, B.; BESANCON, M. F.; MCCALLAN, J. L.; DEWE, L. L.; TENWOLDE, M. C.; WONG, E. K.; KENT, M. S. Recurrence rate, clinical outcome, and cellular proliferation indices as prognostic indicators after incomplete surgical excision of cutaneous grade II mast cell tumors: 28 dogs (1994-2002). **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 20, n. 4, p. 933-940, 2006.

SHENG, H.; AOE, M.; DOIHARA, H.; ANDOU, A.; SHIMIZU, N. Prognostic value of vascular endothelial growth factor expression in primary lung carcinoma. **Acta Medica Okayama**, v. 54, n. 3, p. 119-126, 2000.

SHINKARUK, S.; BAYLE, M.; LAÏN, G.; DÉLÉRIS, G. Vascular endothelial cell growth factor (VEGF), an emerging target for cancer chemotherapy. **Current Medicinal Chemistry - Anti-Cancer Agents**, v. 3, n. 2, p. 95-117, 2003.

SHOOP, S. J.; MARLOW, S.; CHURCH, D. B.; ENGLISH, K.; MCGREEVY, P. D.; STELL, A. J.; THOMSON, P. C.; O'NEILL, D. G.; BRODBELT, D. C. Prevalence and risk factors for mast cell tumours in dogs in England. **Canine Genetics and Epidemiology**, v. 2, n., p. 1, 2015.

SIEMEISTER, G.; MARTINY-BARON, G.; MARMÉ, D. The pivotal role of VEGF in tumor angiogenesis: molecular facts and therapeutic opportunities. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 17, n. 2, p. 241-248, 1998.

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

SLEDGE, D. G.; WEBSTER, J.; KIUPEL, M. Canine cutaneous mast cell tumors: A combined clinical and pathologic approach to diagnosis, prognosis, and treatment selection. **Veterinary Journal**, v. 215, n., p. 43-54, 2016.

STONE, K. D.; PRUSSIN, C.; METCALFE, D. D. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 125, n. 2 Suppl 2, p. S73-80, 2010.

STREFEZZI, R. E. F.; KLEEB, S. R.; XAVIER, J. G.; FUKUMASU, H.; CATÃO-DIAS, J. L. The value of immunohistochemical expression of BAX in formulating a prognosis for canine cutaneous mast cell tumours. **Journal of Comparative Pathology**, v. 146, n. 4, p. 314-319, 2012.

SZABO, E.; SCHNEIDER, H.; SEYSTAHL, K.; RUSHING, E. J.; HERTING, F.; WEIDNER, K. M.; WELLER, M. Autocrine VEGFR1 and VEGFR2 signaling promotes survival in human glioblastoma models in vitro and in vivo. **Neuro Oncology**, v. 18, n. 9, p. 1242-1252, 2016.

TAKEUCHI, Y.; FUJINO, Y.; WATANABE, M.; TAKAHASHI, M.; NAKAGAWA, T.; TAKEUCHI, A.; BONKOBARA, M.; KOBAYASHI, T.; OHNO, K.; UCHIDA, K.; ASANO, K.; NISHIMURA, R.; NAKAYAMA, H.; SUGANO, S.; OHASHI, Y.; TSUJIMOTO, H. Validation of the prognostic value of histopathological grading or c-kit mutation in canine cutaneous mast cell tumours: a retrospective cohort study. **Veterinary Journal**, v. 196, n. 3, p. 492-498, 2013.

TAYLOR, F.; MURPHY, S.; HOATHER, T.; DOBSON, J.; SCASE, T. TSLC1 tumour-suppressor gene expression in canine mast cell tumours. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 8, n. 4, p. 263-272, 2010.

TUNA, B.; YORUKOGLU, K.; UNLU, M.; MUNGAN, M. U.; KIRKALI, Z. Association of mast cells with microvessel density in renal cell carcinomas. **European Urology**, v. 50, n. 3, p. 530-534, 2006.

VAN LELYVELD, S.; WARLAND, J.; MILLER, R.; MAW, H.; FOALE, R.; GOODFELLOW, M.; DOBSON, J. Comparison between Ki-67 index and mitotic index for predicting outcome in canine mast cell tumours. **Journal of Small Animal Practice**, v. 56, n. 5, p. 312-319, 2015.

VARGAS, T. H.; PULZ, L. H.; BARRA, C. N.; KLEEB, S. R.; XAVIER, J. G.; CATÃO-DIAS, J. L.; FUKUMASU, H.; NISHIYA, A. T.; STREFEZZI, R. F. Immunohistochemical Expression of the Pluripotency Factor OCT4 in Canine Mast Cell Tumours. **Journal of Comparative Pathology**, v. 153, n. 4, p. 251-255, 2015.

VARNEY, M. L.; SINGH, R. K. VEGF-C-VEGFR3/Flt4 axis regulates mammary tumor growth and metastasis in an autocrine manner. **American Journal of Cancer Research**, v. 5, n. 2, p. 616-628, 2015.

VASCELLARI, M.; GIANTIN, M.; CAPELLO, K.; CARMINATO, A.; MORELLO, E. M.; VERCELLI, A.; GRANATO, A.; BURACCO, P.; DACASTO, M.; MUTINELLI, F. Expression of Ki67, BCL-2, and COX-2 in canine cutaneous mast cell tumors: association with grading and prognosis. **Veterinary Pathology**, v. 50, n. 1, p. 110-121, 2013.

WARLAND, J.; DOBSON, J. Breed predispositions in canine mast cell tumour: a single centre experience in the United Kingdom. **Veterinary Journal**, v. 197, n. 2, p. 496-498, 2013.

WEBSTER, J. D.; YUZBASIYAN-GURKAN, V.; KANEENE, J. B.; MILLER, R.; RESAU, J. H.; KIUPEL, M. The role of c-KIT in tumorigenesis: evaluation in canine cutaneous mast cell tumors. **Neoplasia**, v. 8, n. 2, p. 104-111, 2006.

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.

WEBSTER, J. D.; YUZBASIYAN-GURKAN, V.; THAMM, D. H.; HAMILTON, E.; KIUPEL, M. Evaluation of prognostic markers for canine mast cell tumors treated with vinblastine and prednisone. **BMC Veterinary Research**, v. 4, n., p. 32, 2008.

WELLE, M. M.; BLEY, C. R.; HOWARD, J.; RÜFENACHT, S. Canine mast cell tumours: a review of the pathogenesis, clinical features, pathology and treatment. **Veterinary Dermatology**, v. 19, n. 6, p. 321-339, 2008.

WERGIN, M. C.; KASER-HOTZ, B. Plasma vascular endothelial growth factor (VEGF) measured in seventy dogs with spontaneously occurring tumours. **In Vivo**, v. 18, n. 1, p. 15-19, 2004.

WHITE, C. R.; HOHENHAUS, A. E.; KELSEY, J.; PROCTER-GRAY, E. Cutaneous MCTs: associations with spay/neuter status, breed, body size, and phylogenetic cluster. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 47, n. 3, p. 210-216, 2011.

WOLFESBERGER, B.; TONAR, Z.; WITTER, K.; GUIJA DE ARESPOCHAGA, A.; SKALICKY, M.; WALTER, I.; THALHAMMER, J. G.; EGGER, G. F. Microvessel density in normal lymph nodes and lymphomas of dogs and their correlation with vascular endothelial growth factor expression. **Research in Veterinary Science**, v. 85, n. 1, p. 56-61, 2008.

WU, H.; HAYASHI, T.; INOUE, M. Immunohistochemical expression of Mdm2 and p53 in canine cutaneous mast cell tumours. **Journal of veterinary medicine. A, Physiology, pathology, clinical medicine**, v. 53, n. 2, p. 65-68, 2006.

WU, H.; INOUE, M. Immunohistochemical analysis for Mdm2 and p53 proteins in methylcholanthrene-induced mouse rhabdomyosarcomas. **J Vet Med Sci**, v. 68, n. 5, p. 427-431, 2006.

XIA, H.; SHEN, J.; CHEN, S.; HUANG, H.; XU, Y.; MA, H. Overexpression of VEGF-C correlates with a poor prognosis in esophageal cancer patients. **Cancer Biomark**, v. 17, n. 2, p. 165-170, 2016.

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.

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, n. 5, p. 529-535, 2002.

APÊNDICES

APÊNDICE A - DADOS EXTRAÍDOS DOS 46 ESTUDOS E MOTIVO DAS EXCLUSÕES. São Paulo, 2017

Reg.	Autor	Ano	Motivo da exclusão	Alvo IHQ	n(ani.)	n(tum.)	Follow-up	HR	C.I	Valor de p	Marcação	Sobrevida	Sig.
2	Simoes, J. P.	1999		PCNA		90				0,0019	Nuclear		Sim
3	Gamblin, R. M.	1997	SEM FOLLOW-UP	P53	16						N/N		
5	Abadie, J. J.	1999		PCNA	120	120	12meses (pelo menos)			<0,001	Nuclear	MRM	Sim
		1999		Ki67	120	120	12meses (pelo menos)			<0,001	Nuclear	MRM	Sim
7	Jaffe, M. H.	2000		P53	54	126				0,001	Nuclear	TS	Sim
8	Ginn, P. E.	2000		P53	53	53				>0,05	Nuclear	TS	Não
10	Ozaki, K.	2002	SEM FOLLOW-UP	c-Kit	39	39	sem						
				P53	39	39	sem						
15	Preziosi. S.	2004		c-Kit	31	28	12 meses			0,037(Kit 2 e 3)	C/M	TS	Sim
16	Kiupel, M	2004		c-Kit	100	100		II(20,10) III(76,54)		II(p=0,0056) III(q	C/M	TS	Sim
			ÚNICO MARCADOR	Triptase	100	100					C	TS	Não
17	Preziosi. S.	2004	ÚNICO MARCADOR	Fator VIII	32	32	12meses			0,046	C	TS	Sim
				AgNOR	28	30	247 dias (pelo menos)						
18	Seguin, B.	2006	S/ Rel. SOBREVIDA	PCNA	28	30	247 dias (pelo menos)						
				Ki67	28	30	247 dias (pelo menos)						
21	Webster, J. D.	2006	SEM FOLLOW-UP	c-KIT	60						C/M		
				Ki67	121	121		1,270	1,15-1,41	<0,001	Nuclear	MRM	Sim
23	Scase, T. J.	2006		PCNA	121	121		1,020	1,00-1,04	0,108	Nuclear	MRM	Não
			ÚNICO MARCADOR	Survivina	121	121					C/N		Não
24	Ozaki, K.	2007		Ki67	48	37	360 (pelo menos)			0,049	Nuclear	TS	Sim
			ÚNICO MARCADOR	Cyclin D1	48	37	360 (pelo menos)			0,109	Nuclear	TS	Não
				c-KIT	103	67					C/M		
25	Gil da Costa, R. M.	2007	S/ Rel. SOBREVIDA	Ki67	103	67					Nuclear		
				AgNor	103	67					Nuclear		
				PCNA	53		55-1780 dias			0,640	Nuclear		Não
26	Newman, S. J.	2007	SUBCUTÂNEO	Ki67	53		55-1780 dias			0,470	Nuclear		Não
				c-Kit	53		55-1780 dias			p>0,05	C/M		Não
				Ki67		56					Nuclear	MRM	
27	Webster, J. D.	2007	SEM FOLLOW-UP	PCNA		56					Nuclear	MRM	
				Kit		56					C/M	MRM	
				Ki67	28	28				0,0097	Nuclear	TS	Sim
30	Webster, J. D.	2008		c-KIT	28	28				0,0049	C/M	TS	Sim
31	Passantino, L.		SEM FOLLOW-UP										
32	Yhee, J. Y.	2008	SEM FOLLOW-UP	CD1									
35	Taylor, F.	2010	ÚNICO MARCADOR	TSLC1	35	35		988		0,220	C	TS	Não
				Ki67	35	35		988		0,381	Nuclear	TS	Não
40	Thompson, J. J.	2011	S/ Rel. SOBREVIDA		60								
45	Berlato, D.	2012	ÚNICO MARCADOR	MCM7	95	100	600dias pelo menos		74–329	<0,0001	Nuclear	TS	SIG
46	Strefezzi, R. de F.	2011	ÚNICO MARCADOR	BAX	28	24				0,0009	C		SIG
47	Giantin, M.	2012		c-Kit	51	51	18 meses			0,06	C/M	TS	Não
				Ki67	51	53	12 meses (mínimo)		0,52-0,92	0,006	núcleo	MRM	Sim
52	Vascellari, M.	2011		BCL2	51	53	12 meses (mínimo)			0,729	C	MRM	Não
				COX2	51	53	12 meses (mínimo)			0,786	C	MRM	Não
59	Fonseca-Alves, C. E	2015	S/ Rel. SOBREVIDA	c-Kit	69	69							
				Ki67	69	69							
61	Berlato, D.	2013		ki67	95		1088(média) 1145(med 3		1,3-6,8	<0,001	Nuclear		Sim
				Ki67	60	60							
62	Kandefér-Gola, M.	2015	SEM FOLLOW-UP	PCNA	60	60							
				MCM-3	60	60							
64	Costa-Casagrande, T	2010		c-Kit	81	81	1 ano (pelo menos)			0,68	C/M	ILD	Não
65	Pulz LH		ÚNICO MARCADOR	MMP-2	46	46							
68	Vargas, T. H.	2015	ÚNICO MARCADOR	OCT4	28	36	180 dias (mínimo)			0,2603	N/C		Não
72	Rich, T.		SEM FOLLOW-UP	p-62									
73	Maglennon, G. A.	2008		Ki67	163			18,200	7,33-45,11	<0,0001	Nuclear		Sim
74	Amorim R. L.	2009	SEM FOLLOW-UP	VEGF	53								
				PGE-2	53								
				CD31		60							
76	Kandefér-Gola, M.	2015	SEM FOLLOW-UP	VEGF		60							
				LIMS-1		60							
				c-Kit		45							
77	Kandefér-Gola, M.	2015	S/ Rel. SOBREVIDA	p16		45							
				VIII		45							
78	Mackowiak, I.I.	2012	ÚNICO MARCADOR	E-caderina		18							
79	Prada, J.	2012	SEM FOLLOW-UP	COX2									
81	Russell, D. S.	2010	SEM FOLLOW-UP	eptor Vitamina D									
85	Heller, D. A.	2005	SEM FOLLOW-UP	COX2									
98	van Lelyveld, S	2015		Ki67	162		107-2647(892)						
106	Giantin, M	2012	SEM FOLLOW-UP	VEGF	35						C		
107	Teng, SP	2012	S/ Rel. SOBREVIDA	c-Kit							C/M		
117	Patruno, R	2009	SEM FOLLOW-UP	VEGF		86					C		
				VEGF	18						C		
119	Rebuzzi, L	2007	SEM FOLLOW-UP	KIT	18						C/M		
120	Wu, H	2006	SEM FOLLOW-UP	Mdm2 e P53		71							

Fonte: (FREYTAG, 2017)

Notas: TS = tempo de sobrevida; MRM = morte relacionada ao mastocitoma; ILD= intervalo livre da doença; N/N= nuclear e nucleolar; C/M= citoplasmática e membranosa; C= citoplasmática

APÊNDICE B - DADOS EXTRAÍDOS DOS 16 ESTUDOS SELECIONADOS PELA REVIÃO SISTEMÁTICA. São Paulo, 2017

Reg.	Autor	Ano	alvo IHQ	n(ani.)	n(tum.)	Follow-up	grupo de referência	Teste estatístico	Anticorpo	Dil.	Clonalidade	IHQ + HR	C.I	valor de p	Marcação	Sobrevida	Sig.	
2	Simoes, J. P.	1999	PCNA	70	70	601 dias	PCNA-5HPFs abaixo de 26 l	Wilcoxon	19A2 Biogen	1:200	Monoclonal	n/s		0,0052	Nuclear	TS	Sim	
5	Abadie, J. J.	1999	PCNA	120	120	12meses (pelo menos)	média de nucleos + em 1000 cels	Fisher exact test	clone PC10	1:10	Monoclonal	120		<0,001	Nuclear	MRM	Sim	
			Ki67	120	120	12meses (pelo menos)	<93 / >93 (em 1000 cél)	Fisher exact test	DAKO M1B1	1:50	Monoclonal	120		<0,001	Nuclear	TS	Sim	
7	Jaffe, M. H.	2000	P53	106	126	1924 (média de sobrevida)	% positive cells	Covariate analysis	antibody CM-1	n/s	Policlonal	n/s		0,001	Nuclear	TS	Sim	
8	Ginn, P. E.	2000	P53	53	53	48 meses	1- <10%, 2- 10-50%, 3- >50%	Breslow and Mantel–Cox	antibody CM-1	n/s	Policlonal	25		>0,05	Nuclear	TS	Não	
15	Preziosi. S.	2004	c-Kit	28	28	12 meses	I, II, III	Kaplan meier curves	DAKO CD117	1:500	Policlonal	31		0,037(Kit 2 e 3)	C/M	TS	Sim	
16	Kiupel, M	2004	c-Kit	100	100	n/s	I, II, III	proportional hazards regression	CD117 DAKO	1:100	Policlonal	98	II(20,10) III(76,54)	II p=0,0056 / III p=0,0004	C/M	TS	Sim	
23	Scase, T. J.	2006	Ki67	121	121	>800dias	<1,8%, >1,8%	Cox regression analysis	MIB-1 DAKO	1:150	Monoclonal	n/s	1,270	1,15-1,41	<0,001	Nuclear	MRM	Sim
			PCNA	121	121	>800dias	<48.6%, >48,6%	Cox regression analysis	PC10 DAKO	1:2000	Monoclonal	n/s	1,020	1,00-1,04	0,108	Nuclear	MRM	Não
24	Ozaki, K.	2007	Ki67	48		360 (pelo menos)	<11%, >11%	logrank and Wilcoxon	MIB1 DAKO	1:50	Monoclonal	n/s		0,049	Nuclear	TS	Sim	
30	Webster, J. D.	2008	Ki67	28	28	24 meses	<23, >23 (cél + por área)	proportional hazards regression	DAKO M1B1	1:50	Monoclonal	28		0,0097	Nuclear	TS	Sim	
			c-KIT	28	28	24 meses	I, II, III	proportional hazards regression	CD117 DAKO	1:100	Policlonal	28		0,0049	C/M	TS	Sim	
35	Taylor, F.	2010	Ki67	35	35	988 dias	<1,8%, >_1,8%	Fisher's exact test	MIB-1 DAKO	1:150	Monoclonal	35		0,381	Nuclear	TS	Não	
47	Giantin, M.	2012	c-Kit	59	51	18 meses	I, II, III	Kaplan meier curves	CD117 DAKO	1:50	Policlonal	60		0.06	C/M	TS	Não	
52	Vascellari, M.	2012	Ki67	51	53	12 meses (mínimo)	<10,6 / >10,6 (%)	Log rank test	MIB-1 DAKO	1:50	Monoclonal	53		0,52-0,92	0,006	núcleo	TS	Sim
61	Berlato, D.	2013	ki67	95	95	1088(média) 1145(mediana)	<_0,01 / >0,01	log-rank test	MIB-1 DAKO	1:150	Monoclonal	95	3	1,3-6,8	<0,001	nucleo	TS	Sim
64	Costa-Casagrande, T. A.	2010	c-Kit	81	81	1 ano (mínimo)	I, II, III	Log rank test	CD117 DAKO	1:100	Policlonal	81		0,68	C/M	DFS	Não	
73	Maglennon, G. A.	2008	Ki67	163		medina 996	<_1,8% e >1,8%	log-rank tests / Cox prop. reg	MIB-1 DAKO	1:150	Monoclonal	163	18,200	7,33-45,11	<0,0001	Nuclear	TS	Sim
98	Van Lelyveld, S	2015	Ki67	162		mediana 892	<1,8 e >_1,8	Kaplan Meier	MIB-1 DAKO	n/s	Monoclonal	162		<0,001	Nuclear	TS	Sim	

Fonte: (FREYTAG, 2017)

Notas: n/s= sem informação; TS = tempo de sobrevida; MRM = morte relacionada ao mastocitoma; ILD= intervalo livre da doença; N/N= nuclear e nucleolar; C/M= citoplasmática e membranosa; C= citoplasmática