CAMILA NERI BARRA

**Imunomarcacão de proteínas relacionadas à apoptose em mastocitomas
cutâneos caninos e seu valor como indicador prognóstico**

São Paulo

2015

CAMILA NERI BARRA

**Imunomarcacão de proteínas relacionadas à apoptose em mastocitomas
cutâneos caninos e seu valor como indicador prognóstico**

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 obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Patologia Experimental e Comparada

Área de Concentração:

Patologia Experimental e Comparada

Orientador:

Prof. Dr. Ricardo de Francisco Strefezzi

São Paulo

2015

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.3169
FMVZ

Barra, Camila Neri
Imunomarcção de proteínas relacionadas à apoptose em mastocitomas cutâneos
caninos e seu valor como indicador prognóstico / Camila Neri Barra. -- 2015.
108 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia. Departamento Patologia Experimental e Comparada, São Paulo,
2015.

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.

Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo de Francisco Strefezzi.

1. Bcl-2. 2. Imuno-histoquímica. 3. Morte celular. 4. Sarcoma de mastócitos.
5. Via intrínseca. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado “Imunomarcção de proteínas relacionadas à apoptose em mastocitomas cutâneos caninos e seu valor como indicador prognóstico”, protocolado sob o nº 2893/2013, utilizando 100 (cem) cães, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Ricardo de Francisco Strefezzi (FZEA), está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da “Comissão de Ética no uso de animais” da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 13/3/2013.

São Paulo, 24 de fevereiro de 2015.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87
Cidade Universitária “Armando de Salles Oliveira”
São Paulo/ SP – Brasil
05508-270

Fone: + 55 11 3091-7671/7676/0904
Fax: + 55 11 3032-2224
E-mail: ceuavet@usp.br
<http://www.fmvz.usp.br>

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: BARRA, Camila Neri

Título: **Imunomarcção de proteínas relacionadas à apoptose em mastocitomas cutâneos caninos e seu valor como indicador prognóstico**

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 obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Dedico,

Aos Amparadores Extrafísicos, pela incansável assistência contribuindo em meu equilíbrio, reciclagens e superações.

À minha base, minha família nuclear: amados pais Ilson e Cristina, minhas queridas irmãs Bruna e Fernanda. Obrigada pelo exemplarismo, carinho, compreensão, apoio na minha evolução e pelo amor incondicional.

À Minha avó Geralda no auge dos seus 89 anos e demais familiares, obrigada pelo apoio.

Aos queridos Camilla, Juliana e sobrinho Frederico, cuja vida nos uniu para que pudéssemos caminhar juntos.

À Grande Família Conscienciológica, família evolutiva, por me mostrarem o que realmente significa evolução.

Ao Professor Waldo Vieira: nosso exemplo de evolução a ser seguido. Sou grata pelos milênios de dedicação, amor e ensinamentos.

À Equipe de voluntários da APEX: obrigada por me acompanharem nos meus primeiros passos, me ensinando a entender o verdadeiro sentido da vida. Em especial, Cláudia Adele, Jaime, Fabrício, Wildenilson Sinhorini, Caio Polizel, Vânia Hernandes e Milena Mascarenhas

Ao Professor Hernande Leite, pela recepção em Foz do Iguaçu, pelas energias de cura que me transmite pela assistência e atenção.

Ao Professor Alexandre Nonato, pelas orientações e contribuições nas minhas reciclagens.

À Equipe OIC e ECTOLAB e demais ICs pelo acolhimento e assistência

“Estudo, Eis tudo” Waldo Vieira.

Agradecimentos

Ao meu orientador Professor Dr. Ricardo de Francisco Strefezzi, exemplo de profissionalismo, liderança, caráter e ética a ser seguido. Minha gratidão pelo apoio, oportunidade, incentivo, dedicação, e principalmente por sua amizade e por acreditar no meu potencial. Sinto-me honrada de vincular seu nome junto a minha carreira profissional.

Ao meu namorado Matheus, meu exemplo de serenidade. Obrigada pelo carinho, compreensão e pela contribuição em minhas reciclagens.

Professor Dr. Heidge Fukumasu, pela indicação no grupo, co-orientação, confiança, amizade, ensinamentos, conselhos e reconhecimento.

Ao nosso GRUPO de pesquisa (carinhosamente, Strefezzet's + Thiago) por honrar o trabalho em equipe: Thiago, Greice e Karine, e nossas competentes ICs: Bruna, Jéssica, Isabela, Júlia e Marina, obrigada pelo carinho e apoio.

Em especial a amiga e colega de trabalho Lídia, pela dedicação, atenção e acima de tudo por sua amizade que irei guardar sempre comigo.

Agradeço a equipe do LOCT pelas contribuições, especialmente aos amigos Arina, Francisco e Pedro, e nosso técnico de laboratório Nilton, por toda colaboração e boas conversas.

Aos Professores e amigos do LMMD, em especial: Tiago de Bem, Aline, Naira, Ana Mançanares e Juliana Casals que me acompanharam desde o início dessa caminhada.

Às queridas amigas evolutivas: Yonara, Pâmela e Thayla que estão ao meu lado em todos os momentos desde o começo: obrigada pelo carinho, confiança e pelas contribuições nas minhas transformações. Não há distância que separe amizade como a de vocês.

Ao amigo Miguel pelo acolhimento em Pirassununga, e queridas amigas Patrícia das Neves, Carolina Costa, Vanessa Passos, Fernanda Altieri pelos bons momentos ao lado de vocês.

À equipe do HOVET da FZEA/USP pelas coletas e colaboração, em especial a Paula Rummy, Danielle Passarelli e Professor Sílvia.

Aos colaboradores, especialmente Professores Drs. José Luiz Catão-Dias, José Guilherme Xavier e Silvia Regina Kleeb, a Professora Adriana Nishiya do Hospital Veterinário da Faculdade Anhembi-Morumbi e equipe; Médico veterinário Fabrizio Grandi do Hospital Público ANCLIVEPA; Equipe PROVET; Médicos veterinários Carolina Gonçalves, Daniel Sanches.

Aos Professores e equipe do GMAB pela gentileza e acesso livre, especialmente ao Professor Dr. José Bento Ferraz pela cordialidade.

As amigas de São Paulo Mariane Silva, Juliana Cirillo, Jean e Leonardo por todo o apoio desde os primeiros dias de pós-graduação.

Ao Professor Dr. Arlindo Saran Neto, e amiga Priscilla Bustos Mac Lean pela primeira oportunidade acadêmica que me proporcionaram.

Aos queridos amigos da República Piramodis, República Hard Rocha, demais agregados: Mah, Frodo, Perna, Bia, Caio, Jú, Komixão, Léa, Felipe, Flavinho, Xibas, Begônia, Carlos, Karol Garga, Maria, Vivi. Em especial a minha amiga Nara. Com vocês, a vida de pós-graduação foi muito mais leve e divertida.

Aos animais utilizados no experimento. Sem vocês não teríamos pesquisa.

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ-USP) e Faculdade de Engenharia de Alimentos e Zootecnia (FZEA-USP) pela infra-estrutura possibilitando a realização desse projeto.

À CAPES e FAPESP pelo apoio financeiro que me proporcionaram.

RESUMO

BARRA, C. N. Imunomarcção de proteínas relacionadas à apoptose em mastocitomas cutâneos caninos e seu valor como indicador prognóstico.

[Immunostaining of apoptosis-related proteins in canine cutaneous mast cell tumors and its value as prognostic indicators]. 2015. 108 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

A desregulação da apoptose, principalmente da via mitocondrial, exerce papel na progressão tumoral, resistência à quimioterapia, além de favorecer a formação de metástases por permitir a sobrevivência de células tumorais na circulação e outros microambientes teciduais. No presente estudo, foram avaliados 58 mastocitomas cutâneos caninos, provenientes de 50 animais submetidos à cirurgia excisional como única forma de tratamento. Os tumores foram graduados de acordo com o sistemas de estabelecidos por Patnaik, Ehler e MacEwen (1984) e Kiupel et al. (2011). As expressões das proteínas relacionadas à via intrínseca da apoptose, BCL2, BAX, APAF1, Caspase 9 e Caspase 3, foram caracterizadas por meio de imuno-histoquímica. Os resultados obtidos das imunomarcações foram comparados às graduações histopatológicas, bem como à mortalidade em função do tumor e ao tempo de sobrevida pós-cirúrgico. Observamos maior expressão de BAX em mastocitomas de grau III, bem como menor expressão de BCL2 em tumores de alto grau. A detecção imuno-histoquímica de BAX foi considerada um indicador prognóstico para sobrevida e mortalidade em função da doença, enquanto que as de APAF1 e BCL2 adicionaram valor prognóstico às graduações histopatológicas melhorando a previsão da sobrevida pós-cirurgia.

Palavras-chave: Bcl-2. Imuno-histoquímica. Morte celular. Sarcoma de mastócitos. Via intrínseca.

ABSTRACT

BARRA, C. N.: Immunostaining of apoptosis-related proteins in canine cutaneous mast cell tumors and its value as prognostic indicators. [Imunomarcacão de proteínas relacionadas à apoptose em mastocitomas cutâneos caninos e seu valor como indicador prognóstico]. 2015. 108 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Deregulation of apoptosis, especially in the mitochondrial pathway, plays a role in tumor progression, resistance to chemotherapy, and favor the formation of metastases by allowing the survival of tumor cells in the blood stream and other tissue microenvironments. In the present study, we evaluated 58 canine cutaneous mast cell tumors, from 50 dogs, which were submitted to excisional surgery alone. The tumors were graded according to the systems proposed by Patnaik, Ehler and MacEwen (1984) and Kiupel et al. (2011). The expression of the apoptosis-related proteins BCL2, BAX, APAF1, caspase 9 and caspase 3 was characterized by immunohistochemistry. Immunohistochemical results were compared with the histopathological grades, mortality due to the tumor and post-surgical survival time. We observed increased expression of BAX in grade III mast cell tumors and lower expression of BCL2 in high-grade tumors. Immunohistochemical detection of BAX was considered an independent indicator of prognosis for survival and mortality due to the disease, whereas APAF1 and BCL2 added prognostic value to the histopathological grading systems improving the prediction of survival post surgery.

Keywords: Bcl-2. Cell death. Immunohistochemistry. Mastocytoma. Intrinsic pathway.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mecanismos de evasão da apoptose durante a carcinogênese	41
Figura 2 - Vias de ativação da apoptose: via intrínseca x via extrínseca	42
Figura 3 - Imunomarcação de BCL2 em mastocitoma cutâneo canino	59
Figura 4 - Imunomarcação de BAX em mastocitoma cutâneo canino	60
Figura 5 - Imunomarcação de APAF1 em mastocitoma cutâneo canino	61
Figura 6 - Imunomarcação de Caspase 9 em mastocitoma cutâneo canino	62
Figura 7 - Imunomarcação de Caspase 3 em mastocitoma cutâneo canino	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição dos casos analisados em função da graduação histopatológica e escores para expressão da proteína APAF1	64
Tabela 2 - Distribuição dos casos analisados em função da graduação histopatológica e escores para expressão da proteína Caspase 9.....	64
Tabela 3 - Distribuição dos casos analisados em função da graduação histopatológica e escores para expressão da proteína Caspase 3.....	65
Tabela 4 - Distribuição dos casos analisados em função da graduação histopatológica e escores para expressão da proteína BCL2.....	65
Tabela 5 - Distribuição dos casos analisados em função da graduação histopatológica e escores para expressão da proteína BAX.....	66
Tabela 6 - Distribuição das mortalidades relacionadas ou não aos MCTs e animais vivos ao final do estudo em função dos escores de expressão da proteína BCL2	66
Tabela 7 - Distribuição das mortalidades relacionadas ou não aos MCTs e animais vivos ao final do estudo em função dos escores de expressão da proteína APAF1	66
Tabela 8 - Distribuição das mortalidades relacionadas ou não aos MCTs e animais vivos ao final do estudo em função dos escores de expressão da proteína Caspase 9	67
Tabela 9 - Distribuição das mortalidades relacionadas ou não aos MCTs e animais vivos ao final do estudo em função dos escores de expressão da proteína Caspase 3	67
Tabela 10 - Distribuição das mortalidades relacionadas ou não aos MCTs e animais vivos ao final do estudo em função dos escores de expressão da proteína BAX	67
Tabela 11 - Resultados das análises de sobrevida pelo método de Kaplan-Meier em função dos escores de expressão das proteínas BCL2, BAX, APAF1, Caspase 9 e Caspase 3	68
Tabela 12 - Resultados da análise de sobrevida pelo modelo Proporcional de Cox, com modelo avaliando a graduação de Patnaik, Ehler e MacEwen (1984)	

associada às expressões de BCL2, BAX APAF1, Caspase 9 e Caspase 3.....70

Tabela 13 - Resultados da análise de sobrevida pelo modelo de Risco Proporcional de Cox avaliando a graduação de Kiupel et al. (2011) associadas às expressões de BCL2, BAX, APAF1, Caspase 9 e Caspase 3.....70

Gráfico 1 - Representação da relação da expressão de BAX e mortalidade em função do tumor e casos censurados (mortes não- relacionadas à neoplasia e animais vivos ao final do estudo).....68

Gráfico 2 - Curva de Sobrevida (Kaplan-Meier) dos pacientes estudados, em função da expressão imuno-histoquímica para BAX.....69

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1	MASTÓCITO	17
2.2	MASTOCITOMAS CANINOS	19
2.2.1	Incidência, Etiopatogenia	19
2.2.2	Comportamento Biológico, Apresentação Clínica e Sinais Clínicos	21
2.2.3	Diagnóstico	22
2.2.4	Fatores Prognósticos	23
2.2.4.1	Graduação Histopatológica	25
2.2.4.2	Marcadores de Proliferação	26
2.2.4.3	Oncogenes; Genes Supressão Tumoral e Genes Reguladores da Apoptose	28
2.2.5	Tratamento	31
2.2.5.1	Cirurgia	31
2.2.5.2	Radioterapia	32
2.2.5.3	Quimioterapia	33
2.2.5.3.1	<i>Inibidores de receptores tirosinoquinase</i>	36
2.3	APOPTOSE	37
2.3.1	Apoptose e câncer	39
2.3.2	Via Extrínseca	43
2.3.3	Via Intrínseca	43
3	OBJETIVOS	51
4	MATERIAS E MÉTODOS	52
4.1	ORIGEM DO MATERIAL E DADOS CLÍNICOS DOS ANIMAIS	52

4.2	PROCESSAMENTO HISTOPATOLÓGICO.....	52
4.3	GRADUAÇÃO HISTOPATOLÓGICA.....	53
4.4	PROCESSAMENTO IMUNO-HISTOQUÍMICO	53
4.5	AVALIAÇÃO DAS IMUNOMARCAÇÕES	55
4.6	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	56
5	RESULTADOS.....	57
5.2	AVALIAÇÃO DA POPULAÇÃO ESTUDADA.....	57
5.3	AVALIAÇÃO DAS MARCAÇÕES IMUNO-HISTOQUÍMICAS	58
6	DISCUSSÃO	71
6.1	MATERIAL OBTIDO	71
6.2	POPULAÇÃO ESTUDADA E CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS.....	71
6.3	ANÁLISES IMUNO-HISTOQUÍMICAS	73
6.3.1	Expressão BCL2	74
6.3.2	Expressão BAX.....	76
6.3.3	Expressão de APAF1	78
6.3.4	Expressão de Caspase 9 e Caspase 3	80
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	83
8	CONCLUSÕES	84
	REFERÊNCIAS.....	85

1 INTRODUÇÃO

Mastocitomas são as neoplasias cutâneas mais frequentes em cães, consideradas de difícil tratamento e prognóstico reservado a sombrio. Seu comportamento biológico é extremamente variável, podendo evoluir de forma lenta ou apresentar crescimento rápido e agressivo, com metastatização e altas taxas de recidiva.

O diagnóstico é realizado por meio da técnica de citologia, ou através do exame histopatológico, cuja avaliação permite graduação das lesões por dois sistemas de classificação distintos. A primeira graduação, proposta por Patnaik, Ehler e MacEwen (1984) é considerada controversa, pois se baseia em parâmetros subjetivos e ocasiona variações intra e interobservadores. Entretanto, essa classificação ainda é indispensável e utilizada rotineiramente, não tendo sido superada por nenhum outro indicador prognóstico. Várias tentativas de identificar marcadores prognósticos têm sido realizadas no intuito de contribuir no melhor entendimento dos mastocitomas. Entre elas, destacam-se avaliações de proliferação celular e expressão imuno-histoquímica da oncoproteína KIT.

Sabe-se que a morte celular por apoptose também possui grande importância no desenvolvimento tumoral, bem como na resistência às tradicionais terapias antineoplásicas, tornando-se tema indispensável na pesquisa do câncer. Esse processo é controlado por diversos genes e contribui nos processos de morfogênese, manutenção da homeostasia dos tecidos e remoção de células senescentes ou que sofreram alguma mutação.

Diversos genes regulam o mecanismo apoptótico, incluindo os membros da família BCL2 compostos por dois grupos opostos de proteínas: um promove a sobrevivência da célula, análogos à BCL2; e o outro promove a morte celular, semelhantes à proteína BAX. O equilíbrio relativo entre estas diferentes proteínas, refletindo a formação de homodímeros e heterodímeros (neutralização), define o destino celular. Na presença de sinal apoptótico, BAX é translocada do citoplasma para membrana mitocondrial, sendo ativada e levando a liberação de citocromo C. Este, irá se ligar a APAF1 formando um complexo proteico multimérico conhecido

como apoptossomo, o qual contém na sua porção N-terminal um domínio de recrutamento de caspases, responsável pela interação com o pré-domínio da caspase 9 que irá resultar em ativação das mesmas. Por sua vez, a caspase 9 ativada interage com caspases efetoras, em particular a caspase 3, culminando em transformações bioquímicas e morfológicas que caracterizam a morte da célula por apoptose.

No câncer, a desregulação desse mecanismo é frequente favorecendo a tumorigênese, malignidade tumoral e a formação de metástases por permitir a sobrevivência de células neoplásicas na circulação e em outros microambientes. Pela importância da apoptose na progressão do câncer e na morte celular induzida por quimioterapia, o estudo de proteínas associadas à via intrínseca pode ser fundamental no entendimento e prognóstico de neoplasias.

Diante disso, o presente estudo teve como objetivo investigar as proteínas participantes da via intrínseca da apoptose, e elucidar seu possível papel como potenciais marcadores prognósticos e preditivos em mastocitomas cutâneos caninos

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 MASTÓCITO

O primeiro pesquisador a descrever células denominadas mastócitos foi Paul Erlich em 1877. Inicialmente os mastócitos foram chamados de “mastzellen” por sua aparência “bem nutrida” originado da palavra alemã “mast” que significa comida. Paul Erlich observou que essas células possuíam citoplasma abundante com propriedades tintoriais únicas de metacromasia devido à afinidade a corantes catiônicos (CRIVELLATO et al., 2003). Contudo, a descoberta do primeiro mastócito canino foi em 1905 por Bashford, entretanto o termo mastocitoma foi referido pela primeira vez por Bloom em 1952 (CRIVELLATO et al., 2003).

Mastócitos são células multifuncionais, pleomórficas à avaliação histológica: esféricas, estreladas ou fusiformes. Medem de 20 a 30 μm e possuem núcleo pequeno, centralizado e esférico (SAMUELSON, 2007). Podem ser identificados pela técnica de imuno-histoquímica para o receptor KIT e a enzima triptase (WALLS et al., 1990). Seu conteúdo citoplasmático é basofílico granular e assume uma tonalidade violeta quando corado com corantes do tipo Romanowsky ou Azul de Toluidina.

São capazes de secretar uma grande variedade de grânulos (O'KEFFE, 1990; CROSS; MERCER, 1993; GOLDSCHMIDT; HENDRICK, 2002). Os grânulos são compostos por mediadores inflamatórios, tais como aminas bioativas (histamina e serotonina), proteases, citocinas, interleucinas e metabólitos do ácido araquidônico fundamentais nas reações imunológicas, inflamatórias e alérgicas (METCALFE; BARAM; MEKORI, 1997; LONDON; SEGUIN, 2003).

São provenientes de células progenitoras hematopoiéticas originárias da medula óssea CD34^+ , CD13^+ , CD117^+ , liberadas na corrente sanguínea imaturas, as quais migram para os tecidos onde os quais irão residir. Nos tecidos elas sofrem maturação e diferenciação final de acordo com seu microambiente (PAYNE; KAM, 2004; WELLE et al., 2008). Os eventos de maturação e diferenciação ocorrem através da estimulação por fatores de crescimento, que se ligam em receptores

específicos e desencadeiam cascatas de ativação, vias bioquímicas e vias moleculares intracelulares.

Os mastócitos possuem um importante receptor de crescimento, do tipo tirosinoquinase expresso em sua membrana. Denominado como receptor c-Kit, CD117 ou KIT, o qual possui um domínio de ligação extracelular, uma porção transmembrânica e uma região na extremidade do citoplasma com atividade tirosinoquinase (MEININGER et al., 1992; KRISHNASWANY; AJITAWI; CHI, 2006). Esse receptor é ativado através de sua ligação com o fator de crescimento de mastócitos ou “*stem cell factor*” (SCF), uma importante citocina regulatória produzida por células endoteliais, epiteliais e fibroblastos. SCF atua em sincronia com demais citocinas contribuindo no processo de crescimento, diferenciação, maturação, proliferação e desgranulação dos mastócitos (ZESBO et al., 1990; VOYTYUK et al., 2003; KITAMURA; HIROTAB, 2004; WELLE et al., 2008; TAKEUCHI et al., 2013).

Quando diferenciados e maduros, os mastócitos são encontrados como componentes do tecido conjuntivo, sendo em maiores quantidades na camada da derme, regiões perivasculares, mucosa do trato gastrointestinal e pulmões (PAYNE; KAM, 2004; WELLE et al., 2008). Desempenham funções em mecanismos de defesa celular, defesa humoral e imunológica, atuando tanto em respostas inatas, quanto em respostas adquiridas. Além disso, os mastócitos possuem relação com a coagulação sanguínea (LONDON; SEGUIM, 2003).

Em humanos, a desordem proliferativa de mastócitos é conhecida como mastocitose, cuja patogenia baseia-se na proliferação de mastócitos não-neoplásicos podendo se manifestar de forma sistêmica ou cutânea. Na espécie canina as principais disfunções ocasionadas por mastócitos são as reações de hipersensibilidade tipo I local e sistêmica além dos mastocitomas, os quais são considerados uma das principais neoplasias caninas (SCOTT; MILLER; GRIFFIN, 1996; TIZARD, 1998). Outra forma de manifestação da doença em cães são os mastocitomas viscerais, cuja apresentação pode ser de forma disseminada ou sistêmica (mastocitose sistêmica) e na maioria dos casos são precedidos por um tumor cutâneo primário (LEMARIE; LEMARIE; HEDLUND, 1995; THAMM; VAIL, 2007).

2.2 MASTOCITOMAS CANINOS

2.2.1 Incidência, Etiopatogenia

Mastocitomas cutâneos caninos (MCTs) ou sarcomas de mastócitos são neoplasias de células redondas mais frequentes em cães. Representam entre 16 a 21% de todas as neoplasias pele em cães e 11 a 27% das neoplasias malignas (MISDORP, 2004). Acometem principalmente derme e tecido subcutâneo e sua localização e aparência macroscópica podem ser apresentadas de formas distintas, dificultando ou impossibilitando especulações sobre seu comportamento biológico quando fundamentado apenas nessas características clínicas (LONDON; SEGUIN, 2003; STREFEZZI et al., 2003).

Strefezzi (2009) observou que as localizações de maior incidência das lesões são extremidades/membros, tórax, região inguinal/perineal, abdômen e cabeça/pescoço, entretanto não existe correlação da localização da lesão com pior prognóstico. Ocasionalmente podem aparecer em locais extracutâneos como: cavidade oral, trato gastrointestinal, uretra, medula espinhal (THAMM; VAIL, 2007). No entanto, dados apontam que aproximadamente 50% dos casos de MCTs estão localizados no tronco e região perineal; 40% em extremidades; e cerca de 10% em região de cabeça e pescoço (PATNAIK; EHLER; MACEWEN, 1984; MACY, 1985; O'KEEFE, 1990; SIMÕES; SCHONING; BUTINE, 1994; DOBSON; SCASE, 2007; WELLE et al., 2008). A localização da lesão não está correlacionada com prognóstico, nem mesmo sugere o comportamento do tumor. Apesar disso, Turrel et al. (1988) observou que tumores localizados em extremidades, os quais foram removidos cirurgicamente responderam melhor ao tratamento radioterápico do que tumores localizados no tronco.

De etiologia desconhecida, acredita-se que a causa do surgimento de tumores de mastócitos seja multifatorial, porém ainda não elucidada. Alguns autores relatam a hipótese dos MCTs estarem associados à inflamação crônica e/ou irritações na pele (LOMBARD; MOLONEY, 1959; THAMM; VAIL, 2007). Outros estudos apontam a possibilidade de uma etiopatogênese viral, que foi testada

através de ensaios *in vitro* com extratos de tumores sólidos, porém nenhum achado epidemiológico confirma esse tipo de transmissão (LOMBARD; MONOLEY, 1959).

Sugere-se que o surgimento dessa neoplasia possa estar associado a mutações genéticas hereditárias. Essa hipótese tem sido observada principalmente na raça Boxer, para a qual já foram identificados sítios de instabilidade cromossômica no cromossomo X tornando-a a raça mais predisposta (MISDORP, 1996). Entretanto, apesar de alguns autores relatarem que animais da raça Boxer representam 50% dos animais acometidos, eles desenvolvem tumores de prognóstico mais favorável com a graduação histológica mais baixa (BOSTOCK, 1986). Outras alterações genéticas estão associadas ao surgimento do mastocitoma, dentre elas destaca-se alterações no gene *MDM2* relacionado à tumorigênese, além do gene *KIT* já bem descrito na literatura (KIUPEL et al., 2004; WU; HAYASH; INOUE, 2006).

Apesar das pesquisas demonstrarem que animais da raça Boxer apresentam uma maior predisposição para o surgimento dos MCTs, raças descendentes de Bulldog como Buldogue Inglês, Pug, Boston Terrier, além de outras raças, como Beagle, Schnauzer, Weimaraner, Shar Pei, Labrador, Golden Retriever, Poodle, Cocker Spaniel e animais sem raça definida também são acometidos (PATNAIK; EHLE; MACEWEN, 1984; O'KEEFE, 2003; WHITE et al., 2011).

White et al. (2011) observaram que em animais castrados, independente do gênero, possuem maior risco do surgimento do tumor, no entanto por motivo desconhecido. No estudo de Hart et al. (2014) relataram maior incidência de cânceres como MCTs, limfossarcomas e hemangiossarcomas nas raças Golden Retriever e Labrador Retriever quando comparados a animais não castrados. A maior incidência foi registrada particularmente em fêmeas da raça Golden Retriever, sendo associada a hormônios gonadais.

Os mastocitomas cutâneos caninos afetam preferencialmente animais idosos com média de idade entre 7,5 e 9 anos, e o aumento da idade do animal pode ampliar o risco de incidência do tumor (BLACKWOOD et al., 2012). Apesar disso, alguns trabalhos descrevem a incidência desses tumores em animais jovens com idade entre três a sete anos de idade (PATNAIK; EHLE; MACEWEN, 1984; DAVIS et al., 1992; MULLINS et al., 2006).

2.2.2 Comportamento Biológico, Apresentação Clínica e Sinais Clínicos

Considerados tumores de comportamento clínico variável, os MCTs podem manifestar a doença de forma heterogênea dependendo do estadiamento e graduação tumoral (ROGERS, 1996). Cerca de 50% deles são agressivos podendo levar a recidiva e metástase em 80% dos casos (MACY, 1985; O'KEEFE, 1990; SIMOES et al., 1994).

A maioria das metástases ocorre primeiramente em linfonodos regionais, seguido por baço (46%), fígado (41%) e demais vísceras. Entretanto o aparecimento de metástase em pulmão é um achado raro. Alguns autores relatam que a incidência de metástase em linfonodos regionais estava presente em 76% dos cães afetados (HOTTENDORF; NIELSEN, 1968). Séguin et al. (2006) observaram a presença de metástase em linfonodos regionais em 45% dos casos de MCTs de grau II submetidos a ressecção cirúrgica incompleta. Estudos demonstram taxas de recidiva tumoral de 3,5%, 17% e 38% com tempo médio de quatro meses após a ressecção cirúrgica e morte associada ao tumor atinge taxas de 46% (LARSSON, 1957; NIELSEN, 1958; BOSTOK, 1973).

Clinicamente os MCTs surgem como massas cutâneas únicas ou múltiplas, circunscritas ou não, que podem mimetizar e ser confundidos com qualquer outro tumor de pele, ou com outras lesões tais como: crostas, abscessos, pápulas, máculas e nódulos (SCOTT et al., 2001). Essas massas podem crescer lenta ou rapidamente, e possuir consistência macia ou firme. Podem apresentar bases sésseis ou pedunculadas, e também variações quanto a ulceração, pigmentação, presença de edema e alopecia. Tal subjetividade na apresentação clínica justifica a importância de ferramentas diagnósticas mais precisas que auxiliem no diagnóstico definitivo (BOSTOCK, 1986; THAMM; VAIL, 2007).

Importantes sinais clínicos estão associados à desgranulação dessas células, com a liberação do conteúdo de seus grânulos de heparina, histamina e enzimas proteolíticas. A desgranulação pode acontecer espontaneamente, ou por manipulação excessiva do tumor no momento da citologia ou cirurgia. Os grânulos citoplasmáticos liberados podem ocasionar dificuldade de coagulação sanguínea e retardo no processo de cicatrização pela ação anticoagulante da heparina; úlceras gástricas, em função da ação da histamina, que estimula maior secreção de ácido

clorídrico; ou ainda em função desta última e demais substâncias vasoativas, grave hipotensão arterial e choque, com grande risco de óbito (FOX et al., 1990; BLACKWOOD et al., 2012).

2.2.3 Diagnóstico

O principal exame de triagem eleito pelo clínico para diagnóstico dos mastocitomas é o exame citológico, o qual é realizado antes da cirurgia. A citologia é considerada um método simples, de baixo custo, cuja técnica eleição é a Punção Aspirativa por Agulha Fina (PAAF) (GOVIER, 2003). Essa técnica possui uma taxa de acerto em 92 a 96% dos diagnósticos (THAMM; VAIL, 2007).

Citologicamente, os MCTs são formados por população de células redondas com núcleos ovoides ou redondos, citoplasma repleto de grânulos. Estes são mais fáceis de ser visualizados quando impregnados por corantes do tipo Romanowsky ou azul de metileno, mas podem dificultar a visualização do núcleo quando em grande quantidade (MACY, 1985; WELLE et al., 2008). A graduação tumoral pode ser feita na citologia conforme Strefezzi et al. (2003), por meio da técnica de morfometria nuclear.

A citologia dos linfonodos regionais é preconizada para avaliação de metástases. Contudo, pela população de mastócitos residentes no linfonodo normal, o diagnóstico de doença metastática só é considerado como positivo caso o aspirado do linfonodo apresente mais de 3% de células de mastócitos na população (DOBSON; SCASE, 2007).

Embora a citologia aspirativa seja um ótimo método pra diagnóstico dos mastocitomas, o exame histopatológico é indispensável, pois permite a graduação tumoral, ainda considerada como imprescindível no direcionamento do tratamento. As biópsias incisional ou excisional permitem também a avaliação de margens, tornando o diagnóstico mais apurado (BLACKWOOD et al., 2012).

2.2.4 Fatores Prognósticos

Devido à complexidade dos mastocitomas cutâneos caninos e à frequência de insucessos nos tratamentos, várias tentativas de identificar indicadores prognósticos que melhor previssem o comportamento biológico do tumor foram realizadas, com destaque para avaliações de proliferação celular (BOSTOCK et al., 1989; SIMOES et al., 1994; KRAVIS et al., 1996; ABADIE et al., 1999; ROMANSIK et al., 2007; STREFEZZI et al., 2010; KIUPEL et al., 2011) e da presença e localização do oncogene CD117/KIT (KIUPEL et al., 2004; WEBSTER et al., 2007).

Outros métodos também foram descritos como análise de parâmetros clínicos (BOSTOCK, 1973; O'KEEFE, 1990; ROGERS, 1996; LONDON; SEGUIN, 2006; KIUPEL et al., 2005), imunomarcacão de TP53 (GINN et al., 2000; JAFFE et al., 2000; WU et al., 2006), expressão de reguladores do ciclo celular, como p21 (CDKN1A) e p27 (CDKN1B) (OZAKI et al., 2007), proteínas relacionadas à apoptose como BAX e BCL2 (LEITE et al., 2009; STREFEZZI et al., 2009; STREFEZZI et al., 2012); quantificação da angiogênese tumoral (PREZIOSI et al., 2004); e morfometria nuclear computadorizada (STREFEZZI et al., 2003; MAIOLINO et al., 2005; STREFEZZI et al., 2009a).

No âmbito de parâmetros clínicos, a localização da massa, sexo, idade, raça, presença de nódulos múltiplos, aparência macroscópica, tamanho da lesão e taxa de crescimento já foram descritas como possíveis indicadores prognósticos. Entretanto, nenhum dos parâmetros se revelou eficiente isoladamente e atuam em conjunto para melhores resultados (STREFEZZI et al., 2009b). De acordo com Gieger et al. (2003) e Kiupel et al. (2005) tumores localizados no focinho tendem a ser mais agressivos e com maiores taxas metastáticas do que tumores localizados nas demais regiões. Em adição MCTs em região inguinal, lesões prepucial e perineal geralmente se apresentam como formas de maior malignidade, entretanto esses relatos são achados clínicos sem comprovação científica (DEAN, 1988; MISDORP, 2004).

Além dos parâmetros clínicos, o sistema de estadiamento exerce papel classificando a doença em função da lesão em associação ao grau histopatológico e auxilia no direcionamento do tratamento da neoplasia (STREFEZZI et al., 2009b). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), o estadiamento de

mastocitomas foi dividido em estádios I, II, III, IV e V, considerando como parâmetro características macroscópicas da lesão, quantidade de nódulos, comprometimento de tecidos adjacentes, sinais locais e sistêmicos, envolvimento dos linfonodos e metástase à distância (MURPHY et al., 2006; DOBSON; SCASE, 2007). Contudo, estudos afirmam que o sistema de estadiamento estabelecido pela OMS não teve uma boa correlação com prognóstico, sendo necessária uma nova classificação revista em consenso, a qual determinou somente quatro formas de estadio clínico (BLACKWOOD et al., 2012).

Ayl et al. (1992) observaram a presença de aneuploidia, e verificou que mais de 70% dos MCTs eram diploides. Entretanto, esse achado não foi estatisticamente significativo quando correlacionado com grau histológico, estadiamento clínico e localização do tumor, não sendo um fator prognóstico de alto impacto para esse tipo de neoplasia.

Vários estudos vêm investigando a angiogênese tumoral principalmente pelo seu valor na nutrição e manutenção do tumor, além de ser o principal acesso na disseminação de metástases. Na oncologia humana estudos entre alta densidade microvascular intratumoral correlacionado com agressividade, metástase e diminuição da sobrevida de pacientes tiveram destaques em vários tipos de neoplasias (WEIDNER, 1995; FOX, 1997). Em mastocitomas o aumento da densidade microvascular contribui na recorrência tumoral e aumento mortalidade (PREZIOSI; SARLI; PALTRINIERI, 2004).

A morfometria nuclear é considerada uma técnica rápida e fácil, e em combinação com a citologia se obtém medidas de área, diâmetro e perímetro nuclear através de captação de imagens computadorizada. Em mastocitomas, tal ferramenta auxilia no diagnóstico e graduação do tumor, minimizando a subjetividade intra e interobservador (STREFEZZI; XAVIER; CATÃO-DIAS, 2003). Além disso, dados apontam que a morfometria nuclear pode prever o comportamento biológico dos MCTs de forma independente, tornando-se um método útil para oncologia veterinária (STREFEZZI et al., 2009a).

2.2.4.1 Graduação Histopatológica

A graduação histopatológica é um importante método diagnóstico e valioso indicador prognóstico, pois indica o tempo de sobrevida. Patnaik, Ehler e MacEwen (1984) estabeleceram um sistema de graduação que se difundiu e é amplamente utilizado até nos dias de hoje. Nesse sistema os mastocitomas são histologicamente classificados em três graus de malignidade descritos a seguir:

- Mastocitomas de grau I: são considerados como massas circunscritas, confinados à derme com as células arranjadas em fileiras ou grupos de mastócitos monomórficos bem diferenciados, com núcleo arredondado, cromatina condensada, citoplasma amplo e ausência de figuras mitose;
- Mastocitomas de grau II: são neoplasias moderada a altamente celulares, com células moderadamente pleomórficas arranjadas em grupos e citoplasma distinto com grânulos finos, variando a granulação grosseira e hipercromática. As células podem se infiltrar tanto na derme, quanto no tecido subcutâneo, ocasionalmente se estendendo até a camada muscular e tecidos adjacentes. Os núcleos podem ser redondos e indentados, com cromatina difusa e núcleo único, podendo ser encontradas de 0 a 2 figuras de mitose por campo;
- Mastocitomas de grau III: são altamente celulares e compostos por mastócitos pleomórficos de tamanho médio, com poucos grânulos citoplasmáticos ou ausentes. Arranjados em grupos compactos que se estendem invadindo tecido subcutâneo e tecidos mais profundos. As células neoplásicas contêm um ou mais nucléolos proeminentes e podem ser encontradas de 3 a 6 figuras de mitose por campo.

Thamm e Vail (2001) afirmam que o grau histológico é considerado um critério importante na terapia a ser indicada para o animal com mastocitoma cutâneo, e rotineiramente é recomendada a quimioterapia para animais com mastocitomas de grau III. Entretanto, vários autores consideram que este método de classificação provoca variações consideráveis intraobservador e interobservadores, principalmente em se tratando de mastocitomas de grau II, sendo assim um método subjetivo (STREFEZZI et al., 2003; KIUPEL et al., 2005; MAIOLINO et al., 2005; PINCZOWSKI et al., 2008).

Devido a essas variações e subjetividade do método de graduação em três graus, Kiupel et al. (2011) propuseram uma nova classificação dividindo os mastocitomas em dois graus, excluindo o grau intermediário na intenção de melhorar a concordância entre os patologistas. São considerados de alto grau os mastocitomas que apresentam quaisquer das seguintes características: cariomegalia em no mínimo 10% das células neoplásicas; pelo menos 7 figuras de mitose em 10 campos à objetiva de 40 aumentos; pelo menos 3 núcleos bizarros em 10 campos à objetiva de 40 aumentos; pelo menos 3 células multinucleadas, em 10 campos à objetiva de 40 aumentos (KIUPEL et al., 2011).

Recentemente Sabattini et al. (2015) compararam os dois sistemas de graduação, comprovando que o sistema de graduação em dois graus tem um valor prognóstico superior que o sistema de classificação em três graus. Contudo, o estudo demonstra que a graduação histológica isolada não permite prever o comportamento biológico tumoral, havendo a necessidade de análises moleculares complementares a fim de um prognóstico mais preciso.

2.2.4.2 Marcadores de Proliferação

Uma característica imprescindível das células do câncer é a capacidade de proliferação descontrolada. Nesse contexto, medidas de mensuração da proliferação celular têm sido estudadas no intuito de prever o comportamento do tumor, dentre elas: avaliação da atividade proliferativa, por meio de contagem de mitoses (ROMANSIK et al., 2007; WELLE et al., 2008) e marcações histo e imuno-histoquímicas como: avaliação da frequência de regiões organizadoras de nucléolo argirófilas (AgNORs) (BOSTOCK et al., 1989; SIMOES et al., 1994; KRAVIS et al., 1996); contagem de células positivas para o Antígeno Nuclear de Proliferação Celular (PCNA) (SIMOES et al., 1994; ABADIE et al., 1999; STREFEZZI et al., 2010) e porcentagem de células positivas para Ki-67 (ABADIE et al., 1999; SAKAI et al., 2002; STREFEZZI et al., 2010).

O índice mitótico (IM), ou contagem de figuras de mitose por campo, é uma ferramenta importante na avaliação da atividade proliferativa da neoplasia expresso

em porcentagem, além de ser considerada uma técnica simples, pois não exige métodos histoquímicos especiais (QUINN; WRIGHT, 1990; ROMANSIK et al., 2007). Alguns trabalhos demonstraram a correlação do índice mitótico com tempo de sobrevida, graduação estabelecida por Patnaik, Ehler e Macewen (1984) e taxa de metástase (PREZIOZI et al., 2007; ROMANSIK et al., 2007). No estudo de Vascellari et al. (2013) o IM foi associado com sobrevivência, com animais que possuíam tumores com índice mitótico maior que 5 apresentando menor tempo de sobrevida e maior taxa de mortalidade. Entretanto, utilizando a classificação em dois graus estabelecida por Kiupel et al. (2011) são considerados tumores de alto grau aqueles que apresentam como ponto de corte acima de 7 figuras de mitose.

As regiões organizadoras de nucléolo argirófilas (AgNORs) são regiões do núcleo associadas a proteínas tais como a nucleonina e a nucleoplasmina, que estão envolvidas na transcrição do RNA ribossomal, amplamente usadas como marcadores da cinética e atividade metabólica tumoral. Essas áreas nucleares se ligam a moléculas de prata de corantes especiais viabilizando sua detecção através de microscópio de luz (DERENZI, 2000). A quantidade de AgNORs indica atividade proliferativa celular e mantém relação com velocidade do ciclo celular (QUINN; WRIGHT, 1990; MELO; ALVES, 1999).

A marcação de células positivas para PCNA é uma outra possibilidade para avaliar proliferação celular. O Antígeno Nuclear de Proliferação Celular é uma subunidade auxiliar da DNA delta polimerase e participa de vários eventos nucleares, dentre eles o reparo do DNA (BRAVO et al., 1987; PRELICH et al., 1987; MAGA; HUBSCHER, 2003). É uma proteína não-histona necessária à síntese e reparo do DNA, ausente na fase G1 e atingindo sua expressão máxima na fase S do ciclo celular (MADEWELL, 2001). Em mastocitomas cutâneos caninos, a expressão de PCNA não foi um bom indicador prognóstico (SIMOES; SCHONING, 1994; ABADIE; AMARDEILH; DELVERDIER, 1999; SCASE et al., 2006; WEBSTER et al., 2007). Em adição, Blackwood et al. (2012) investigaram a expressão de PCNA em MCTs e constataram que sua expressão é significativamente mais alta em tumores recorrentes do que em tumores que não sofreram recorrência. O mesmo resultado foi observado quanto à presença de tumores metastáticos quando comparados aos não metastáticos. Entretanto, o aumento da expressão de PCNA não é independente do grau histopatológico, nem mesmo um achado preditivo para o

tempo de sobrevida (SIMOES; SCHONIN; BUTINE, 1994; ABADIE; AMARDEILH; DELVERDIER, 1999; SCASE et al., 2006).

O Ki67 é uma proteína nuclear expressa durante a divisão celular, em todas as fases do ciclo, porém ausente em células em G0. Determina-se o índice de proliferação através da porcentagem de células positivas marcadas, ou seja, células em atividade no ciclo celular (GERDES; LEMKE; BAISCH, 1984; SCHOLZEN; MUKARATIRWA et al., 2003). Vários trabalhos relatam a alta expressão de Ki67 como um importante indicador prognóstico em diversos tumores caninos, tais como mastocitomas, melanomas orais, tumores estromais gastrointestinais, tumores mamários e tumores de glândula perianal (BERGIN et al., 2011; GILLESPIE et al., 2011; KADTHUR et al., 2011; SANTOS et al., 2013; PEREIRA et al., 2013). Corroborando com esses dados, Strefezzi et al. (2010) demonstraram que animais que apresentaram menos de 7% de células marcadas pra Ki67 alcançaram uma maior taxa de sobrevida do que animais que tiveram uma taxa maior que 7% de células positivas. Em adição, o aumento da marcação de Ki67 em MCTs foi associada a um aumento da mortalidade, taxa de recorrência local e metástase (ABADIE; AMARDEILH; DELVERDIER, 1999; SCASE et al., 2006; WEBSTER et al., 2007) podendo ser usado como um fator prognóstico preciso em mastocitomas caninos independente do grau histológico (VASCELLARI et al., 2013).

2.2.4.3 Oncogenes; Genes Supressão Tumoral e Genes Reguladores da Apoptose

Conhecidos como genes com potencial de causar o câncer, os oncogenes são genes derivados de proto-oncogenes, os quais em condições normais exercem papel na diferenciação e proliferação celular. Diversos proto-oncogenes vem sendo investigados na pesquisa do câncer, dentre eles o c-kit que desempenha um papel importante no surgimento dos mastocitomas caninos. O proto-oncogene KIT, c-kit ou CD117 foi descrito pela primeira vez em 1987 como um homólogo do oncogene v-kit do vírus de sarcoma felino HZ4, o qual induz fibrossarcoma multicêntrico em gatos (BESMER et al., 1986; YARDEN et al., 1987). KIT é um receptor transmembrânico tirosina quinase, codificado pelo gene KIT, encontrado em células

hematopoiéticas, células germinativas, melanócitos e mastócitos. Exerce como principal função a interação com fatores de crescimento, tais como fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e “*stem cell factor*” (SCF) (BESMER et al., 1986; BROUDY, 1997). A ligação do ligante SCF com o receptor c-kit desencadeia uma série de reações e vias intracelulares ocasionando migração, maturação, proliferação de células troncas hematopoiéticas, melanócitos e mastócitos e células germinativas (QUI et al., 1988; ZESBO et al., 1990; GALLI; ZSEBO; GEISSLER, 1994).

Aberrações no receptor KIT são relatadas como mutações, deleções, duplicações, e já foram caracterizadas e descritas em neoplasias de humano como tumores estromais gastrointestinais, mastocitose, leucemia de mastócitos e em cães como tumores mastocitomas (LONDON et al., 2009; KIM et al., 2012). Uma das principais mutações do receptor KIT acontece como duplicação tandem no exon 11 levando a ativação constitutiva do receptor, independente da interação com seu ligante, resultando na proliferação descontrolada de mastócitos e progressão tumoral (ROSKOSKI, 2005; WELLE et al., 2008; KARYADI et al., 2013).

Kiupel et al. (2004) comprovaram pela técnica de imuno-histoquímica que MCTs os quais apresentaram um padrão de marcação perimembranoso não foram associados com redução no tempo de sobrevida e nem com a recorrência tumoral. Entretanto, o padrão de marcação citoplasmático foi correlacionado com a diminuição no tempo de sobrevida, e maiores taxas de recorrência.

De acordo com Webster et al. (2006a), tumores de mastócitos que sofreram mutação no receptor KIT tinham um grau histológico mais alto, sendo, portanto, mais agressivos e por consequência com pior prognóstico. Em um estudo posterior, Webster et al. (2006b) demonstraram por imuno-histoquímica em tumores de mastócitos a associação entre expressão citoplasmática aberrante de KIT e proliferação celular, com o aumento da recorrência do tumor e diminuição da sobrevida.

Casagrande et al. (2013) não encontraram relação entre os padrões de marcação do KIT por imuno-histoquímica e a expressão gênica determinada por PCR quantitativo com a taxa de morte associada ao tumor e recorrência. Entretanto detectaram relação entre o padrão KIT aberrante e a proliferação celular.

O MDM2 é um proto-oncogene cuja oncoproteína regula negativamente a ação de TP53, diminuindo sua atividade independente de mutação na própria TP53.

Em MCTs MDM2 foi hiperexpressa em tumores de grau III quando comparados a tumores bem diferenciados, sendo que somente 12,8% desses tumores também expressavam TP53, sugerindo que a hiperexpressão de MDM2 pode ocorrer independentemente da mutação TP53 (WU; HAYASHI; INOUE, 2006).

TP53 é o mais conhecido gene supressor tumoral. Seu produto tem como função o controle do ciclo celular por meio do bloqueio do mesmo em pontos de detecção onde houve dano do DNA e instabilidade genômica, levando à ativação de genes de reparo de DNA ou induzindo a apoptose quando este reparo não for possível. Alterações na expressão e mutações nesse gene já foram descritas em diversas neoplasias, estando presentes em mais de 50% dos cânceres humanos. Avery-Kieida et al. (2011) reportaram que alguns alvos de TP53, envolvidos na apoptose e regulação do ciclo celular, são expressos de forma aberrante em células de melanoma, contribuindo para proliferação dessas células. Em adição, verificou-se que quando o gene mutante é silenciado ou tem sua expressão reduzida, há diminuição do crescimento celular em colônias de células cancerosas de humanos (VIKHANSKAYA et al., 2007). Em mastocitomas caninos, apesar da sua associação com maior grau tumoral, a expressão imuno-histoquímica de TP53 não demonstrou ter valor prognóstico em relação ao tempo livre da doença e tempo de sobrevida do animal (JAFFE et al., 2000).

Vascellari et al. (2013) investigaram em MCTs a expressão gênica e proteica de BCL2, um dos principais membros anti-apoptóticos da família Bcl-2, e de COX2, da enzima cicloxigenase, responsável por catalisar e fazer a conversão do ácido araquidônico em prostaglandina G2. COX2 contribui para o desenvolvimento da neoplasia inibindo a apoptose, transformando pró-carcinógenos em carcinógenos, promovendo a angiogênese tumoral e aumentando a motilidade e capacidade de invasão de células neoplásicas. Os níveis de RNAm de BCL2 estavam significativamente mais elevados em tumores de grau II e grau III quando comparados aos tumores de grau I, e relacionados à menor sobrevida nesses animais. Já os níveis de RNAm de COX2 só foram mais elevados em MCTs quando comparados à pele normal, e não tiveram relação o grau histopatológico, nem mesmo com a sobrevida dos animais. A expressão proteica de BCL2 não foi correlacionada com a graduação histopatológica de MCTs, o mesmo ocorrendo com COX2, apesar de a mesma ter sido detectada em 78% dos casos.

2.2.5 Tratamento

O tratamento para mastocitomas depende de fatores como o quadro geral do animal, estadió clínico, localização da lesão e graduação tumoral. Além disso, entender a biologia do tumor e fazer uso de ferramentas prognósticas são essenciais para o direcionamento do tratamento. Atualmente as terapias disponíveis mais indicadas para MCTs incluem a cirurgia, quimioterapia, inibidores de tirosinoquinase e radioterapia (WELLE et al., 2008; BLACKWOOD et al., 2012).

2.2.5.1 Cirurgia

A cirurgia é o tratamento de eleição para MCTs localizados e não metastáticos, independente do grau tumoral. Ela é realizada com amplas margens cirúrgicas, de aproximadamente 3 cm em todas as direções, incluindo margem profunda, da qual deve-se remover a fáscia muscular principalmente em tumores de grau III e em animais com acometimento metastático (GOVIER, 2003; THAMM; VAIL, 2007). Entretanto alguns autores preconizam retirada de margens cirúrgicas de 2 cm para casos de tumores de grau I e grau II (SEGUIN et al., 2001; SIMPSON et al., 2004; FULCHER et al., 2006).

Schultheiss et al. (2011) não observaram recidiva local em animais com tumores de baixo grau I e II que mediam de 2 a 3 cm, utilizando margens laterais mínimas de 1 cm e profundas de 4 mm. Além disso, as taxas de recidiva e metástase foram de apenas 5 a 11% e 5 a 22%, respectivamente (CHAFFIN; THRALL, 2002; SFILIGOI et al., 2005; FULCHER et al., 2006; MULLINS et al., 2006; SEGUIN et al., 2006). Contudo, nos MCTs de grau III submetidos à remoção cirúrgica com margens de 3 cm, o risco de recorrência local e metástase é alto, sendo necessário uma outra modalidade terapêutica (THAMM; VAIL, 2007).

A avaliação histológica das margens cirúrgicas também é considerada importante para o direcionamento do tratamento adjuvante. Dependendo da sua classificação e grau de comprometimento faz-se necessário o aprofundamento da

terapia local, um novo procedimento cirúrgico ao redor da cicatriz ou aplicação de radioterapia (O'KEEFE, 1990; THAMM; VAIL, 2007; STANCLIFT; GILSON, 2008).

A decisão terapêutica após a remoção completa dos MCTs de grau II gera muita controvérsia entre oncologistas. Thamm e Vail (2007) e Welle et al. (2008) indicam o acompanhamento do paciente sem aplicação de tratamentos adjuvantes em casos de tumores de grau I e II, estadio clínico II e sem comprometimento de margens. Para tumores de difícil acesso e localização, neoplasias em extremidades, ou locais com limitação de pele para cirurgia reconstrutiva, recomenda-se a associação de outro tipo de terapia adicional (BLACKWOOD et al., 2012). Tratamentos auxiliares como cimetidina, antagonistas H1 e sucralfato são importantes para minimizar os efeitos adversos da desgranulação pela manipulação excessiva do tumor, que ocasiona na liberação de histamina levando a complicações gástricas e de cicatrização (MACY, 1985; O'KEEFE, 1990; ROGERS, 1996).

2.2.5.2 Radioterapia

A terapia por radiação é um método de tratamento bem estabelecido que leva à destruição das células tumorais por radiação ionizante. Seu efeito sobre o DNA provoca modificações nos cromossomos de células em mitose, prejudicando a proliferação e induzindo a apoptose (VERMUND; GOLLIN, 1968). Pode ser empregada em qualquer estágio clínico do tumor, e é indicada em casos de excisão cirúrgica incompleta, doença subclínica ou microscópica, como tratamento adjuvante associado à cirurgia, para citorredução pré-cirúrgica, ou no tratamento de doença com acometimento metastático de linfonodo local ou regional (LARUE; GILLETTE, 2007; BLACKWOOD et al., 2012).

Animais com MCTs de baixo grau ou grau intermediário que passaram por radioterapia como terapia adjuvante tiveram taxas de controle da doença pelo período de dois anos em 85% a 95% dos casos estudados (AL-SARRAF et al., 1996; LADUE et al., 1998; POIRIER et al., 2006).

A aplicação da radioterapia em linfonodos regionais é bem disseminada. Thamm et al. (2006) demonstraram que esse procedimento favoreceu o prognóstico e aumentou o intervalo livre de doença em animais com tumores de risco elevado,

como tumores indiferenciados ou localizados nas junções mucocutâneas. Entretanto, Baginski et al. (2014) avaliaram a evolução clínica de cães diagnosticados com tumores de grau II e comprometimento de linfonodos regionais, e observaram que a linfadenectomia proporcionou um aumento significativo do tempo de sobrevida para os que passaram por tratamento radioterápico.

2.2.5.3 Quimioterapia

A quimioterapia é o método de tratamento mais utilizado pela facilidade de aplicação. Os níveis de resposta a essa modalidade chegam a 78% em protocolos com múltiplos fármacos associados à cirurgia (GILLETTE, 2007). Quimioterápicos induzem danos em números diferentes de loci, e é exatamente esse balanço entre sinais pró-apoptóticos desencadeados pelos danos e sinais de sobrevivência das células que irá determinar o destino celular (MAKIN; DIVE, 2001).

O fator mais importante na escolha do protocolo quimioterápico a ser utilizado é o nível de toxicidade que ele acarreta para o animal. A quimioterapia é indicada em situações, como:

- Terapia adjuvante à cirurgia, de forma sistêmica, na intenção de prevenir metástases principalmente em casos de MCT grau III e comprometimento de linfonodos (DOBSON; COHEN; GOULD, 2004; STANCLIFT; GILSON, 2008; BLACKWOOD et al., 2012).
- Tratamento neo-adjuvante antecedendo a cirurgia, no intuito de reduzir o volume da lesão, citorredução (BLACKWOOD et al., 2012).
- Tratamento da doença residual, em casos onde não é mais possível ressecção cirúrgica ou não é possível o uso de radioterapia.

Os fármacos mais utilizados e disponíveis no mercado para o tratamento dos MCTs são: prednisona, vimblastina, lomustina e ciclofosfamida (THAMM; VAIL; TUREK, 2006; BLACKWOOD et al., 2012). A prednisona é um glicocorticoide cujo mecanismo de ação baseia-se na inibição da proliferação de células tumorais. Quando usada isoladamente tem baixa eficácia, com taxa de resposta completa ou

parcial de 20% (MCCAW et al., 1994). Contudo, pode ser usada como terapia neoadjuvante para citorredução (STANCLIFT; GILSON, 2008).

Outro fármaco muito utilizado na quimioterapia em mastocitomas é a vimblastina, um alcaloide da vinca. Seu principal mecanismo de ação se baseia na alteração da dinâmica de montagem dos microtúbulos, levando à parada do ciclo celular durante a fase de metáfase. Além disso, exibe efeitos citotóxicos nas células que não estão em divisão, induz apoptose, afeta o suprimento vascular tumoral e interfere na síntese de DNA, RNA e proteínas. Em animais, o principal efeito tóxico relatado foi de mielosupressão e distúrbios gastrointestinais (PITTMAN; STRICKLAND; IRELAND, 1994; LOBERT; VULEVIC; CORREIA, 1996; CAMPS-PALAU et al., 2007; HAYES et al., 2007; RASSNICK et al., 2008; VICKERY et al., 2008).

Um dos primeiros protocolos de associação desenvolvidos consistiu na conjugação de vimblastina e prednisona. Foram relatadas taxas de 10% de recorrência local e 57% de tempo livre da doença por um a dois anos (DAVIES et al., 2004). Porém, neste estudo os animais apresentavam margens livres de células tumorais, superestimando a eficácia do tratamento. Corroborando com esses dados, Thamm et al. (1999) constataram que a eficácia dessa associação é baixa com taxa de resposta de menos de 50% em animais com doença disseminada. Contudo, a adição da ciclofosfamida a este protocolo garantiu uma sobrevida de 2092 dias para animais com tumores de alto grau, recidiva ou metástase (CAMPS-PALAU et al., 2007).

Lomustina é um agente alquilante de administração oral da subclasse das nitrosureias, usado comumente na oncologia humana em tratamento de tumores primários e metástases de tumores cerebrais, doença de Hodgkin avançada, melanoma e câncer colorretal (TEICHER, 1997). Porém para tumores espontâneos em animais, a literatura relata que sua eficácia é limitada (FULTON; STEINBERG, 1990; MOORE et al., 1999). Em MCTs o fármaco é usado isoladamente, ou em associações principalmente com vimblastina e prednisona. Cooper et al. (2009) avaliaram a eficácia e toxicidade da associação de lomustina com vimblastina em MCTs e demonstraram que o tempo livre de progressão da doença foi de 30 semanas, com média de sobrevida de 35 semanas para cães com doença macroscópica, e de 35 e 48 semanas para animais com doença residual. Toxicidade foi observada em 54% dos cães, porém leve. Entretanto, são relatados efeitos

mielossupressivo e hepatotóxico (RASSNICK et al., 1999; BLACKWOOD et al., 2012) e demais sintomas como ascite, febre e efusão pleural (NORTHRUP et al., 2004).

O clorambucil faz parte do grupo de fármacos alquilantes, e é utilizado em protocolos de associação com prednisona para MCTs inoperáveis. Um estudo prospectivo avaliou a combinação de clorambucil e prednisona em cães e demonstrou que essa associação resultou em remissão e taxa de sobrevida semelhantes aos demais protocolos. Entretanto essa associação apresenta vantagem pela baixa toxicidade e por ser administrado por via oral quando comparado aos outros protocolos previamente publicados (TAYLOR et al., 2009).

Estudos com ácido retinóico na inibição da proliferação celular em vários tipos de cânceres humanos através da diferenciação e apoptose estão disponíveis (HONG et al., 2000; ALTUCCI; GRONEMEYER, 2001; OHASHI et al., 2001; OHASHI et al., 2006). Contudo, na oncologia veterinária, os estudos pré-clínicos *in vitro* com cultivo primário de mastocitoma demonstraram o efeito do ácido retinóico na redução da proliferação de mastócitos neoplásicos sugerindo ser um potente agente quimioterápico no tratamento dessa neoplasia (PINELLO et al., 2009). Outros agentes quimioterápicos estão disponíveis no mercado para tratamento de MCTs como vincristina e vinorelbine, porém com taxas de respostas muito inferiores aos demais protocolos (MCCAW et al., 1997; GRANT et al., 2008).

Tratamentos adicionais para controle de MCTs vêm sendo utilizados, dependendo do quadro clínico e classificação do tumor, tais como eletroquimioterapia com bleomicina (TOZON; SERSA; CEMAZAR, 2001; KODRE et al., 2009; SPUGNINI et al., 2011), injeção local de corticoides em tumores inoperáveis ou em tumores que não responderam a outro tratamento, imunoterapia (SCHUSSER, 1990; TINSLEY; TAYLOR, 1987) e criocirurgia (BLACKWOOD et al., 2012), esta última limitada a lesões com menos de um centímetro, podendo provocar desgranulação de mastócitos (KRAHWINKEL, 1980; ROBERTS; SEVERIN; LAVACH, 1986).

2.2.5.3.1 *Inibidores de receptores tirosinoquinase*

Receptores KIT são importantes receptores tirosinoquinase presentes na membrana de mastócitos, responsáveis pela proliferação, maturação e sobrevivência dos mesmos. Alterações nesses receptores podem acontecer através de superexpressão dos próprios receptores, translocação cromossômica, sinalização autócrina de SCF e mutações (GALLI et al., 1994; LONDON et al., 1996; TAKEUCHI et al., 2013). Mutações no receptor KIT estão presentes em diversos tipos de câncer. Em mastocitomas caninos representam entre 15 a 40% dos casos e estão associadas com piores resultados clínicos, aumento do risco de metástase, recorrência local, além de alto índice de proliferação celular (ZEMKE; YAMINI; YUZBASIYAN-GURKAN, 2002; WEBSTER et al., 2004).

Fármacos como masitinib (HAHN et al., 2008) e toceranib (LONDON et al., 2009), classificados como inibidores de tirosinoquinase (TKI) são capazes de interagir com receptor KIT, competindo com seu ligante no sítio de ligação de ATP, o que resulta na inibição da cascata de sinalização bioquímica com indução da apoptose, menores taxas de proliferação, migração e angiogênese tumoral (LONDON et al., 1996; LINNEKIN; DEBERRY; MOU, 19997; MA et al., 1999; KIUPEL et al., 2004).

De acordo com a Agência Europeia de Medicamentos (EMA) o uso de toceranib é indicado em casos de recorrência de MCTs grau II e III, os quais não foram passíveis de remoção tumoral completa. Em relação ao masitinib, a indicação é para tumores inoperáveis de grau II e III, com confirmação de mutação em KIT antes do início de tratamento. Ambos os fármacos apresentaram eficácia como agente único em estudos clínicos, porém tanto o toceranib quanto o masitinib apresentaram efeitos colaterais clínicos (HAHN et al., 2008; LONDON et al., 2009; HAHN et al., 2010).

London et al. (2009) demonstraram que o toceranib atua também na interação com o receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGFR) e receptor do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGFR), contribuindo na inibição da angiogênese e metástase. Em um estudo adicional, foi testada a eficácia do toceranib em cães com recidivas de MCTs de grau I e II, com ou sem comprometimento de nódulos linfáticos. Os animais tratados com toceranib

apresentaram uma taxa de reposta objetiva de 42,8% e de 59% pra taxa de resposta biológica (incluindo animais com doença estável por mais de 10 semanas) em relação ao grupo de animais que receberam placebo. Esse resultado foi discordante em animais detectados com mutação de KIT e ausência de metástase em linfonodos, sendo que os mesmos tiveram uma resposta superior comparados ao grupo de animais sem mutações (LONDON et al., 2009).

Hahn et al. (2008) avaliou a eficácia do masitinib em animais com mastocitomas de grau intermediário e tumores de alto grau inoperáveis sem comprometimento metastático em nódulos linfáticos e vísceras, e sem tratamento prévio ou não. Os animais tratados com masitinib tiveram um tempo prolongado de progressão tumoral, exceto aqueles que tinham mutação no KIT, em que a sobrevida global aumentou. Constatou-se que o masitinib usado como medicamento de primeira linha aumenta de 12 a 24 meses o tempo de sobrevida em animais com tumores inoperáveis (HAHN et al., 2010).

Apesar da facilidade de administração por via oral desses novos fármacos, o monitoramento dos animais que recebem esse tipo de terapia é fundamental visto que ambas as medicações levam a efeitos colaterais (BLACKWOOD et al., 2012).

A maioria das terapias antineoplásicas leva à morte da célula cancerosa por apoptose. Diante desse fato, é crescente o interesse na investigação dos mecanismos que levam à apoptose tanto células normais, quanto as cancerosas. Por consequência, o entendimento desse sistema ajudará na investigação de métodos de resistências das células cancerosas a terapias, melhorando a qualidade dos tratamentos (MAKIN; DIVE, 2001)

2.3 APOPTOSE

O conceito de morte celular natural foi originalmente mencionado no ano de 1842 por Carl Voght depois de estudar o desenvolvimento de morte celular em anfíbios estabelecendo assim um marco na comunidade científica. Entretanto a primeira descrição morfológica foi descrita no ano de 1885 por Walther Flemming, o qual observou microscopicamente o encolhimento celular, núcleo fragmentado e

formação de corpos apoptóticos considerados as principais marcas da apoptose (COTTER, 2009).

Contudo, o termo apoptose surgiu a partir de uma nova classificação de morte celular proposta por estudos de Kerr et al. (1972) o qual descreve morfologicamente formas distintas de morte celular, porém alguns conceitos sobre esses eventos foram relatados alguns anos mais tarde (KERR et al., 1972; KERR, 2002). O entendimento do mecanismo envolvendo a apoptose em células de mamíferos ocorreu a partir de estudos e investigação do programa de morte celular observado no nematódeo *Caenorhabditis elegans* como sistema modelo (HORVITZ, 1999).

O processo apoptótico conhecido também como “morte celular programada” é considerado o maior mecanismo de regulação de morte celular empregado não somente quando há risco ou estresse celular, mas também durante processos normais de desenvolvimento (VASSILIKI et al., 2013). O controle desse processo ocorre geneticamente e está envolvido na morfogênese e manutenção da homeostasia dos diferentes organismos, além de remover células senescentes, desnecessárias ou que tenham sofrido algum tipo de mutação (PACKHAM; CLEVELAND, 1995; KLUCK et al., 1997; GREEN; REED, 1998; YANG et al., 1998).

Em condições normais o processo apoptótico ocorre durante o desenvolvimento e envelhecimento celular mantendo a população de células no tecido. Entretanto a apoptose pode ocorrer em defesa do organismo no caso de reações imunes ou quando as células passam por risco de doenças e agentes nocivos (NORBURY; HICKSON, 2001). Alguns hormônios como, por exemplo, corticosteroides, assim como a privação de fatores de crescimento, podem levar ao processo de morte celular. Em adição, células que expressam receptores do tipo Fas ou TNF podem induzir apoptose via ligação do ligante com esses receptores. Injúrias como calor, radiação e agentes quimioterápicos resultam em risco ao DNA levando as células afetadas à morte celular através da via dependente de TP53, cujo exerce papel crítico na regulação da família de proteínas Bcl-2 (ELMORE, 2007).

Um dos primeiros eventos bioquímicos que ocorrem durante o processo apoptótico é a externalização da fosfatidilserina, componente fosfolipídico, mantido no folheto interno da membrana celular (SCHLEGEL; WILLIAMSON, 2001). Posteriormente a esse evento, várias modificações morfológicas acontecem e podem ser visualizadas através de microscópio de luz. No estágio inicial, observa-se o encolhimento do citoplasma e picnose devido à condensação da cromatina. Tal

encolhimento celular resulta no aumento da densidade citoplasmática, levando ao auto-empacotamento das organelas (HACKER, 2000). Ocorre formação de bolhas na membrana citoplasmática seguido de cariorrexe e fragmentação celular formando corpos apoptóticos. Esses corpos apoptóticos consistem em partes do citoplasma com organelas empacotadas, podendo conter fragmentos nucleares, que posteriormente serão fagocitados por macrófagos sem gerar qualquer reação inflamatória (SAVILL; FADOK, 2000; KUROSAKA et al., 2003).

No exame histológico realizado com coloração de hematoxilina e eosina, a apoptose envolve células individuais ou grupos celulares. As células adquirem formato oval ou redondo, coloração escura, com citoplasma eosinofílico, contendo fragmentos densos basofílicos constituídos de cromatina nuclear (ELMORE, 2007).

A compreensão de que a apoptose é um programa direcionado por genes vem trazendo implicações para nosso entendimento sobre o desenvolvimento biológico e a homeostase dos tecidos. Tais processos implicam a regulação das células por fatores que influenciam na sua sobrevivência, proliferação e diferenciação, entretanto a base genética para apoptose como qualquer outro programa de desenvolvimento ou metabólico pode ser interrompida por algumas mutações (LOWE; LIN, 2000). Defeitos na via apoptótica são responsáveis por doenças degenerativas e descontroles proliferativos como o câncer (THOMPSON, 1995).

2.3.1 Apoptose e câncer

O conceito que a morte celular por apoptose funciona como uma barreira natural para o desenvolvimento do câncer foi estabelecido por estudos funcionais desenvolvidos nas últimas duas décadas (EVAN; LITTLEWOOD, 1998; LOWE et al., 2004; ADAMS; CORY, 2007). O papel da apoptose e sua importância no câncer foi demonstrado, bem como a influência na resistência a terapias antineoplásicas (KERR et al., 1994).

A elucidação dos circuitos de sinalização que governam o programa apoptótico revelou como o mecanismo é desencadeado em resposta a estresses

fisiológicos que as células cancerosas sofrem durante a tumorigênese, ou como resultado de terapias anticâncer (HANAHA; WEINBERG, 2011). Na maioria dos casos, terapias anti-neoplásicas resultam na ativação de caspases que atuam como moléculas efetoras de morte em vários tipos de morte celular (DEGTEREV et al., 2003). Dentre os estímulos de estresse que levam à apoptose, estão os desequilíbrios de sinalização resultantes de níveis elevados de sinalização de oncogenes, e danos ao DNA associados à hiperproliferação (HANAHA; WEINBERG, 2011).

Entretanto, a capacidade de evasão da apoptose tornou-se uma das principais assinaturas do câncer. Alterações nesse mecanismo favorecem a progressão tumoral e a formação de metástases por permitir a sobrevivência de células neoplásicas na circulação e em microambientes de outros tecidos (BURLACU, 2003; KUMAR et al., 2005; ADAMS et al., 2007; MADDIKA et al., 2007).

A apoptose é atenuada em tumores que tiveram êxito na progressão atingindo estágios mais avançados de malignidade e resistência a terapias (LOWE; CEPERO; EVAN, 2004; ADAMS; CORY, 2007). Esse fato pode ser explicado pela associação de mecanismos anti-apoptóticos que regulam morte celular e resistência de células tumorais a alguns fármacos (FULDA; DEBATIN, 2004).

O sucesso da tumorigênese está intimamente associado ao mecanismo de apoptose. Geralmente, o mecanismo pelo qual a célula consegue evadir da morte consiste em diminuição da apoptose ou resistência da mesma e pode ser dividido amplamente em três processos (Figura 1):

- Desequilíbrio no balanço de proteínas pró-apoptóticas e anti-apoptóticas: muitas proteínas foram relatadas para exercer funções pró ou anti-apoptóticas. Entretanto, não é a quantidade absoluta, mas sim a relação entre elas que desempenha um papel importante na morte celular. O desequilíbrio de proteínas, assim como a superexpressão ou baixa expressão de alguns genes contribuem para a carcinogênese pela redução da apoptose nas células. Como exemplo, desregulação dos membros da superfamília Bcl-2; mutações no gene P53 presentes em 40% dos cânceres em humanos (BAI; ZHU, 2006); desequilíbrio de proteínas indutoras de apoptose (IAPs) (WONG, 2011).
- Redução na função das Caspases: tais proteínas têm papel central na fase de execução da apoptose. Em alguns casos, mais de uma caspase pode ser

regulada negativamente contribuindo para o crescimento tumoral e desenvolvimento (WONG, 2011).

- Prejuízos na sinalização de receptores de morte: receptores de morte ativam via extrínseca da apoptose e anormalidades incluem a menor regulação desses receptores (WONG, 2011). Estudos demonstram que a redução na expressão de CD95 desempenha um papel na resistência do tratamento de leucemia e em células de neuroblastoma (FRIESEN; FULDA; DEBATIN, 1997; FULDA et al., 1998).

Figura 1 - Mecanismos de evasão da apoptose durante a carcinogênese

Fonte: (WONG, 2011).

Legenda: Esquema elucidando os mecanismos para evasão da apoptose durante a carcinogênese. Os mecanismos para a evasão podem ser ocasionados por defeitos nos receptores de sinalização; desequilíbrio no balanço das proteínas da família Bcl-2; aumento de expressão de proteínas inibidoras da apoptose (IAPs); redução na expressão de membros da família das caspases e defeitos ou mutações em *P53*.

A maquinaria do processo apoptótico é constituída por componentes efetores reguladores (ADAMS; CORY, 2007). Os componentes reguladores por sua vez são divididos em dois grandes circuitos: um recebe e processa os sinais de indução de morte extracelular, conhecido como via extrínseca; o outro é responsável por interagir com uma variedade de sinais intracelulares, denominado via intrínseca da

apoptose (Figura 2). Ambos culminam na ativação de uma cascata de caspases, responsáveis pela fase de execução da mesma (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Figura 2- Vias de ativação da apoptose: via extrínseca x via intrínseca

Fonte: (WONG, 2011)

Legenda: Esquema simplificado demonstrando as duas vias de ativação da apoptose. Via extrínseca: desencadeada por receptores de morte e ativação da caspase 8 que leva a ativação de pró-caspase 3. Via intrínseca: desencadeada pela liberação do citocromo C pela mitocôndria, levando a formação do complexo apoptossomo através da ligação de APAF-1 e caspase 9 culminando na ativação de pró-caspase 3. Ambas as vias resultam na ativação de caspase 3, responsável pela fase de execução da apoptose. Observa-se a participação de membros pró apoptóticos, que se ligam a proteínas IAPs, ou inibidoras da apoptose destruindo-as na intenção de facilitar o mecanismo apoptótico.

2.3.2 Via Extrínseca

A via extrínseca é iniciada quando um estímulo, ligantes ativam seus respectivos receptores de morte. O receptor de morte mais conhecido é o Receptor do Fator de Necrose Tumoral do tipo 1 (TNFR1) e uma proteína relacionada chamada Fas (CD95) (HENGARTNER, 2000). Além do papel na via extrínseca, essas proteínas contribuem numa ampla gama de funções biológicas incluindo sobrevivência, diferenciação e regulação de resposta imune. Esses receptores de morte contêm um domínio intracelular, os quais recrutam proteínas adaptadoras, tais como domínio de morte associado ao receptor de morte TNF (TRADD), domínio de morte associado a Fas (FADD), além de cisteínoproteases como, por exemplo, a caspase 8 (SCHNEIDER; TSCHOPP, 2000). A ligação do ligante de morte com seu receptor resultam na formação de um sítio de ligação para proteínas adaptadoras. Esse complexo proteína adaptadora-receptor-ligante é conhecido como Complexo de Sinalização Indutor de Morte (DISC) cuja função é a avaliação e iniciação das pró-caspases 8 (O'BRIEN; KIRBY, 2008). A pró-caspase 8 é então ativada e desencadeia a apoptose pela clivagem de outras caspases executoras (KARP, 2008).

As células cancerosas desenvolvem inúmeras estratégias para resistir à morte celular induzidas pela via extrínseca. Sinalizações de morte celular induzidas por ligantes de receptores de morte podem ser inibidas principalmente pelo aumento de moléculas anti-apoptóticas, ou mesmo pela diminuição e defeitos de proteínas pró-apoptóticas. Receptores de morte podem variar sua expressão entre diferentes tipos, além disso, podem ter baixos níveis ou ausência de expressão, levando à resistência em vários tipos de neoplasias (FULDA; DEBATIN, 2006).

2.3.3 Via Intrínseca

A via intrínseca da apoptose é conhecida como via mitocondrial, e sua assinatura bioquímica está relacionada com as alterações e mudanças que ela

desencadeia culminando na liberação do citocromo C para o citoplasma e facilitando a ativação da cascata de caspases (WONG, 2011).

A via mitocondrial está intimamente ligada e regulada pela superfamília de proteínas Bcl-2, a qual recebeu esse nome depois da descoberta do gene *BCL2*, originalmente observado em decorrência da translocação do cromossomo 18 para o cromossomo 14 em linfoma folicular de células B não Hodgkin. Essa translocação resultou na superexpressão do gene *BCL2* e por consequência, superexpressão do seu produto funcional (HATA; ENGELMAN; FABER, 2015), demonstrando uma melhor capacidade de sobrevivência das células pela inibição da apoptose (MCDONNELL; KORSMEYER, 1991; HENDERSON, 1991).

A maioria dos membros dessa família possui propensão para formar homo e heterodímeros e contêm um segmento hidrofóbico com sequência C- terminal. Experimentos *in vitro* indicam que a sequência C-terminal serve como um segmento ancora de sinalização responsável pelo alvo BCL2 na mitocôndria (NGUYEN et al., 1993). Essas proteínas estão localizadas na membrana intracelular mitocondrial, retículo endoplasmático e envoltório nuclear (HOCKENBERY et al., 1990; KRAJEWSKI et al., 1993).

Genes adicionais homólogos ao gene *BCL2* vêm sendo identificados e são responsáveis por codificar proteínas anti e pró-apoptóticas (CHIPUK et al., 2010). Os membros da família Bcl-2 são reguladores de tensão responsáveis pela permeabilidade da membrana, seja na forma de canais de íons ou pela formação de poros na membrana (MINN et al., 1997).

Cada membro da família contém pelo menos um dos quatro domínios de homologia Bcl-2 (BH), que são regiões altamente conservadas e classificadas como: BH1, BH2, BH3 e BH4. Sendo assim, os membros da família Bcl-2 são divididos em três grupos de acordo com seus domínios BH (DEWSON; KLUC, 2010):

- O primeiro grupo é constituído por proteínas que contêm todos os quatro domínios transmembrânicos BH, responsáveis por proteger as células do estímulo apoptótico, tais como: BCL2, BCL2L1 (Bcl-xL), BCL2L3 (Mcl-1), BCL2L2 (Bcl-w), BCL2A1 e BCL2L10 (Bcl-B) (WONG, 2011).
- O segundo grupo é formado somente por proteínas que apresentam o domínio BH3, conhecidas como proteínas “BH3-only”, que atuam como sensores de estresse celular antagonizando BCL2 e ajudando na ação de BAX e BAK. São exemplos desse grupo: BID, BCL2L11(BIM), BBC3 (Puma),

PMAIP1 (Noxa), BAD, BMF, HRK e BIK (WONG, 2011). Após o sinal de morte, proteínas desse grupo interagem com a subfamília BAX, levando a alterações conformacionais das mesmas as quais se inserem dentro da membrana mitocondrial sofrendo oligomerização e formando canais permeáveis de proteínas (MARTINOU, 2001).

- O terceiro grupo de proteínas é composto por membros que pró- apoptóticos efetores, os quais contem os quatro domínios BH, assim como: BAX, BAK e BOK, responsáveis pela permeabilidade da membrana externa mitocondrial (DEWSON; KLUC, 2010).

Destacamos a proteína BAX como uma das principais proteínas pró-apoptóticas efectoras. Pertencente à família Bcl-2, é composta por multidomínios BH. Essa proteína é codificada pelo gene *BAX*, o qual foi o primeiro gene pró-apoptótico a ser identificado dentro da superfamília Bcl-2 (WEI et al., 2001). Normalmente BAX está localizada na mitocôndria, envelope nuclear e retículo endoplasmático. Em células de mamíferos saudáveis encontra-se uma maior quantidade dessa proteína, porém durante a iniciação da apoptose, BAX sofre uma mudança em sua conformação tornando-se associada a membrana de organelas, mais especificamente associada à mitocôndria (GROSS et al., 1998). Em condições normais BAX pode ser regulada pelo gene *TP53*, e parte das propriedades de supressão tumoral desse gene podem ser mediada pela ativação do gene *BAX* levando à indução da apoptose (MIYASHITA; REED, 1995).

Outro importante membro da família Bcl-2, responsável pela iniciação da superfamília de reguladores da apoptose é a proteína BCL2 (*B-cell leukemia/lymphoma 2*), a qual foi identificada como produto proteico do gene translocado e superexpresso em mais de 85% dos linfomas foliculares (CORREIA et al., 2015). BCL2 é localizada na membrana mitocondrial externa sendo a principal responsável pela regulação de saída do citocromo c, desencadeando programa de morte celular. Sua função chave é estabilizar a membrana mitocondrial e inibir a ação de BAX (BURLACU, 2003; GUROVA; GUDKOV, 2003; ADAMS; CORY, 2007; MADDIKA et al., 2007).

Ensaio funcionais em condições celulares normais, BAX pode suprimir a habilidade de BCL2 no bloqueio da apoptose. Seu excesso nas células detém a atividade de BCL2 acelerando a morte celular. Nesse contexto é interessante

entender que a interação entre BAX e BCL2 ocorre nas células antes mesmo da indução de um sinal de morte. Quando BCL2 está em excesso, seja pela formação de heterodímeros BCL2-BAX ou pela predominância de homodímeros de BCL2, as células estão protegidas da apoptose. Por outro lado, quando BAX está em excesso com predominância de homodímeros de BAX, as células estão sensíveis à apoptose (BASU; HALDER, 1998).

Raffo et al. (1995) demonstraram que a alta expressão de BCL2 protege as células de câncer de próstata da apoptose, o mesmo ocorrendo em tumores de mama, câncer de pulmão de células não pequenas, câncer de pulmão de células pequenas e melanoma. Experimentos realizados em camundongos transfectados com BCL2 aumentaram a carga metastática pulmonar drasticamente (PINKAS; MARTIN; LEDER, 2004). Ainda, a expressão de BCL2 está correlacionada com aumento de metástases em carcinoma hepatocelular (SUN et al., 2011).

Estudos de carcinogênese oral realizados em ratos sugerem que anormalidades na via da apoptose implicam no aumento da expressão de BAX e BCL2, parecendo estar associado com progressão de câncer oral (RIBEIRO; SALVADORI; MARQUES, 2005). A desregulação na expressão de BCL2 confere sobrevivência independente de interleucina, permitindo um maior tempo de vida de células B pré-cancerosas em linfonodos, facilitando transformações malignas (HALDAR et al., 1994; LU et al., 1996; MARX et al., 1997).

A rede complexa de interações entre membros indutores de morte e anti-apoptóticos regulam intensamente o mecanismo apoptótico mitocondrial, permitindo uma rápida resposta a estímulos específicos evitando morte celular indesejada e funcionamento celular normal (HATA; ENGELMAN; FABER, 2015). Após estímulos que levam a permeabilização da membrana mitocondrial pela interação de BAX e BCL2, ocorrerá a liberação de fatores pró- apoptóticos no citoplasma celular. Esses fatores mitocondriais incluem além do citocromo C, o fator indutor de apoptose (AIF); Smac; DIABLO e HtrA2/Omi serina protease. Smac/DIABLO ou Omi/HtrA2 se liga a proteínas inibidoras de apoptose (IAPs) desativando-as, corroborando com mecanismo apoptótico. Entretanto, o citocromo C atua de forma divergente ativando caspase 3 através da ligação e ativação de APAF1 e pró-caspase 9 (TOWER, 2015).

APAF1 (Fator Apoptótico Ativador de Peptidase 1) vem se mostrando um elemento chave na via da apoptose dependente de mitocôndria (CECCONI, 1999).

APAF1 é uma proteína com aproximadamente 130 kDa e codificada pelo gene *APAF1*, homólogo em mamíferos do gene *CED4* do nematódeo *C. elegans* (HICKMAN; HELIN, 2002). É formada por três domínios: domínio de recrutamento de caspases (CARD) na porção N-terminal, domínio CED4 like responsável pela ligação dos nucleotídeos e domínio C-terminal, o qual contém múltiplas repetições ou resíduos de aspartato e triptofano (WD) essenciais na interação proteína-proteína (CECOCONI, 1999). Essa proteína está localizada no citoplasma de células saudáveis como um monômero ativado. Sob estímulo apoptótico ocorre a liberação de citocromo C pela mitocôndria que se liga na região WD da proteína APAF1. Na presença de dATP mudanças conformacionais na região WD desmascara o domínios CARD permitindo a ligação da pró-caspase 9. A oligomerização de APAF1 segue-se através de domínios CED-like criando uma estrutura chamada de apoptossomo responsável pela ativação subsequente de pró-caspase 9, que através de clivagem autocatalítica inicia uma cascata de caspases efetoras resultando na apoptose (HICKMAN; HELIN, 2002).

Seu papel no câncer está relacionado com supressão tumoral. Uma correlação inversa entre expressão de APAF1 e estágio patológico vem sendo reportado em melanomas humanos (CAMPIONI et al., 2005). Mustika et al. (2005) descrevem intensa e difusa marcação citoplasmática imuno-histoquímica de APAF1 em pele normal, nevos e melanoma *in situ* humanos. Células positivas com marcação mais fraca e focal foram observadas em melanoma de estágio mais evoluído, e menos de 25% das células tumorais de melanomas metastáticos foram marcadas, sugerindo o papel de APAF1 na progressão da doença. Em tumores colorretal de humanos, o aumento da frequência e desequilíbrio alélico no locus de APAF1 estão associados com a progressão do tumor a partir de um adenoma evoluindo para carcinoma metastático (UMETANI et al., 2004) e a perda de expressão de APAF1 pode representar um marcador de comportamento agressivo do tumor, uma vez que se relaciona de forma significativa com a ocorrência de metástases de linfonodos em tumores cervicais em mulheres (LEO et al., 2005).

Como mencionado anteriormente, a via de execução da apoptose consiste em um grupo de proteínas denominadas caspases. Caspases são proteínas pertencentes a uma mesma família de cisteínoproteases altamente conservadas, as quais clivam a ligação peptídica C-terminal dos resíduos de ácido aspártico (ALNEMRI et al., 1996).

O primeiro membro da família foi identificado como uma protease responsável pela maturação proteolítica de pró-IL-1 β (enzima conversora de interleucina 1 β , ICE) (BLACK et al., 1989; KOSTURA et al., 1989). ICE mais tarde foi purificada e clonada tornando-se ICE/caspase 1, porém a descoberta inicial não forneceu qualquer evidência dessas proteases no processo de morte celular (CERRETHI et al., 1992; THORNBERRY et al., 1992). Essa evidência somente foi confirmada na clonagem do gene de morte CED-3 do nematódeo *C.elegans*, levando a descoberta de que proteases derivadas dessa clonagem desempenham um papel fundamental no processo de morte celular (YUAN et al., 1993). No ano seguinte, foi identificado o primeiro membro da família das caspases em mamíferos, homólogo de *C. elegans*, denominado como caspase 2 (KUIDA et al., 1995; LI et al., 1995).

Membros dessa família são sintetizados por pró-enzimas, as quais são proteoliticamente ativadas tornando-se heterodímeros com domínios catalíticos. As pró-enzimas irão ser referidas como “pró-nome específico da enzima”, como por exemplo, “pró-caspase 9” (ALNEMRI et al., 1996).

Todos os componentes da família das caspases residem no citoplasma das células como pró-enzimas (GERALD, 1997). Estruturalmente todas as pró-caspases possuem um domínio de proteases altamente homólogo, o qual é a assinatura da família de caspases. Esse domínio é dividido em duas subunidades, uma de aproximadamente 20 kDa e a outra de 10 kDa (CHANG; YANG, 2000). O grupo de caspases iniciadoras e caspases inflamatórias contêm um longo pró-domínio de mais de 100 aminoácidos, enquanto que o pró-domínio das caspases efetoras é menor, contendo menos de 30 aminoácidos. Os longos pró-domínios possuem domínios efetores de morte (DED) e domínios de recrutamento de caspases (CARD) (BOLDIN et al., 1995; BOLDIN et al., 1996; MUZIO et al., 1998). Esses domínios medeiam à interação homofílica de pró-caspases e seus adaptadores iniciando um importante papel na ativação de pró-caspases. A ativação das pró-caspases envolve a proteólise entre domínios, ligantes e subsequentemente pró-domínios (SLEE, 1999; SHI, 2002).

No entanto, a ativação das caspases pode ocorrer através da auto-ativação via oligomerização (ORTH et al., 1996), transativação induzida via receptores de morte ou mitocondrial, e por proteases (DUAN et al., 1996; ZHOU et al., 1997). Quando ativadas, iniciam o processo de morte celular programada por destruir componentes essenciais de infraestrutura das células.

Existem quatorze membros na família das caspases identificadas em humanos (STEGH; PETER, 2002). São classificadas como enzimas de processamento de citocinas: caspase 1 (CERRETHI et al., 1992), caspase 4 (FAUCHEU et al., 1995), caspase 5 (MUNDAY et al., 1995), caspase 11, caspase 12, caspase 13 e caspase 14 (CHANG; YANG, 2000). Já as caspases relacionadas a apoptose são: caspase 2 (BERGERON et al., 1998), caspase 3, caspase 6, caspase 7, caspase 8 (FERNANDES et al., 1996), caspase 9 (DUAN et al., 1996) e caspase 10. As caspases 2, 8, 9 e 10 desencadeiam a cascata e são conhecidas como superreguladoras e iniciadoras de caspases; enquanto que as caspases 3, 6 e 7 compreendem em membros da fase de execução da apoptose.

A caspase 9 como mencionada anteriormente é uma proteína que participa da iniciação da cascata de caspases. É sintetizada como proteína precursora de 46kDa, e como as outras caspases consiste de três domínios: pré-domínio N-terminal, uma subunidade maior de aproximadamente 20 kDa/p20, e outra subunidade menor com 10 kDa/p10. Apresenta uma sequência com 31% de identidade com a proteína de morte celular CED-3 do nematódeo *C.elegans*, e 29% de identidade com a caspase 3 em mamíferos. Contém um sítio ativo QACGG ao invés do domínio pentapeptídico QACRG, o qual é conservado entre os outros membros da família (DUAN et al., 1996; SRINIVASULA et al., 1996). Caspase 9 é expressa em uma grande variedade de tecidos humanos adultos e tecidos fetais, sendo localizada no citoplasma celular. Torna-se ativa depois de sua associação com APAF1, através do pró-domínio N-terminal. As sequências amino terminais de APAF1 e caspase 9, contem juntas um domínio de recrutamento de caspases (CARD) o qual é indispensável para sua interação com as demais caspases (HOFMANN; BUCHER; TSCHOPP, 1997).

A baixa regulação de RNAm de caspase 9 foi encontrada como um evento frequente em pacientes com tumores colorretal estágio II em humanos e correlacionado com piores resultados clínicos (SHEN et al., 2010). Entretanto, alterações na expressão de caspase 9 não foram correlacionadas com sobrevivência em meduloblastoma em crianças. Esses dados sugerem que existem diferentes mecanismos de atuação da caspase 9 dependendo do tipo de neoplasia envolvida (PINGOUD-MEIER et al., 2003).

Dentre as caspases efetoras, a caspase 3 exerce papel central na apoptose e vem sendo foco de vários estudos tornando-se peça chave no mecanismo de morte celular, uma vez que é ativada em resposta a vários estímulos como quimioterápicos

(TERZIAN et al., 2007). Codificada pelo gene CASP3, homologa em humanos do CED-3 de *C. elegans*, a caspase 3 localiza-se no citoplasma das células como precursor inativo. Seu peso é aproximadamente 32kDa, o qual é convertido proteoliticamente para heterodímeros ativos de 20kDa e 10kDa quando as células são sinalizadas para morte. Após a ativação da caspase 3 pela caspase 8 desencadeado pela via extrínseca, e da caspase 9 desencadeada pela via intrínseca, ocorre a autocatálise da caspase 3 levando a ativação e clivagem de outros membros culminando na rápida e irreversível apoptose (WANG et al., 1996; SRINIVASULA et al., 1996).

Em particular, células normais contêm uma pequena quantidade de caspase 3 na forma de zimogênios inativos que sob estímulos são ativados culminando em apoptose. Quando ativada cliva e ativa a subunidade 45kDa do fator de fragmentação do DNA levando à degradação do DNA em fragmentos nucleossomais, evento considerado como assinatura da apoptose (ZHOU et al., 1997). Em adição, ativação de caspase 3 induz a clivagem de quinases, proteínas do citoesqueleto e, proteínas de reparo de DNA; inibe subunidades de família de endonucleases; e, além disso, tem efeito sobre o ciclo celular, vias de sinalização, e contribuição para as atípicas alterações morfológicas da apoptose (GHOBRIAL; WITZIG; ADJEI, 2005). A habilidade da atividade da caspase 3 em ser a desencadeadora em eventos da apoptose implica em um processo de ativação que pode ser altamente regulado a fim de prevenir a morte celular indesejada. De fato, a proteína BCL2 previne a ativação de caspase 3 em resposta a uma variedade de sinais desencadeados na apoptose. No câncer, a expressão de caspase 3 é menor em carcinomas gástricos de humanos, comparados a tecidos da mucosa adjacente normal (HOSHI et al., 1998; ZHENG et al., 2003). Corroborando com esses achados, houve um decréscimo na expressão de caspase 3 entre osteossarcomas apendiculares caninos de grau I comparados aos de grau III (BOGIOVANNI et al., 2012).

Diante dessa abordagem e da importância da apoptose no câncer, o estudo pormenorizado da via intrínseca do processo apoptótico poderá contribuir com a identificação de marcadores prognósticos confiáveis, possivelmente preditivos, e com a utilização mais lógica dos tratamentos quimioterápicos e radioterápicos do que os disponíveis atualmente para os mastocitomas cutâneos caninos.

3 OBJETIVOS

- Caracterização e detecção da expressão imuno-histoquímica das principais proteínas envolvidas na via intrínseca da apoptose em mastocitomas caninos: BAX, BCL2, APAF1, Caspase 9 e Caspase 3.
- Verificação de possíveis relações entre estas expressões e a graduação histopatológica, evolução clínica dos casos estudados (sobrevida pós-cirúrgica) e mortalidade em função da neoplasia.

4 MATERIAS E MÉTODOS

4.1 ORIGEM DO MATERIAL E DADOS CLÍNICOS DOS ANIMAIS

Foram colhidos 52 casos de mastocitomas cutâneos caninos durante o período experimental, referente a janeiro de 2013 até setembro de 2014. As amostras coletadas tiveram procedência dos setores de cirurgia dos Hospitais Veterinários da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA-USP), da Universidade Anhembi-Morumbi, da Clínica PROVET, e do Instituto Paulista de Especialidades Veterinárias do Hospital Público Veterinário da ANCLIVEPA-SP. Em adição, 42 amostras foram obtidas dos arquivos de histopatologia do Departamento de Patologia Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP (VPT-FMVZ-USP), do setor de Patologia do Hospital Veterinário da Universidade Metodista de São Paulo (UMESP).

Para cada animal foi atribuído o histórico clínico retrospectivo através das análises dos prontuários, conferências telefônicas com médico veterinário responsável e/ou proprietário e acompanhamento em consultas. As informações necessárias para o levantamento incluíam: idade ao diagnóstico do tumor, sexo, idade, raça, localização da lesão, quantidade de nódulos neoplásicos, evolução e desenvolvimento da massa tumoral, realização de protocolo de quimioterapia, tempo de sobrevivência do animal pós-cirurgia e em casos de óbito a causa da morte.

4.2 PROCESSAMENTO HISTOPATOLÓGICO

Os tumores coletados foram fixados em solução de formaldeído na concentração de 10% por 48 horas. Após esse processo, os mesmos foram colocados em solução de álcool 70% para melhor conservação e então submetidos a processamento histológico de acordo com as técnicas rotineiras de inclusão em parafina no Laboratório de Patologia da Faculdade de Engenharia de Alimentos e

Zootecnia (FZEA-USP). Cortes de 4µm de espessura foram obtidos e corados pela técnica da hematoxilina & eosina (HE) (PROPHET et al., 1992).

4.3 GRADUAÇÃO HISTOPATOLÓGICA

Os tumores foram analisados por dois observadores e graduados pelas propostas de classificação de Patnaik, Ehler e MacEwen (1984) em 3 graus de acordo com sua diferenciação celular, e pela graduação de Kiupel et al. (2011) podendo ser classificados em baixo grau e alto grau. Os casos com lesões múltiplas foram graduados pela lesão de maior grau histopatológico.

4.4 PROCESSAMENTO IMUNO-HISTOQUÍMICO

O processamento imuno-histoquímico foi realizado no Laboratório de Patologia do Departamento de Medicina Veterinária da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA/USP) com base no método descrito por Hsu et al. (1981), com pequenas modificações no intuito de estabelecer protocolos de imuno-histoquímica para os seguintes anticorpos: anti-BAX¹, anti- BCL2², anti-APAF1³, anti-Caspase 9⁴ e anti- Caspase 3⁵

Cortes histológicos de mastocitomas com aproximadamente 4 µm de espessura foram aderidos a lâminas sinalizadas e desparafinados em estufa a 65°C, seguidos por 4 banhos de xilol 100% por 5 minutos cada, em seguida re-hidratados em álcool absoluto, etanol 95% e 70%, seguido por banho de água corrente e destilada.

¹ Anti BAX (P19), rabbit policlonal (Santa Cruz Biotechnology, sc 526)

² Anti BCL2, mouse monoclonal (ABCAM, ab 117115)

³ Anti APAF1(C-19), goat policlonal (Santa Cruz Biotechnology sc 7231)

⁴ Anti Caspase 9 [E23], rabbit monoclonal (ABCAM, ab 32539)

⁵ Anti Caspase 3, rabbit policlonal (ABCAM, ab 4051)

Os protocolos de imuno-histoquímica para os anticorpos anti-BCL2 e anti-APAF1 foram realizados da mesma forma, com recuperação antigênica utilizando o tampão Tris-EDTA pH 9.5 em panela de pressão por 2 minutos, seguido de resfriamento por 20 minutos. Para os anticorpos anti-BAX, anti Caspase 9 e anti-Caspase 3 a recuperação antigênica foi realizada em tampão Citrato, pH 6.0, em “steamer” por 20 minutos, seguido de resfriamento por 20 minutos.

Após a etapa de resfriamento no tampão, as amostras foram lavadas em 3 banhos de 5 minutos em solução de tampão de lavagem PBS pH 7.4 para todos os anticorpos com exceção do anti-Caspase 3 que foi utilizado o tampão de lavagem TBS pH 7.6. Em ambos os tampões foi adicionado o detergente Tween 20 a 1%.

A etapa posterior consistiu no bloqueio da peroxidase endógena com solução de peróxido de hidrogênio a 12% diluído em água destilada, por 30 minutos para os anticorpos anti-BCL-2, anti-APAF1 e anti-Caspase 3. Para os anticorpos anti-Caspase 9 e anti-BAX, utilizou-se solução de peróxido de hidrogênio a 60% diluído em álcool metílico, seguido de lavagem das lâminas com solução de lavagem.

Para o bloqueio das proteínas inespecíficas, as lâminas foram submetidas à incubação com solução *Protein Block Serum Free*, DAKO® por 7 minutos para anti-BCL2 e anti-APAF1, e por 15 minutos para anti-BAX e anti-Caspase 3 utilizamos a mesma solução de bloqueio porém por 15 minutos. Por fim, somente o anti-Caspase 9 realizamos o bloqueio através de leite em pó desnatado 5% em água destilada por 20 minutos. Após o bloqueio das proteínas inespecíficas os cortes foram circulados com caneta hidrofóbica (Super HT, Pan Pen®). As amostras foram submetidas à incubação com anticorpos primários BCL-2, BAX, APAF1, Caspase 9 e Caspase 3 nas diluições 1:100, 1:200, 1:100, 1:1000 e 1:1500, respectivamente, em câmara úmida, por 18 horas a 4°C.

Os cortes foram lavados por 4 vezes de 5 minutos cada com tampão de lavagem e incubados com anticorpo secundário ADVANCE HRP® (Dako A/S, USA) utilizado conforme indicação do fabricante a fim de amplificar a reação, seguido de revelação da reação realizada por 3',3'-tetraidrocloro de diaminobenzidina (DAB) por 1 minuto e a subsequente lavagem em água destilada. A contracoloração foi feita por Hematoxilina de Harris, com imersão das lâminas por 1 minuto, seguido de lavagem em água corrente e água destilada. As etapas posteriores consistiram na desidratação em álcool graduado, diafanização em banhos em xilol e montagem com lamínula.

Durante as análises, as lâminas de controle negativo foram incubadas com o mesmo isotipo de Imunoglobulina G para cada anticorpo e processadas simultaneamente, na mesma diluição e condições, para confirmar a especificidade do anticorpo primário em todas as reações.

4.5 AVALIAÇÃO DAS IMUNOMARCAÇÕES

As mensurações das imunomarcações foram analisadas em microscópio binocular (LEICA® DM500). As quantificações das proteínas BCL2, BAX, APAF1 e Caspase 9 foram realizadas através de um método de escore misto, qualitativo e semiquantitativo (SOINI et al., 2001; SAMPAIO-GÓES et al., 2005; STREFEZZI et al., 2012). Foram selecionados 10 campos com alta porcentagem de marcação (“*hot spots*”) e alta intensidade de marcação à objetiva de 40x, distante das bordas das lâminas a fim de evitar marcações inespecíficas e artefatuais. A avaliação qualitativa foi baseada na intensidade de marcação citoplasmática gerando um escore equivalente a: 0, marcação negativa; 1, fraca intensidade; 2, moderada intensidade; 3, forte intensidade; e 4, intensidade muito forte. A avaliação semiquantitativa foi determinada pela porcentagem de mastócitos neoplásicos marcados: 0, ausência de células marcadas; 1, menos de 25% das células marcadas; 2, de 25 a 50% de células marcadas; 3, de 50 a 75% de células marcadas; e 4, mais de 75% das células marcadas. Em seguida, o escore final foi determinado pela soma dos escores qualitativo e semiquantitativo: escore 0, para animais não reagentes; escores entre 1 e 4, considerados animais de baixa expressão; escores entre 5 e 8, considerados animais com alta expressão proteica.

A imunomarkação para proteína caspase 3 foi analisada por 3 observadores concomitantes, em 5 campos de intensa marcação (“*hot spots*”) e estabelecida como: negativa; 1+, para campos com até 1% de células neoplásicas marcadas; ou 2+, para expressão em mais de 1% das células tumorais, conforme proposto por Silva et al. (2007).

No caso de animais com múltiplos nódulos somente uma lesão foi considerada na análise estatística. A lesão eleita foi a que melhor representava o

animal considerando a tendência da expressão proteica para cada anticorpo investigado.

4.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

A análise estatística foi realizada com o auxílio dos softwares GraphPad Prism® (Versão 4.02 para Windows, Graphpad Software, Inc. - San Diego, CA, USA) e Bioestat® (Versão 5.0, Universidade Federal do Pará, Brasil). Os resultados de imunoexpressão foram comparados à classificação em três graus histopatológicos de malignidade (PATNAIK et al., 1984), por meio de ANOVA/Kruskal-Wallis, seguido de pós-testes de múltiplas comparações de Dunn e à classificação em dois graus (KIUPEL et al., 2011) por pelo teste Mann-Whitney.

As associações da expressão dessas proteínas com a mortalidade dos animais em função do tumor foram analisadas pelo Teste Exato de Fisher ou de Chi-quadrado para tendências. A análise de sobrevida para cada um dos indicadores prognósticos foi realizada através do método de Kaplan-Meier, seguido de *logrank test* e, posteriormente, um painel de indicadores foi analisado pelo método de Risco Proporcional de Cox para verificar o efeito aditivo dos marcadores sobre os métodos de classificação histológica

O nível de significância foi estabelecido em 5%.

5 RESULTADOS

5.1 MATERIAL OBTIDO

Obtivemos 52 novas amostras coletadas, provenientes de clínicas e hospitais veterinários colaboradores. Destas, somente 16 casos foram utilizados no estudo e os demais excluídos por falta de acompanhamento clínico, ou em casos onde o animal foi submetido a quimioterapia no período pré-cirúrgico e/ou pós clínico. Em adição, obtivemos mais 42 amostras provenientes de arquivos histopatológicos que somadas totalizaram um número amostral 58 lesões oriundas de 50 animais.

5.2 AVALIAÇÃO DA POPULAÇÃO ESTUDADA

No presente estudo foram utilizados 50 animais, vinte e três eram fêmeas (46%) e vinte sete machos (54%). Observou-se maior incidência da neoplasia em animais sem raça definida (32%, 16/50), seguido de animais da raça Boxer (18%, 9/50), Labrador Retriever (12%, 6/50), Poodle, (10%, 5/50), Pitbull (8%, 4/50), Fila Brasileiro (6%, 3/50), Dachshund, (6%, 3/50), Doberman pinscher, Pinscher miniatura, Dogue Alemão e Golden Retriever com um exemplar de cada (2% cada).

A média de idade dos animais acometidos foi de 9 anos (variando entre 3 e 15 anos). Quanto às localizações das lesões, houve maior incidência em: extremidades/membros (41,3%, 24/58), seguida de tórax (29,3%, 17/58), região inguinal/perineal (10,3%, 6/58), e cabeça/pescoço (5,2%, 3/58). Três animais não tiveram as informações sobre localização registradas (5,2%, 3/58). Em relação a tumores múltiplos, seis animais apresentaram mais de uma lesão, cinco com dois nódulos e um com quatro nódulos, representando 12% (6/50) do total dos casos.

Quando utilizado o método de graduação de Patnaik, Ehler e MacEwen (1984), 22,4% (13/58) das lesões foram de grau I, 53,4% (31/58) de grau II e 24,1% (14/58) de grau III. Pela classificação proposta por Kiupel et al. (2011) 65,5% (38/58) dos tumores eram de baixo grau e 34,5% (20/58) de alto grau.

Os animais foram acompanhados por um período médio de 654 dias após cirurgia. Vinte e nove (58%) evoluíram para óbito, sendo que 58,6% dos óbitos foram em função do tumor. Informações sobre recidiva tumoral foram registradas em 45 dos 50 animais. Destes 37,7% apresentou recidiva (17/45), sendo que 17,64% (3/17) dos tumores era grau I, 41,17% (7/17) grau II e 41,17% (7/17) grau III, 35,9% (6/17) baixo grau e 64,70% (11/17) alto grau.

5.3 AVALIAÇÃO DAS MARCAÇÕES IMUNO-HISTOQUÍMICAS

O número de casos processados para cada anticorpo variou, pois algumas amostras de arquivo não continham material suficiente para todas as análises. Os números amostrais para os anticorpos BCL2, BAX, APAF1, Caspase 9 e Caspase 3 foram de 48, 46, 47, 44, 47, respectivamente.

Imunomarcação positiva foi observada na maioria das lesões, com variações na quantidade de células marcadas e intensidade de marcação para todas as proteínas investigadas. O padrão de marcação para todas as proteínas foi difuso e citoplasmático (Figuras 3 a 7).

Figura 3 - Imunomarcação de BCL2 em mastocitoma cutâneo canino

Fonte: BARRA, 2015

Legenda: Mastócitos neoplásicos com imunopositividade para BCL2, nota-se marcação citoplasmática difusa. (A) baixa expressão (obj. 40x); (B) alta expressão (obj. 40x); (C) alta expressão (obj. 100x); (D) Controle negativo para reação do anticorpo BCL2 (obj. 40x). Contracoloração com Hematoxilina de Harris.

Figura 4 - Imunomarcação de BAX em mastocitoma cutâneo canino

Fonte: BARRA, 2015

Legenda: Mastócitos neoplásicos com imunopositividade para BAX, nota-se marcação citoplasmática difusa. (A) baixa expressão (obj. 40x); (B) alta expressão (obj. 40x); (C) alta expressão (obj. 100x); (D) Controle negativo para reação do anticorpo BAX (obj. 40x). Contracoloração com Hematoxilina de Harris.

Figura 5 - Imunomarcação de APAF1 em mastocitoma cutâneo canino

Fonte: BARRA, 2015

Legenda: Mastócitos neoplásicos com imunopositividade para APAF1, nota-se marcação citoplasmática difusa. (A) baixa expressão (obj. 40x); (B) alta expressão (obj. 40x); (C) alta expressão (obj. 100x); (D) Controle negativo para reação do anticorpo APAF1 (obj. 40x). Contracoloração com Hematoxilina de Harris.

Figura 6 - Imunomarcação de Caspase 9 em mastocitoma cutâneo canino

Fonte: BARRA, 2015

Legenda: Mastócitos neoplásicos com imunopositividade para Caspase 9, nota-se marcação citoplasmática difusa. (A) baixa expressão (obj. 40x); (B) alta expressão (obj. 40x); (C) alta expressão (obj. 100x); (D) Controle negativo para reação do anticorpo Caspase 9 (obj. 40x). Contracoloração com Hematoxilina de Harris.

Figura 7- Imunomarcacão de Caspase 3 em mastocitoma cutâneo canino

Fonte: BARRA, 2015

Legenda: Mastócitos neoplásicos com imunopositividade para Caspase 3, nota-se marcação citoplasmática difusa. (A) baixa expressão (obj. 40x); (B) alta expressão (obj. 40x); (C) alta expressão (obj. 100x); (D) Controle negativo para reação do anticorpo Caspase 3 (obj. 40x). Contracoloração com Hematoxilina de Harris.

As amostras marcadas com os anticorpos estudados receberam escores finais que variaram entre 0 e 2, com exceção de BAX, para o qual todas as amostras foram positivas.

A comparação das expressões imuno-histoquímicas com as classificações histopatológicas estabelecidas por Patnaik, Ehler e MacEwen (1984) e Kiupel et al. (2011) não revelou diferenças estatisticamente significantes para os anticorpos anti-APAF1, anti-Caspase 9 e anti-Caspase 3 ($p>0,05$), em nenhuma das opções de análises (Tabelas 1, 2 e 3) .

Tabela 1- Distribuição dos casos analisados em função da graduação histopatológica e escores para expressão da proteína APAF1

Escore	Patnaik, Ehler e MacEwen (1984)*			Kiupel et al. (2011)**	
	Grau I	Grau II	Grau III	Baixo	Alto
0	1 (11,12%)	4 (13,80%)	1 (11,12%)	4 (12,13%)	2 (14,31%)
1	4 (44,44%)	14 (48,27%)	6 (66,66%)	14 (42,42%)	10 (71,14%)
2	4 (44,44%)	11 (37,93%)	2 (22,22%)	15 (45,45%)	2 (14,28%)
Total	9 (100%)	29(100%)	9 (100%)	33 (100%)	14 (100%)

* $p= 0,7303$, ANOVA/Kruskal Wallis, com $p>0,05$ entre os graus, pós-testes de Dunn; ** $p= 0,1243$, Mann-Whitney.

Tabela 2- Distribuição dos casos analisados em função da graduação histopatológica e escores para expressão da proteína Caspase 9

Escore	Patnaik, Ehler e MacEwen (1984)*			Kiupel et al. (2011)**	
	Grau I	Grau II	Grau III	Baixo	Alto
0	2 (20,00%)	3 (11,12%)	0 (0,00%)	5 (15,63%)	0 (0,00%)
1	1 (10,00%)	14 (51,85%)	3 (42,86%)	11 (34,37%)	7 (58,35%)
2	7 (70,00%)	10 (37,03%)	4 (57,14%)	16 (50,00%)	5 (41,65%)
Total	10 (100%)	27 (100%)	7 (100%)	32 (100%)	12 (100%)

* $p= 0,3364$, ANOVA/Kruskal Wallis, com $p>0,05$ entre os graus, pós-testes de Dunn; ** $p= 0,9788$ Mann-Whitney.

Tabela 3- Distribuição dos casos analisados em função da graduação histopatológica e escores para expressão da proteína Caspase 3

Escore	Patnaik, Ehler e MacEwen (1984)*			Kiupel et al. (2011)**	
	Grau I	Grau II	Grau III	Baixo	Alto
0	3 (27,27%)	6 (20,70%)	3 (42,85%)	8 (22,86%)	4 (33,34%)
1	5 (45,46%)	15 (51,72%)	3 (42,85%)	17 (48,57%)	6 (50,00%)
2	3 (27,27%)	8 (27,58%)	1 (14,30%)	10 (28,57%)	2 (16,66%)
Total	11 (100%)	29 (100%)	7 (100%)	35 (100%)	12 (100%)

* $p=0,5067$, ANOVA/Kruskal Wallis, com $p>0,05$ entre os graus, pós-testes de Dunn; ** $p=0,3975$ Mann-Whitney.

Observou-se resultados semelhantes na comparação da expressão de BCL2 com a classificação histopatológica proposta por Patnaik, Ehler e MacEwen (1984) ($p>0,05$). Porém, quando a expressão desta proteína foi comparada com a classificação de Kiupel et al. (2011), notou-se que tumores de alto grau apresentam menor expressão de BCL2 do que MCTs de baixo grau ($p=0,0103$) (Tabela 4).

Tabela 4- Distribuição dos casos analisados em função da graduação histopatológica e escores para expressão da proteína BCL2

Escore	Patnaik, Ehler e MacEwen (1984)*			Kiupel et al. (2011)**	
	Grau I	Grau II	Grau III	Baixo	Alto
0	3 (33,34%)	7 (24,13%)	4 (40,00%)	6 (18,18%)	8 (53,34%)
1	5 (55,55%)	15 (51,74%)	6 (60,00%)	19 (57,57%)	7 (46,66%)
2	1 (11,11%)	7 (24,13%)	0 (0,00%)	8 (24,2%)	0 (0,00%)
Total	9 (100%)	29 (100%)	10 (100%)	33 (100%)	15 (100%)

* $p=0,2601$, ANOVA/Kruskal Wallis, com $p>0,05$ entre os graus, pós-testes de Dunn; ** $p=0,0103$ Mann-Whitney.

Para a proteína BAX, por outro lado, não foram detectadas diferenças estatisticamente significantes entre os graus propostos por Kiupel et al. (2011), apesar de verificar-se uma tendência de tumores de alto grau expressarem maiores níveis desta proteína ($p=0,0542$). Essa tendência foi reforçada quando da comparação com a graduação proposta por Patnaik, Ehler e MacEwen (1984) ($p=0,0240$), com diferenças significantes entre tumores de grau II e grau III ($p<0,05$) (Tabela 5).

Tabela 5- Distribuição dos casos analisados em função da graduação histopatológica e escores para expressão da proteína BAX

Escore	Patnaik, Ehler e MacEwen (1984)*			Kiupel et al. (2011)*	
	Grau I	Grau II	Grau III	Baixo	Alto
1	4 (40,00%)	14 (51,85%)	0 (0,00%)	16 (50,00%)	2 (14,28%)
2	6 (60,00%)	13 (48,15%)	9 (100%)	16 (50,00%)	12 (85,72%)
Total	10 (100,00%)	27 (100%)	9 (100%)	32 (100%)	14 (100%)

* $p = 0,0240$, ANOVA/Kruskal Wallis, com $p < 0,05$ entre os graus II e III, pós-testes de Dunn; ** $p = 0,0542$ Mann-Whitney.

Com relação às análises de mortalidade em função da doença, as marcações imuno-histoquímicas para BCL2, APAF1, Caspase 9 e Caspase 3 não foram indicadores precisos ($p > 0,05$) (Tabelas 6, 7, 8 e 9).

Tabela 6- Distribuição das mortalidades relacionadas ou não aos MCTs e animais vivos ao final do estudo em função dos escores de expressão da proteína BCL2

Expressão	Óbitos em função do MCT	Óbitos não-relacionados	Vivos ao final do estudo
Negativo	7 (41,17%)	1 (10,00%)	6 (28,57%)
Baixa	8 (47,05%)	7 (70,00%)	11 (52,38%)
Alta	2 (11,78%)	2 (20%)	4 (19,05%)
Total	17 (100%)	10 (100%)	21 (100%)

$p = 0,1922$. Qui-quadrado = 1,701.

Tabela 7- Distribuição das mortalidades relacionadas ou não aos MCTs e animais vivos ao final do estudo em função dos escores de expressão da proteína APAF1

Expressão	Óbitos em função do MCT	Óbitos não-relacionados	Vivos ao final do estudo
Negativo	3 (18,75%)	2 (20,00%)	1 (4,77%)
Baixa	10 (62,50%)	3 (30,00%)	11 (52,40%)
Alta	3 (18,75%)	5 (50,00%)	9 (42,85%)
Total	16 (100%)	10 (100%)	21 (100%)

$p = 0,0804$. Qui-quadrado = 3,058.

Tabela 8- Distribuição das mortalidades relacionadas ou não aos MCTs e animais vivos ao final do estudo em função dos escores de expressão da proteína Caspase 9

Expressão	Óbitos em função do MCT	Óbitos não-relacionados	Vivos ao final do estudo
Negativo	0 (0,00%)	1 (10,00%)	4 (21,00%)
Baixa	8 (53,34%)	1 (10,00%)	9 (42,10%)
Alta	6 (46,66%)	8 (80,00%)	7 (36,90%)
Total	14 (100%)	10 (100%)	20 (100%)

p= 0,6640. Qui-quadrado= 0,1888.

Tabela 9- Distribuição das mortalidades relacionadas ou não aos MCTs e animais vivos ao final do estudo em função dos escores de expressão da proteína Caspase 3

Expressão	Óbitos em função do MCT	Óbitos não-relacionados	Vivos ao final do estudo
Negativo	5 (35,70%)	5 (41,67%)	2 (9,52%)
Baixa	6 (42,85%)	3 (25,00%)	14 (66,66%)
Alta	3 (21,45%)	4 (33,33%)	5 (23,90%)
Total	14 (100%)	12 (100%)	21 (100%)

p= 0,3720. Qui-quadrado= 0,7969.

Contudo, a imunomarcacão de BAX foi capaz de prever a mortalidade relacionada aos mastocitomas (p= 0,0303) (Tabela 10), com animais cujos tumores possuíam altos níveis de BAX apresentando risco 3 vezes maior de morte em decorrência do tumor (Gráfico 1).

Tabela 10- Distribuição das mortalidades relacionadas ou não aos MCTs e animais vivos ao final do estudo em função dos escores de expressão da proteína BAX

Expressão	Óbitos em função do MCT	Óbitos não-relacionados	Vivos ao final do estudo
Alta	14(82,35%)	5(45,45%)	9(50%)
Baixa	3(17,65%)	6(54,55%)	9(50%)
Total	17(100%)	11(100%)	18(100%)

p= 0,0303, Teste Exato de Fisher; sensibilidade = 82,3%; especificidade = 51,7%

Gráfico 1- Representação da relação da expressão de BAX e mortalidade em função do tumor e casos censurados (mortes não- relacionadas à neoplasia e animais vivos ao final do estudo)

Legenda: Teste Exato de Fisher ($p = 0,0303$)

Com relação às análises de sobrevida, somente a expressão de BAX apresentou valor prognóstico ($p = 0,0284$) (Tabela 11): animais com tumores apresentando alta expressão de BAX sobreviveram por menor período pós-cirúrgico, com mediana de sobrevida de 751 dias para este grupo (Gráfico 2).

Tabela 11- Resultados das análises de sobrevida pelo método de Kaplan-Meier em função dos escores de expressão das proteínas BCL2, BAX, APAF1, Caspase 9 e Caspase 3

Proteína	Qui-quadrado	Significância (p)
BCL2	1,701	0,1922
BAX	4,802	0,0284
APAF1	3,187	0,2032
Caspase 9	3,310	0,1911
Caspase 3	1,026	0,5986

Gráfico 2- Curva de Sobrevida (Kaplan-Meier) dos pacientes estudados, em função da expressão imuno-histoquímica para BAX

Legenda: (Logrank Test, chi-quadrado = 4,802, $p = 0,0284$, mediana de sobrevida = 751 dias para o grupo de alta expressão).

Com o objetivo de estimar os efeitos aditivos da análise imuno-histoquímica para as proteínas estudadas sobre os tradicionais métodos de classificação histológica na previsão da sobrevida dos animais, realizou-se análise de múltiplas variáveis com o modelo de Risco Proporcional de Cox.

No primeiro modelo, em que foram colocadas como variáveis preditivas somente as graduações histológicas, houve diferenças estatisticamente significantes (qui-quadrado = 23,1009; $p < 0,0001$). Tanto a graduação em três graus ($p = 0,0314$; taxa de risco = 4,65), quanto a graduação em dois graus ($p = 0,0271$; taxa de risco = 5,19) apresentaram valor prognóstico.

No segundo modelo, foram introduzidas a classificação em três graus e as proteínas investigadas, também com resultado estatisticamente significativo (qui-quadrado = 25,3849; $p = 0,0003$). No entanto, somente a expressão de APAF1 apresentou resultado significativo ($b = -1,3220$; $p = 0,0278$) adicional à graduação de

Patnaik, Ehler e MacEwen (1984). A taxa de risco para animais com tumores apresentando maior expressão de APAF1 é 73,3% menor (Tabela 12).

Tabela 12- Resultados da análise de sobrevida pelo modelo Proporcional de Cox, com modelo avaliando a graduação de Patnaik, Ehler e MacEwen (1984) associada às expressões de BCL2, BAX APAF1, Caspase 9 e Caspase 3

Variável	Coeficiente b	Significância (p)	Taxa de Risco
Patnaik	3,2129	0,0003	248517
BCL2	0,0341	0,9538	1,0347
BAX	0,4483	0,6759	1,5656
APAF1	-1,3220	0,0278	0,2666
Caspase 9	0,3984	0,4937	1,4895
Caspase 3	08198	0,2132	2,2700

Análise de Risco Proporcional de Cox. (Qui-quadrado = 23,1009, p= 0,0003)

Posteriormente, com a substituição da classificação em três graus pela classificação em dois graus e o resultado foi estatisticamente significativo (qui-quadrado = 26,774, e p=0,0002). Entretanto, somente a expressão de BCL2 apresentou resultado significativo adicional à graduação de Kiupel et al. (2011) (b=1,7584; p=0,0215). O risco para animais que apresentaram menor expressão BCL2 foi 5,8 vezes maior comparado a animais com maior expressão desta proteína (Tabela 13).

Tabela 13- Resultados da análise de sobrevida pelo modelo de Risco Proporcional de Cox avaliando a graduação de Kiupel et al. (2011) associadas às expressões de BCL2, BAX, APAF1, Caspase 9 e Caspase 3

Variável	Coeficiente b	Significância (p)	Taxa de Risco
Kiupel	3,4228	<0,0001	30,6561
BCL2	1,7584	0,0215	5,8031
BAX	0,9181	0,3811	2,5045
APAF1	-0,9396	0,0792	0,3908
Caspase 9	0,6067	0,3133	1,8344
Caspase 3	-0,0978	0,8599	0,9068

Análise multivariada de risco proporcional de Cox. (Qui-quadrado = 26,774, p= 0,0215)

6 DISCUSSÃO

6.1 MATERIAL OBTIDO

No presente estudo, obtivemos um total de 58 casos de mastocitomas cutâneos caninos de forma retrospectiva e prospectiva. Todos os animais selecionados no estudo tiveram o levantamento de dados clínicos por meio entrevistas com veterinários responsáveis, proprietários e análise de prontuários hospitalares.

Nas amostras obtidas dos arquivos histopatológicos encontramos dificuldades nas análises das imunomarcações pela falta de padronização das coletas, fixação do material e qualidade do processamento histopatológico. Amostras mal fixadas podem gerar autólise das células, por consequência problemas de interpretação da análise. Em contrapartida, amostras fixadas em excesso podem ocasionar a formação de pigmentos de formol influenciando no resultado da análise. Por este motivo, algumas/uma parte das amostras teve que ser descartada do estudo, mostrando a importância do bom planejamento de colheita de dados e dos cuidados com a preservação adequada dos materiais de pesquisa.

6.2 POPULAÇÃO ESTUDADA E CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

O presente estudo relatou um maior acometimento dos MCTs em machos, porém com uma diferença pequena em relação às fêmeas, em concordância com as observações de White et al. (2011), que apontam maior incidência de MCTs em machos não-castrados. Entretanto a grande parte dos estudos não comprovam a predisposição sexual para acometimento dessa neoplasia (FINNIE; BOSTOCK, 1979; PATNAIK; EHLE; MACEWEN, 1984; BOSTOCK, 1986; MACY, 1986; LONDON; SEGUIN, 2003).

Obtivemos 32% dos casos representados por animais sem raça definida e 68% dos casos por animais de raça. Entre os últimos, a raça Boxer foi a mais

prevalente, o que corrobora com a maior parte dos estudos os quais relatam maior incidência nas raças Boxer, seguido de Labrador Retriever, como as mais prevalentes (VILLAMIL et al., 2011; WARLAND; DOBSON, 2013).

A idade média dos animais ao diagnóstico foi de 9 anos, corroborando dados de literatura. Apesar disso, animais jovens, com menos de um ano de vida, não estiveram presentes, sendo a idade mínima observada de 3 anos (PATNAIK; EHLER; MACEWEN, 1984; MILLER, 1995; THOMSON, 2011; THAMM; VAIL, 2001; MISDORP, 2004; O'CONNELL; WELLE et al., 2008; KUPFER, 2010).

A incidência de nódulos únicos foi de 76% dos casos, semelhantemente ao observado por outros autores, que relatam incidências de múltiplas lesões variando de 3 até 25% dos casos (MACY, 1985; O'KEEFE, 1990; SIMÕES; SCHONING; BUTINE, 1994; MULLINS et al., 2006; MURPHY et al., 2006; THAMM; VAIL, 2007).

As regiões corpóreas mais acometidas foram membros/extremidades, seguida de região de tronco, que somadas totalizaram 70,6% das lesões. A literatura descreve taxas semelhantes, com adição da região de cabeça/pescoço (BRODEY, 1970; BOSTOCK, 1973; ROTHWELL et al., 1987; SFILIGOI et al., 2005).

A graduação histopatológica dos MCTs ainda é uma questão que gera bastante discussão principalmente em tumores que são classificados em situações limítrofes entre os graus. A classificação de Patnaik, Ehler e MacEwen (1984) é a mais utilizada, porém em nosso estudo classificamos os tumores baseado tanto na classificação em 3 graus, quanto pela graduação em dois graus proposta por Kiupel et al. (2011). No presente trabalho, prevaleceram os MCTs de grau II, e neoplasias de baixo grau, reafirmando com dados de grande parte da literatura (PATNAIK; EHLER; MACEWEN, 1984; BAKER-GABB; HUNT; FRANCE, 2003; DOBSON et al., 2004; KIUPEL et al., 2004; SPUGNINI et al., 2006; BROCKS et al., 2008; TAKEUCHI et al., 2013).

As taxas de recidiva tumoral foram de 37,7%. Apesar de as ressecções cirúrgicas terem sido preconizadas e realizadas de forma ampla, visando a cura, não foi possível obter informações na grande maioria dos casos sobre as condições das margens. Nosso resultado apresentou taxa de recidiva superior quando comparado aos dados de Weisse, Shofer e Sorenmo (2002), os quais analisaram somente neoplasias de grau II sem quimioterapia pós-cirúrgica, porém com tratamento neoadjuvante até duas semanas antes da cirurgia, demonstrado taxas de recidiva de 33%.

Em relação à mortalidade dos animais, nosso estudo apontou um número de 29 animais que evoluíram para óbito dentro do período de acompanhamento. Destes animais que vieram a óbito, 58,6% foi em decorrência da neoplasia. Obtivemos taxa de mortalidade superior quando comparada ao trabalho de Patnaik, Ehler e MacEwen (1984), os quais registraram índice de mortalidade de 46%, com prevalência de tumores de grau II que atingiram 43% dos casos.

6.3 ANÁLISES IMUNO-HISTOQUÍMICAS

Apoptose é um processo de morte celular ordenado que ocorre em condições fisiológicas e patológicas, desempenhando um papel crucial na patogênese de muitas doenças. No câncer esse processo é falho com frequência, resultando na permanência de células malignas no organismo. Pela sua importância, o mecanismo apoptótico vem sendo um dos principais tópicos abordados na pesquisa do câncer atualmente e seu entendimento, em particular a via intrínseca, poderá contribuir e direcionar melhor os tratamentos quimioterápicos e radioterápicos das neoplasias (LOWE; LIN, 2000).

São escassos os trabalhos científicos na oncologia veterinária abordando proteínas associadas à apoptose. A possibilidade do papel de algumas moléculas que participam da via intrínseca como as investigadas neste estudo na progressão de MCTs cutâneos caninos nunca tinham sido investigadas anteriormente nestes tumores.

Sabe-se que o processo apoptótico leva a mudanças específicas na arquitetura nuclear, assim como fragmentação do núcleo, as quais tem sido bons marcadores citológicos específicos da apoptose. Por sua vez, o sucesso na detecção do mesmo depende necessariamente da técnica utilizada e do tipo de amostra estudada. Atualmente a utilização de técnicas em cortes de parafina vem sendo bem empregada pela riqueza de informações que ela disponibiliza, e uma de suas aplicações consiste na técnica de imuno-histoquímica comumente utilizada para estudos de apoptose *in situ* (WYLLIE, 1992).

Baseado nessas informações, escolhemos esse método para quantificar e analisar a expressão das proteínas da via intrínseca da apoptose abordadas no

estudo. Em contribuição, a técnica apresenta diversas vantagens como baixo custo de reagentes utilizados e otimização dos mesmos, é plausível de visualização em microscópio de luz tornando-a mais aplicável em laboratórios de rotina, além de permitir a visualização da localização celular exata das proteínas (BRANDTZAEG et al., 1998).

Diversas formas de quantificação da técnica de imuno-histoquímica são utilizadas baseadas na coloração castanha que as células adquirem como resultado da reação com cromógeno aplicado no procedimento. A quantificação pode ser realizada através de métodos que consideram a porcentagem de células marcadas e intensidade de marcação, ou métodos que analisam somente a porcentagem de marcação das lesões (COTSONIS et al., 2005; HAO et al., 2007; MYLONA et al., 2007).

No presente estudo optamos pelo método de escore misto para análise das proteínas abordadas, considerado mais adequado para amostras que apresentaram variação na intensidade e quantidade de células marcadas. Através dessa técnica avaliamos os mastócitos neoplásicos para cada marcador prognóstico e associamos as expressões destes com graduação tumoral, mortalidade em função da neoplasia e sobrevida, com objetivo de estabelecer possíveis indicadores prognósticos.

6.3.1 Expressão BCL2

A razão da concentração de BCL2:BAX é um fator chave na apoptose e pode determinar decisões críticas favorecendo ou não a morte celular por apoptose (ADAMS; CORY, 1998). A explicação para isso se dá pela capacidade que BAX e BCL2, têm para formar homo ou heterodímeros. A ação pró-apoptótica da proteína BAX é dependente da formação de homodímeros que se inserem na membrana mitocondrial interna. Por outro lado, o efeito antagonista de BCL2 tem sido parcialmente explicado pela sua capacidade de formar heterodímeros de com BAX, prevenindo a formação de poros na mitocôndria, principal função de BAX, e, por consequência, impedindo o efeito apoptótico. No câncer, as razões dessas duas proteínas podem estar em desequilíbrio e levar ao aumento e diminuição de expressão de ambas (HATA; ENGELMAN; FABER, 2015).

O desequilíbrio e superexpressão de BCL2 pode ocorrer em consequência de translocações cromossômicas, amplificação gênica ou aumento na transcrição do gene. Altos níveis de BCL2 foram detectados em uma variedade de neoplasias, incluindo tumores de pequenas células de pulmão, tumores de mama, neoplasias de próstata, cânceres colorretal e de bexiga, melanoma, malignidades linfoides e leucemia mieloide aguda resistente a quimioterapia (REED, 1998; YIP; REED, 2008). Em tumores de mama triplo negativo “*basal-like*”, a alta expressão de BCL2 foi indicadora de pior prognóstico em pacientes tratados com quimioterapia (BOUCHALOVA et al., 2015) (no prelo)⁶.

Na oncologia veterinária, poucos trabalhos demonstram o papel de BCL2 até o momento. Vascellari et al. (2013) observaram em mastocitomas caninos, que a expressão gênica de BCL2 foi significativamente mais alta em mastocitomas de grau II e grau III e associada com aumento na taxa de mortalidade. Entretanto, o nível de proteína não apresentou relação com nenhum dos sistemas de graduação.

Contrapondo os resultados obtidos por Vascellari et al. (2013), o presente estudo comprova que a expressão de BCL2 é significativamente mais baixa em mastocitomas de alto grau. Além disso, foi observado que BCL2 é um potencial indicador prognóstico e que a diminuição na sua expressão aumenta em 5,8 vezes o risco de óbito do animal em função da neoplasia no período pós-cirúrgico. Estes resultados corroboram as observações em outros tumores humanos, principalmente em tumores de mama hormônio dependentes (PAIK; SHAK; TANG, 2004) e tumores de mama triplo negativo, em que a menor expressão de BCL2 dobra o risco de morte em função do tumor e recorrência (CALLAGY; PHAROAH; PINDER, 2006; DAWSON; MAKRETsov; BLOWS, 2010).

Essas diferenças de expressão podem ser explicadas através de mecanismos que influenciam os níveis de BCL2 em cânceres. Uma possível causa está associada à perda de TP53 que pode atuar reprimindo a transcrição de BCL2 em alguns cenários. Basu e Haldar (1994) notaram correlação entre a expressão das proteínas BCL2 e TP53 em várias linhagens humanas de células tumorais de mama, sugerindo que a perda de TP53 pode ser compensada pela regulação positiva ou negativa de BCL2. Em células MCF-7 que expressavam TP53 mutante, houve

⁶ BOUCHALOVA, K.; MAREK, S.; KHARAISHVILI, G.; VRBKOVA, J.; BOUCHAL, J. R.; KOUDELAKOVA, V.; RADOVA L.; CWIERTKA, K.; HAJDUCH, M.; KOLAR, Z. BCL2 is an independent predictor of outcome in basal-like triple-negative breast cancers treated with adjuvant anthracycline-based chemotherapy. **Tumor Biology**, 2015. (no prelo).

diminuição na expressão de BCL2. Já em linhagens celulares de leucemia originadas de camundongos deficientes de *TP53*, a indução de TP53, bem como a indução da mesma através de radiação gama levou à repressão na expressão gênica de *BCL2* levando a morte das células por apoptose (MIYASHITA et al., 1994; SELVAKUMARAN et al., 1994).

A literatura elucida algumas possíveis explicações moleculares entre a associação de TP53 e diminuição de BCL2. A primeira consiste na indução da transativação de antagonistas de BCL2, como BAX, resultando no aumento da mesma e diminuição de BCL2. No entanto, esse fato não está completamente esclarecido. Ainda, sabe-se que o domínio promotor do gene *BCL2* contém um elemento resposta negativo-P53, levantando a possibilidade de que *BCL2* seja um alvo direto de transrepressão mediada por mutações em *TP53* (HEMANN; LOWE, 2006). Por fim, TP53 pode também impactar diretamente a atividade de BCL2, se ligando a membros citoplasmáticos da família Bcl-2, e atuar como proteína “*BH3-only*”, antagonizando a função de BCL2, o que irá gerar o aumento permeabilidade da membrana mitocondrial culminando em apoptose (MOLL et al., 2005).

6.3.2 Expressão BAX

A variação na expressão de BAX pode ser correlacionada com diversos processos biológicos dependendo do contexto e, no caso de tecidos neoplásicos, a expressão proteica da mesma pode ser encontrada em diversas situações. Em tumores colorretais humanos, a expressão de BAX não foi alterada quando comparados a tecidos da mucosa adjacente (MAURER et al., 1998). Ainda, em carcinomas de mama *in situ* com potencial metastático, 98% apresentaram expressão positiva de BAX. No entanto, 34% das células que infiltraram através do estroma tiveram perda completa ou parcial dessa expressão, as quais representavam a doença metastática (KRAJEWSKI et al., 1995). Grande parte dos estudos associa a diminuição da expressão de BAX com menor tempo de sobrevida e alta taxa de mortalidade, como demonstrado em carcinomas humanos de bexiga e carcinoma de pequenas células de pulmão, sugerindo que a diminuição da apoptose

leva a manutenção de células neoplásicas no tecido (GONZALEZ-CAMPORA et al., 2007; JEONG et al., 2008).

Apesar disso, outra abordagem destaca a associação da apoptose com o aumento da malignidade do tumor, sendo clara correlação existente entre alta expressão de proteínas pró-apoptóticas com pior prognóstico (KAHLOS et al., 2000; RAY et al., 2002). Em tumores mamários e ovarianos de mulheres, carcinoma esofágico de células escamosas e osteossarcoma humanos, a alta expressão proteica de BAX foi correlacionada com prognóstico desfavorável (BINDER et al., 1996; MARX et al., 1997; KURABAYASHI et al., 2001; KASETA et al., 2007). Ainda, a superexpressão de BAX se mostrou associada ao aumento na probabilidade de recidiva em leucemias linfocíticas agudas em crianças (HOGARTH; HALL, 1999).

Na oncologia veterinária, a avaliação de BAX por imuno-histoquímica já havia sido realizada por Strefezzi et al. (2012), os quais concluíram que a alta expressão de BAX em MCTs está relacionada com malignidade tumoral, mortalidade e sobrevida. O estudo associou altos níveis dessa proteína com mortalidade em função do tumor e risco de morte de até 4,25 vezes maior em cães que apresentaram alta expressão de BAX. O presente trabalho confirma estes resultados e corrobora dados da literatura humana e veterinária. Reafirmamos a importância da proteína BAX como potencial indicador prognóstico, de mortalidade e sobrevida, sendo que sua expressão pode aumentar em até 3 vezes o risco de óbito em função do tumor.

Diversas possíveis explicações relacionam a hiperexpressão de BAX com malignidade tumoral. Uma hipótese seria que a pressão seletiva que ela exerce sobre as células neoplásicas levaria à sobrevivência das mais adaptadas e resistentes, tendo por consequência a formação de neoplasias mais agressivas (GUROVA; GUDKOV, 2003). Outra hipótese relaciona mutações no domínio de ligação de DNA no gene *TP53*, como demonstrado em cânceres de pequenas células de pulmão (HUANG et al., 1999). A potencial base molecular para esse evento consiste no aumento da transcrição de proteínas não funcionais e aumento na transcrição de análogos, que por sua vez irão potencializar os efeitos pró-apoptóticos de BAX (MEIJERINK et al., 1998). Por outro lado, excesso de síntese proteica de proteínas mutantes não funcionais pode gerar ao acúmulo da mesma no citoplasma ou translocação para a membrana mitocondrial. Esse evento irá prejudicar seu efeito pró-apoptótico, e ocasionar o acúmulo e manutenção de células

mutadas no tumor (MEIJERINK et al., 1998; KURABAYASHI et al., 2001; ADAMS; CORY, 2007).

Em adição, a literatura relata uma variedade de mutações no gene *BAX* que podem afetar a capacidade de dimerização da proteína *BAX* e gerar aumento compensatório na expressão da mesma, como observado em 21% das malignidades hematopoiéticas humanas, incluindo leucemia linfocítica aguda e cânceres gastrointestinais (MEIJERINK et al., 1998; GIL et al., 1999).

Diante dessa abordagem, fica evidente a importância de *BAX* na progressão tumoral e malignidade dos MCTs e sua correlação inversa com *BCL2*, como discutido anteriormente. Faz-se necessária a investigação de outras proteínas que possam estar associadas a variações de suas concentrações nas células e de possíveis mutações em ambas.

6.3.3 Expressão de APAF1

APAF1 é um gene alvo transcricional de *TP53* e está intimamente ligado com genes indutores de cânceres e supressores tumorais assim com os genes *BCL2* e *TP53*. (FU et al., 2003). Grande parte da literatura humana associa a perda ou ausência de expressão de *APAF1* com progressão e estágios mais avançados do câncer em melanomas cutâneos (BALDI et al., 2004) e tumores colorretais (ZLOBEC et al., 2007). Também foram encontradas associações com metástase em linfonodos em tumores de cérvix de mulheres (LEO et al., 2005). Em neoplasias testiculares, a expressão de *APAF1* diminuiu gradualmente, sendo correlacionada com menor diferenciação dos tumores (BEHJATI et al., 2011).

Resultados similares foram encontrados em adenocarcinomas mamários, os quais tiveram baixa expressão de *APAF1*, principalmente nos de maior grau histopatológico (VINOTHINI; MURUGAN; NAGINI, 2011). Paink et al. (2007) demonstraram que em tumores colorretais, a redução da expressão dessa proteína foi um evento tardio na progressão e está correlacionada com invasão tumoral e metástases. Por sua vez, nesta mesma neoplasia, a expressão de *APAF1* se mostrou como um potencial marcador preditivo, o qual foi correlacionado com maior

sobrevivência em pacientes submetidos à terapia antineoplásica (HECTOR et al., 2012).

Apesar da perda ou ausência de expressão de APAF1 estar associada a neoplasias mais malignas na maioria das pesquisas disponíveis, encontramos apenas uma tendência de tumores de maior graduação apresentarem um menor número de células marcadas para APAF1, não significante nos testes estatísticos aplicados. Por outro lado, reportamos que tumores que expressam APAF1 apresentam redução de 73,3% no risco de óbito em função da neoplasia, quando a expressão é avaliada em conjunto com a graduação histológica.

Possivelmente, a perda de expressão de APAF1 esteja associada a defeitos em reguladores de apoptose, como relatado em diversas neoplasias humanas, contribuindo para a carcinogênese e resistência a quimioterapias. Sabe-se que *APAF1* é um gene supressor tumoral raramente mutado. Porém, ocorre metilação em regiões promotoras e perda funcional do mesmo em decorrência da perda de heterozigosidade (LOH), como demonstrado em cânceres de cólon, ovário e melanomas (FU et al., 2003; HUANG et al., 2004; ROMAN-GOMEZ et al., 2007). Mecanismos epigenéticos de regulatórios, como a metilação de domínios promotores, podem inibir sua transcrição (ROMAN-GOMEZ et al., 2007).

Outra hipótese está associada à perda de *APAF1* com ausência de TP53 “wild type”, que leva à diminuição a expressão endógena de APAF1 e gera resistência das células à apoptose (HO; BUSH; LI, 2003). Uma possível explicação molecular para essa hipótese se dá pelo fato de *APAF1* ser um gene efetor “downstream” da apoptose mediada por TP53, ou seja, ele contém um alvo de ligação para TP53, que confere ativação transcricional do gene *APAF1* quando TP53 está ativa. Portanto, a perda direta de TP53 pode ocasionar a transformação oncogênica de *APAF1*. Além disso, outros genes supressores tumorais como *ZAC1*, um fator de transcrição e coativador de TP53, podem ser alterados e afetar o funcionamento de TP53 levando à inativação de APAF1 (ROZENFELD-GRANOT et al., 2002).

Os resultados aqui apresentados sugerem um papel de APAF1 como supressor tumoral nos MCTs, sendo necessárias análises futuras e mais aprofundadas para melhor esclarecimento.

6.3.4 Expressão de Caspase 9 e Caspase 3

As expressões das caspases 9 e 3 não diferiram de forma significativa na comparação entre os graus histológicos, nem apresentaram influências na mortalidade e tempo de sobrevivência dos animais investigados. Grande parte da literatura relata que, ao contrário de outros genes relacionados à apoptose, mutações nos genes que de caspases não são comuns em células tumorais e, apesar de limitados, dados experimentais apontam que não estão associados diretamente no desenvolvimento das neoplasias, já que genes *CASP* não são supressores tumorais clássicos (JÄGER; ZWACKA, 2010).

Ensaio com inibidores de caspases e estudos genéticos têm demonstrado que a inativação isolada das mesmas geralmente não é o suficiente para impedir a continuação da cascata de caspases ou inviabilizar o mecanismo de morte celular não-apoptótico (MCILWAIN; BERGER; MAK, 2013).

Diante disso, mecanismos não correlacionados a mutações podem levar à desregulação das Caspases, e vários cenários podem elucidar essas alterações. Uma importante causa para essas alterações está associada à ocorrência de *splicing* alternativo que leva a formação de novas variantes e aumento de expressão, podendo interferir na apoptose (JÄGER; ZWACKA, 2010). Outra explicação consiste no bloqueio das caspases por proteínas inibidoras, especificamente a proteína XIAP, a qual contém domínio de ligação para as caspases 3, 7 e 9, e vem sendo detectada em neoplasias humanas. É possível que essas proteínas inibidoras desativem as caspases poupando a ocorrência de mutações e silenciamento das mesmas durante a tumorigênese (PHILCHENKOV et al., 2004).

Outra hipótese seria a de que células tumorais não precisam sofrer mutações ou silenciamento para a desativação das vias de regulação das mesmas. Vias de sinalização tais como PI3K/AKT ou via RAS/MAPK podem impedir a apoptose pela fosforilação de proteínas da família Bcl-2, ou pela fosforilação de caspases, em particular a caspase 9. Em adição, mecanismos de morte celular independentes de caspases foram demonstrados em cultivo de células tumorais comprovando que a morte celular estava associada com perda do potencial da membrana mitocondrial (JÄGER; ZWACKA, 2010).

Apesar de a literatura relatar baixa incidência de mutações em *CASP*, mutações específicas associadas a diversos tumores e estágios de transformação têm sido demonstradas em neoplasias humanas, sendo que algumas delas são detectadas como polimorfismos os quais afetam a expressão ou atividade, interferindo na progressão tumoral (MCILWAIN; BERGER; MAK, 2013). Kelly et al. (2010) demonstraram que *CASP9* estava alterada tanto a nível de gene, quanto alterações de SNP associando com desenvolvimento de linfoma não-Hodgkin. Em adição, níveis de expressão de Caspase 9 em tumores de cólon estavam diminuídos em 46% quando comparados à mucosa normal, e aumentados em tumores gástricos humanos (PALMERINI et al., 2002; YOO et al., 2002).

Ainda sendo pouco frequentes, mutações somáticas em Caspase 3 têm sido detectadas em tumores de estômago, cólon, linfoma não-Hodgkin e carcinoma hepatocelular. Devarajan et al. (2002) observaram que aproximadamente 75% dos tumores de mama em mulheres tinham perdido a expressão de Caspase 3 tanto em nível de transcrição, quanto em nível proteico. Além disso, células de tumor de mama MCF-7 as quais não expressaram caspase 3 devido a mutação de deleção no gene *CASP3*, foram relativamente insensíveis a quimioterápicos (ECK-ENRIQUEZ et al., 2000).

Resultados divergentes foram relatados por Nakopoulou et al. (2001), os quais avaliaram a expressão de caspase 3 por imuno-histoquímica em tecido mamários neoplásicos e observaram a alta expressão da mesma. Outra explicação para essa discrepância pode ser devido *CASP3* dar origem a variantes de *splicing* alternativo conhecidas como Caspase 3s, com funções anti-apoptóticas (HUANG et al., 2001).

Poucos trabalhos demonstram o papel dessa proteína na tumorigênese em animais. A baixa regulação de caspase 3 em tumores de mama caninos foi associada à superexpressão de proteínas “*heat shock proteins*”, as quais são responsáveis pela citoproteção e inibição da apoptose (KUMARAGURUPARAN et al., 2005)

Apesar de não terem sido encontradas diferenças estatisticamente significantes em relação às expressões de caspases 9 e 3, observamos uma tendência de tumores de maior grau apresentarem menor número de células positivas para caspase 3. O aumento do número de casos processados e analisados para ambas as Caspases abordadas no estudo, pode trazer resultados mais

precisos. Alternativamente, outros métodos de quantificação das reações de caspase 3 podem ser testados, para definir se a avaliação de “*hot spots*” é a mais adequada para esta proteína.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo caracterizou a expressão imuno-histoquímica das principais proteínas participantes da via intrínseca da apoptose em MCTs cutâneos caninos, com o objetivo de identificar marcadores prognósticos para esta doença e, possivelmente preditivos. Notamos que a desregulação desta via está presente nesta neoplasia e, especialmente BAX, BCL2 e APAF1 possuem valores prognósticos. BAX confirmou-se como um indicador independente de sobrevida e de mortalidade em função da doença, enquanto que APAF1 e BCL2, por sua vez, auxiliaram as tradicionais graduações histopatológicas a prever a sobrevida pós-cirúrgica.

A partir dos resultados obtidos, sugere-se que a via mitocondrial está de fato alterada nos mastocitomas, justificado pela grande diferença de expressão entre BAX e BCL2. Entretanto os dados não comprovam se as células neoplásicas estão realmente finalizando a via e concluindo a apoptose.

Visto que as marcações imuno-histoquímicas para o membro pró-apoptótico foi maior, e a do membro anti-apoptótico menor, em mastocitomas mais agressivos, hipotetizamos a ocorrência de possíveis mutações em genes responsáveis pela regulação dessas proteínas-chave na iniciação do mecanismo apoptótico. É sabida a importância do gene *TP53* na regulação da via intrínseca e seu papel na tumorigênese em grande parte das neoplasias humanas. Diante disso, sugerimos a possibilidade de *TP53* ter sofrido alguma mutação nestes tumores. Contudo, apesar de alguns autores terem investigado a imunomarcação de TP53 em mastocitomas cutâneos caninos, resultados significantes não foram detectados, tampouco associados com parâmetros de malignidade, mortalidade e sobrevida. Em adição, a investigação foi realizada somente ao nível proteico.

Sendo assim, sugerimos que a detecção da mutação neste gene possa elucidar nossa hipótese sugerida e esclarecer com mais precisão os resultados do presente estudo. Para isso, como próximos passos, seriam necessárias análises que avaliassem *TP53*, assim como *BCL2*, *BAX* e *APAF1*, tanto ao nível proteico, quanto a possíveis mutações, com o propósito de melhor investigação e entendimento da via intrínseca da apoptose nos MCTs cutâneos caninos.

8 CONCLUSÕES

- MCTs de maior grau histopatológico apresentam maior expressão imuno-histoquímica da proteína BAX, maiores índices de mortalidade em função do tumor e menor sobrevida pós-cirúrgica.
- MCTs de maior grau histopatológico apresentam menor expressão imuno-histoquímica da proteína BCL2, sendo que as marcações para esta proteína adicionaram valor prognóstico à classificação histopatológica em dois graus.
- A imunomarcação da proteína APAF1, por sua vez, adicionou valor prognóstico à graduação histológica de Patnaik et al. (1984), reduzindo o risco de óbito no período de acompanhamento pós-cirúrgico.
- As proteínas Caspase 9 e Caspase 3 estão presentes no citoplasma de mastócitos neoplásicos, entretanto não apresentaram associações com as graduações histopatológicas, nem foram indicadores eficientes quanto à mortalidade e sobrevida pós-cirúrgica.

REFERÊNCIAS

- ABADIE, J. J.; AMARDEILH, M. A.; DELVERDIER, M. E. Immunohistochemical detection of proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 in mast cell tumors from dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 215, p. 1629-1634, 1999.
- ADAMS, J. M.; CORY, S. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. **Oncogene**, v. 26, p. 1324–1337, 2007.
- ALNEMRI, E. S.; LIVINGSTON, D. J.; NICHOLSON, D. W.; SALVESEN, G.; THORNBERRY, N. A; WONG, W. W; YUAN, J.; Human ICE/CED-3 protease nomenclature [letter]. **Cell**, v. 87, p.171, 1996.
- ALTUCCI, L.; GRONEMEYER, H. The promise of retinoids to fight against cancer .Review. **Nature Reviews Cancer**, v. 1, n. 3, p.181–193, 2001.
- AVERY-KIEJDA, K. A.; BOWDEN, N. A.; CROFT, A. J.; SCURR, L. L.; KAIRUPAN, C. F.; ASHTON, K. A.; TALSETH-PALMER, B. A.; RIZOS, H.; ZHANG X. D.; SCOTT, R. J.; HERSEY, P. P53 in human melanoma fails to regulate target genes associated with apoptosis and the cell cycle and may contribute to proliferation. **BMC Cancer**, v.11 p. 203, 2011.
- AYL, R. D.; COUTO, C. G.; HAMMER, A. S.; WEISBRODE, S.; ERICSON, J. G.; MATHES, L. Correlation of DNA ploidy to tumor histologic grade, clinical variables, and survival in dogs with mast cell tumors. **Veterinary Pathology**, v. 29, p. 386-390, 1992.
- BAGINSKI, H.; DAVIS, G.; BASTIAN, R. P. The prognostic value of lymph node metastasis with grade 2 MCTs in dogs: 55 cases (2001-2010). **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 50, n. 2, p. 89–95, 2014.
- BAI, L.; ZHU, W. G. P53: structure, function and therapeutic applications. *Journal Cancer Mol.* v. 2(4), p. 141-153, 2006.
- BAKER-GABB, M.; HUNT, G. B.; FRANCE, M. P. Soft tissue sarcomas and mast cell tumours in dogs; clinical behavior and responses to surgery. **Australian Veterinary Journal**, v. 81, n. 12, p. 732-738, 2003.
- BALDI, A.; SANTINI, D.; RUSSO, P.; CATRICALA` C, AMANTEA, A.; PICARDO, M.; TATANGELO, F.; BOTTI, G.; DRAGONETTI, E.; MURACE, R.; TONINI, G.; NATALI, P. G.; BALDI, F.; PAGGI, M. G; Analysis of APAF-1 expression in human cutaneous melanoma progression. **Experimental Dermatology**, v. 13, p. 83-97, 2004.
- BASU, A.; HALDAR, S. The relationship between Bcl2, Bax and p53: consequences for cell cycle progression and cell death. **Molecular Human Reproduction**, v. 4, n. 12, p. 1099–1109, 1998.

BEHJATI, R.; KAWAI, K.; INADOME, Y.; KANO, J.; AKAZA, H.; NOGUCHI, M. APAF-1 is related to an undifferentiated state in the testicular germ cell tumor pathway. **Cancer Science**, v. 102, n. 1, p. 267–274, 2011.

BERGERON, L.; PEREZ, G.I.; MACDONALD, G. Defects in regulation of apoptosis in caspase 2 deficient mice. **Genes Development**, v.12, p. 1304-1309, 1998.

BERGIN, I. L.; SMEDLEY, R. C.; ESPLIN, D. G. Prognostic evaluation of Ki67 threshold value in canine oral melanoma. **Veterinary Pathology**, v. 48, p. 41-53, 2011.

BESMER, P.; MURPHY, J. E.; GEORGE, P. C.; QUI, F.; BERGOLD, P. J.; LEDERMAN, L.; SNYDER, H. W.; BRODEUR, D.; ZUCKERMAN, E. E; HARDY W. D. A new acute transforming feline retrovirus and relationship of its oncogene v-kit with the protein kinase gene family. **Nature**, v. 415, p. 320, 1986.

BINDER, C.; MARX, D.; BINDER, L.; SCHAUER, A.; HIDDEMANN, W. Expression of Bax in relation to Bcl-2 and other predictive parameters in breast cancer. **Ann Oncology**, v. 7, p. 129, 1996.

BLACK, R. A.; KRONHEIM, S. R.; SLEATH, P. R. Activation of interleukin-1 β by a coinduced protease. **FEBS Letter**, v. 247, p. 386–390, 1989.

BLACKWOOD, L.; MURPHY, S.; BURACCO, P.; DE VOS, J. P.; DE FORNEL-THIBAUD, P.; HIRSCHBERGER, J.; KESSLER, M.; PASTOR, J.; PONCE, F.; SAVARY-BATAILLE, K.; ARGYLE D. J. European consensus document on mast cell tumours in dogs and cats. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 10, n. 3, p. 1-29, 2012.

BOLDIN, M. P.; GONCHAROV, T. M.; GOLTSEV, Y. V.; WALLACH, D. Involvement of MACH, a novel Mort1/FADD-interacting protease, in Fas/APO1- and TNF receptor-induced cell death. **Cell**, v. 85, p. 803–815, 1996.

BOLDIN, M. P.; VARFOLOMEV, E. E.; PANCER, Z.; METT, I. L.; CAMONIS, J. H.; WALLACH, D. Anovel protein that interactswith the death domain of Fas/APO-1 contains a sequence motif related to the death domain. **Journal Biology Chemistry**, v. 270, p. 7795–7798, 1995.

BONGIOVANN, L.; MAZZOCCHETTI, F.; MALATESTA, D.; ROMANUCCI, M.; CICCARELLI, A.; BURACCO, P.; MARIA D. R; PALMIERI, C.; MARTANO, M.; MORELLO, E.; MANISCALCO L.; DELLA SALDA, L. Immunohistochemical investigation of cell cycle and apoptosis regulators (Survivin, β -Catenin, P53, Caspase 3) in canine appendicular osteosarcoma. **BMC Veterinary Research**, v. 8, p. 78, 2012.

BOSTOCK, D. E. Neoplasms of the skin and subcutaneous tissues in dogs and cats. **The British Veterinary Journal**, v. 142, n. 1, p. 1-19, 1986.

BOSTOCK, D. E.; CROCKER, J.; HARRIS, K.; SMITH, P. Nucleolar organizer regions as indicators of post surgical prognosis in canine spontaneous mast cell tumors. **British Journal of Cancer**, v. 59, p. 915-918, 1989.

BOSTOCK, D.E. The prognosis following surgical removal of mastocytomas in dogs. **Jornal Small Animal Pract**, v.14, p.27-40, 1973.

BRANDTZAEG, P. The increasing power of immunohistochemistry and immunocytochemistry. **Journal of Immunological Methods**, v. 216, p. 49- 67, 1998.

BRAVO, R.; FRANK, R.; BLUNDELL, P. A; MACDONALD-BRAVO, H. Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase-delta. **Nature**, v. 326, p. 515–517, 1987.

BROCKS, B. A. W.; NEYENS, I. J.; TESKE, E.; KIRPENSTEIJN, J. Hypotonic wateras adjuvant therapy for incompletely resected canine mast cell tumors: Arandomized, double-blind, placebo-controlled study. **Veterinary Surgery**, v. 37, n. 5, p. 472–478, 2008.

BRODEY, R. S. Canine and feline neoplasia. **Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine**, v.14, p.309–54, 1970.

BROUDY, V. C. Stem cell factor and hematopoiesis. **Blood**, v. 90, p. 1345, 1997.

BURLACU, A. Regulation of apoptosis by Bcl-2 family proteins. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v.7, p. 249-257, 2003.

CALLAGY, G. M.; PHAROAH, P. D.; PINDER, S. E. Bcl-2 is a prognostic marker in breast cancer independently of the Nottingham Prognostic Index. **Clinic Cancer Research**, v.12, p. 2468–2475, 2006.

CAMPIONI, M.; SANTINI, D.; TONINI, G. Role of Apaf-1, a key regulator of apoptosis, in melanoma progression and chemoresistance. **Experimental Dermatology**, v.14, p. 811–8, 2005.

CAMPS-PALAU, M. A.; LEIBMAN, N. F.; ELMSLIE, R.; LANA, S. E.; PLAZA, S.; MCNIGHT, J. A.; RISBON, R.; BERGMAN, P. J. Treatment of canine mast cell tumours with vinblastine, cyclophosphamide and prednisone: 35 cases (1997-2004). **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 5, n. 3, p. 156–167, 2007.

CECCONI, F. APAF-1 and the apoptotic machinery. **Cell Death Differ**, v.6, p. 1087–1098, 1999.

CERRETHI, D. P.; KOZLOSKY, C. J.; MOSELY, B.; NESO, K.V. Molecular cloning of the interleukin 1beta converting enzyme. **Science**, v. 256, 97–100, 1992.

CHAFFIN, K.; THRALL, D. Results of radiation therapy in 19 dogs with cutaneous mast cell tumor and regional lymph node metastasis. **Veterinary Radiology & Ultrasound**, v. 43, n. 4, p. 392-395, 2002.

CHANG, Y. Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspase. **Microbiology Molecular Biology Review**, v. 64, p. 821–846, 2000.

CHIPUK, J. E; MOLDOVEANU, T.; LAMBI, F.; PARSONS, M. J. GREEN, D.R. The BCL-2 family reunion. **Molecular Cell**, v. 37, p. 299–310, 2010.

COOPER, M.; TSAI, X.; BENNETT, P. Combination CCNU and Vinblastine chemotherapy for canine mast cell tumours: 57 cases. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 7, n. 3, p. 196-206, 2009.

CORREIA, C.; SUN-HEE L.; WEI MENG, X.; VINCELETTE N. D.; KNORR, K. L.B.; DING H.; NOWAKOWSKI G. S.; DAI H. ; KAUFMANN S. H. Emerging understanding of Bcl-2 biology: Implications for neoplastic progression and treatment. **Review Biochimica Biophysica Acta**, v. 1853, p.1658–1671, 2015.

COSTA CASAGRANDE, T. A.; OLIVEIRA BARROS, D. L. M.; FUKUMASU, H.; COGLIATI, B.; CHAIBLE, L. M.; DAGLI, M. L. Z.; 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, p. 1-10, 2013.

COTSONIS, G. A. Angiogenic and lymphangiogenic microvessel density in breast carcinoma: correlation with clinicopathologic parameters and VEGF-family gene expression. **Modern Pathology**, v.18, n. 1, p.143-52, 2005.

COTTER, T. G. Apoptosis and cancer: the genesis of a research field. **Nature, Reviews Cancer**, v. 9, p. 7, 2009.

CRIVELLATO, E.; BELTRAMI, C.; MALLARDI, F.; RIBATTI, D. Paul Ehrlich's doctoral thesis: a milestone in the study of mast cells. *British Journal of Haematology*, v.123, p.19-21, 2003.

CROSS, P. C.; MERCER, K. L. Cell and tissue ultrastructure: a functional perspective. New York: W. H. Freeman, p. 420 p, 1993.

DAVIES, D. R.; WYATT, K. M; JARDINE, J. E; ROBERTSON, I. D; IRWIN, P. J. Vinblastine and prednisolone as adjunctive therapy for canine cutaneous mast cell tumors. **Journal American Animal Hosp Association**, v. 40, p. 124-130, 2004.

DAVIS, B. J; PAGE, R.; SANNES, P. L; MEUTEN, D. J. Cutaneous mastocytosis in a dog. **Veterinary Pathology**, v. 29, p. 363-365, 1992.

DAWSON, S. J.; MAKRETISOV N.; BLOWS F. M.; DRIVER, K. E; PROVENZANO, E., BAGLIETTO, L.; SEVERI, G, GILES, G. G.; MCLEAN C. A.; CALLAGY, G.; GREEN, A. R.; ELLIS, I.; GELMON, K.; TURASHVILI, G.; LEUNG, S. BCL2 in breast cancer: a favourable prognostic marker across molecular subtypes and independent of adjuvant therapy received. **British Journal Cancer**, v. 103, p. 668–675, 2010.

DEAN, P. W. Mast cell tumors in dogs: Diagnosis, treatment, and prognosis. **Veterinary Medical**, v. 83, p.185-192, 1988.

DERENZINI, M. The AgNORs diagnostic and prognostic. **BMC Veterinary Research**, v. 31, p. 117–120, 2000.

DEVARAJAN, E.; SAHIN, A. A.; CHEN, J. S.; KRISHNAMURTHY, R. R.; AGGARWAL, N.; BRUN, A. M.; SAPINO, A.; ZHANG, F.; SHARMA, D.; YANG, X. H.;

TORA, A. D.; MEHTA, K. Down-regulation of caspase 3 in breast cancer: A possible mechanism for chemoresistance. **Oncogene**, v. 21, p. 8843–8851, 2002.

DEWSON, G.; KLUC, R. M. Bcl-2 family-regulated apoptosis in health and disease. **Cell Health and Cytoskeleton**, v.2, p. 9-22, 2010.

DOBSON, J. M.; COHEN, S.; GOULD, S. Treatment of canine mast cell tumours with prednisolone and radiotherapy. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 2, p. 132-41, 2004.

DOBSON, J. M.; SCASE, T. J. Advances in the diagnosis and management of cutaneous mast cell tumours in dogs. **The Journal of Small Animal Practice**, v. 48, p. 424–431, 2007.

DUAN, H.; ORTH, K.; CHINNAIYAN, A. M.; POIRER, G. G.; DIXIT, V. M. ICE/ LAP6, a novel member of the ICE/ced 3 gene family, is activated by the cytotoxic T cell protease Granzyme. **Journal Biology Chemistry**, v. 271, p. 16720-16724, 1996.

ELMORE, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. **Toxicological Pathology**, v. 35, n. 4, p. 495–516, 2007.

EVAN, G.; LITTLEWOOD, T. A matter of life and cell death. **Science**, v. 281, p. 1317-1322, 1998.

FAUCHEU, C.; DIU, A.; CHAN, A.; BLANCHET, A. M.; MISSEC, C.; HERVE, F.; GU, Y.; ALDAPE, R. A.; LIPPKE, J. A. A novel human protease similar to the interleukin 1 beta-converting enzyme induces apoptosis in transfected cells. **EMBO Journal**, v. 14, p. 1914-1922, 1995.

FERNANDES, A. T.; ARMSTRONG, R. C.; KREBS, J.; SRINIVASULA, S. M.; WANG, L.; BULLRICH, F. In vitro activation of CPP32, and Mch3 by Mch4, a novel human apoptotic cysteine protease containing two FADD like domains. **PNAS**, U.S.A, v. 93, p. 7464-7469, 1996.

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

FOX, S. B. Tumour angiogenesis and prognosis. **Histopathology**, v.30, p. 294–301, 1997.

FRIESEN, C.; FULDA, S.; DEBATIN, K. M. Deficient activation of the CD95 (APO-1/ Fas) system in drug resistant cells. **Leukaemia**, v. 11, n. 11, p.1833-1841, 1997.

FU, W. N.; BERTONI, F.; KELSEY, S. M.; MCELWAINE, S. M.; COTTER, F.E.; NEWLAND, A. C.; JIA, L. Role of DNA methylation in the suppression of Apaf-1 protein in human leukaemia. **Oncogene**, v. 22, p. 451-455, 2003.

FULCHER, R. P.; LUDWIG, L. L.; BERGMAN, P. J.; NEWMAN, S. J.; SIMPSON, A. M.; PATNAIK, A. K. Evaluation of a two-centimeter lateral surgical margin for excision of grade I and grade II cutaneous mast cell tumors in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 228, n. 2, p. 210-215, 2006.

FULDA, S.; LOS, M.; FRIESEN, C.; DEBATIN, K.M. Chemosensitivity of solid tumour cells in vitro is related to activation of the CD95 system. **International Journal Cancer**, v. 76, n. 1, p. 105-114, 1998.

FULDA, S.; DEBATIN, K. M. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. **Review. Oncogene**, v. 25, p. 4798–4811, 2006.

FULDA, S.; LOS, M.; FRIESEN, C.; DEBATIN, K. M. Chemosensitivity of solid tumour cells in vitro is related to activation of the CD95 system. **International Journal Cancer**, v. 76, n. 1, p. 105-114, 1998.

FULTON, L.; STEINBERG, H. Preliminary study of lomustine in the treatment of intracranial masses in dogs following localization by imaging techniques. **Seminars Veterinary Medicine & Surgery (Small Animal)**, v. 5, p. 241- 245, 1990.

ROZENFELD-GRANOT, G.; KRISHNAMURTHY, J.; KANNAN, K.; TOREN, A.; AMARIGLIO, N.; GIVOL, D.; RECHAVI, G. A positive feedback mechanism in the transcriptional activation of Apaf-1 by p53 and the coactivator Zac-1. **Oncogene**, v. 21, p. 1469-1476, 2002.

GALLI, S. J.; ZSEBO, K. M.; GEISSLER, E.N. The kit ligand, stem cell factor. **Advance Immunology título da revista por extenso**, v. 55, p. 1, 1994.

GERALD, C. Caspase: the executioner of apoptosis. **Biochemical Journal**, v. 326, p. 1–16, 1997.

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

GHOBRAL, I. M.; WITZIG, T. E.; ADJEI, A. A. Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. **CA: Cancer Journal Clinicians**, v. 55, p. 178-194, 2005.

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

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, 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.

GINN, P. E.; MENSETT, J. E. K. L.; RUKICH, P. M. The skin and appendages. In: MAXIE, M. G.; JUBB, K. (Ed.). **Palmer's pathology of domestic animals**. 5. ed. California: Elsevier, 2007. v. 1, p. 553-781.

GOLDSCHMIDT, M. H.; HENDRICK, M. J. Tumors of the skin and soft tissues. In: MEUTEN, D. J. (Ed.). **Tumors in domestic animals**. 4. ed. Iowa State Press, 2002. p. 45-118.

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

GOVIER, S. M. Principles of treatment for mast cell tumors. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**, v.18, p.103–106, 2003.

GRANT, I. A.; RODRIGUEZ, C. O.; KENT, M. S.; SFILIGOI, G.; GORDON, I.; DAVIS, G.; LORD, L.; LONDON, C. A. A phase II clinical trial of vinorelbine in dogs with cutaneous mast cell tumors. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 22, n. 2, p.388–393, 2008.

GREEN, D. R.; REED, J. C. Mitochondria and apoptosis. **Science**, v. 281, p.1309-1312, 1998.

GROSS, A.; JOCKEL, J.; WEI, M.; KORSMEYER, S. Enforced dimerization of BAX results in its translocation, mitochondrial dysfunction and Apoptosis. **The EMBO Journal**, v.17, n.14, p.3878–3885, 1998.

GUROVA, K. V.; GUDKOVA, V. Paradoxical role of apopto-sis in tumour progression. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 88, -. 128-137, 2003.

HACKER, G. The morphology of apoptosis. **Cell Tissue Research**, v. 301, p. 5-17, 2000.

HAHN, K. A.; OGILVIE, G.; RUSK, T.; DEVAUCHELLE, P.; LEBLANC, A.; LEGENDRE, A.; POWERS, B.; LEVENTHAL, P. S.; KINET, J. P.; PALMERINI, F.; DUBREUIL, P.; MOUSSY, A.; HERMINE, O. Masitinib is safe and effective for the treatment of canine mast cell tumors. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 22, p. 1301-1309, 2008.

HAHN, K. A.; LEGENDRE, A. M.; SHAW, N. G.; PHILLIPS, B.; OGILVIE, G. K.; PRESCOTT, D. M.; ATWATER, S.W.; CARRERAS, J. K.; LANA, S. E.; LADUE, T.; RUSK, A.; KINET, J. P.; DUBREUIL, P.; MOUSSY, A.; HERMINE, O. Evaluation of 12- and 24-month survival rates after treatment with masitinib in dogs with nonresectable mast cell tumors. **American Journal of Veterinary Research**, v. 71, p. 1354–1361, 2010.

HALDAR, S.; NEGRINI, M.; MONNE, M.; SABBIONI, S.; CROCI, C. M. Down-regulation of bcl-2 by p53 in breast cancer cells. **Cancer Research**, v. 54, p. 2095–2097, 1994.

HANAHAN D.; WEINBERG, R. A. The Hallmarks of Cancer. **Cell**, v. 100, p. 57–70, 2000.

HAO, L.; ZHANG, C.; QIU, Y.; WANG, L.; LUO, Y.; JIN, M. et al. Recombination of CXCR4, VEGF, and MMP-9 predicting lymph node metastasis in human breast cancer. **Cancer Letters**, v. 253, n. 1, p. 34-42, 2007.

HATA, A. N.; ENGELMAN, J. A.; FABER, A. C. The BCL2 Family: Key Mediators of the Apoptotic Response to Targeted Anticancer Therapeutics. **Cancer Discovery**, v. 5, p. 475, 2015.

HAYES, A.; ADAMS, V.; SMITH, K.; MAGLENNON, G.; MURPHY, S. Vinblastine and prednisolone chemotherapy for surgically excised grade III canine cutaneous mast cell tumours. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 5, n. 3, p. 168-176, 2007.

HECTOR, S.; CONLON, S.; SCHMID, J. Apoptosome-dependent caspase activation proteins as prognostic markers in Stage II and III colorectal cancer. **Brazilian Journal Cancer**, v. 106, n. 9, p. 1499–1505, 2012.

HEMANN, M. T.; LOWE, S. W. The p53–Bcl-2 connection. **Cell Death and Differentiation**, v. 13, p.1256–1259, 2006.

HENDERSON, S.; ROWE, M.; GREGORY, C.; CROOM-CARTER, D.; WANG, F.; LONGNECKER, R. Induction of bcl-2 expression by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 protects infected B cells from programmed cell death. **Cell**, v. 65, p.1107-15, 1991.

HENGARTNER, M. O. Apoptosis: corralling the corpses. **Cell**, v. 104, p. 325-328, 2000.

HICKMAN, E. S.; HELIN, K. The regulation of APAF-1 expression during development and tumorigenesis. **Apoptosis**, v. 7, p. 167-17, 2002.

HO, C. K.; BUSH, J. A.; LI, G. Tissue-specific regulation of Apaf-1 expression by p53. **Oncology Reports**, v. 10, p. 1139-1143, 2003.

HOCKENBERY, D.; NUNEZ, G.; MILLIMAN, C.; SCHREIBER, R. D.; KORSMEYER, S. J. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. **Nature**, v. 348, p. 334–336, 1990.

HOFMANN, K. P.; BUCHER, J. T. The CARD domain: a new apoptotic signalling motif, Trends Biochem. **Science**, v. 22, p. 155-156, 1997.

HOGARTH, A. L.; HALL, G. A. Increased BAX expression is associated with an increased risk of relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, v. 93, p. 2671-2678, 1999.

HONG, S. H.; KADOSAWA, T.; NOZAKI, K.; MOCHIZUKI, M.; MATSUNAGA, S.; NISHIMURA, R.; SASAKI, N. In vitro retinoid-induced growth inhibition and morphologic differentiation of canine osteosarcoma cells. **American Journal of Veterinary Research**, v. 61, n. 1, p. 69–73, 2000.

HORVITZ, H. R. Genetic control of programmed cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans*. **Cancer Research**, v. 1, p. 59, 1999.

HOTTENDORF, G. H.; NIELSEN, S.W. Pathologic report of 29 necropsies on dogs with mastocytoma. **Pathology Veterinary**, v. 5, p. 102-121, 1968.

HUANG, C.; KOHNO, N.; INUFUSA, H.; KODAMA, K.; TAKI, T.; MIYAKE, M. Overexpression of bax associated with mutations in the loopsheet- helix motif of p53. **American Journal Pathology**, v. 155, p. 955–965, 1999.

HUANG, Y.; SHIN, N. H; SUN, Y.; WANG, K. K. Molecular cloning and characterization of a novel caspase-3 variant that attenuates apoptosis induced by proteasome inhibition. **Biochemistry Biophys Research Communication**, v. 283, p. 762–769, 2001.

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, p. 40-46, 2000.

JÄGER, R.; ZWACKA, R. M. The Enigmatic Roles of Caspases in Tumor Development. **Review Cancers**, v. 2, p.1952-1979, 2010.

JEONG, S. H.; LEE, H. W.; HAN, J. H.; KANG, S. Y.; CHOI, J. H. Low expression of Bax predicts poor prognosis in resected non-small cell lung cancer patients with non-squamous histology. **Japanese Journal of Clinical Oncology**, v. 38, p. 661-669, 2008.

KADTHUR, J.; RAO, S.; SONNAHALLIPURA, B. M.; THIMMANAHALLI D. S.; SATYANARAYANA, M. L. Prognostic Value of Ki 67 Proliferation Antigen in Canine Malignant Mammary Gland Tumours. **Brazilian Journal Veterinary Pathology**, v. 4, n. 1), p. 36-40, 2011.

KAHLOS, K.; SOINI Y.; PÄÄKKÖ P. Proliferation, apoptosis, and manganese superoxide dismutase in malignant mesothelioma. **International Journal Cancer**, v. 88, p. 37-43, 2000.

KARP, G. **Cell and molecular biology**: Concepts and experiments. 5 edition. John New Jersey: Wiley and Sons, 653-657, 2008.

KARYADI, D. M.; KARLINS, E.; DECKER, B. Acopy number variant at the KITLG locus likely confers risk for canine squamous cell carcinoma of the digit. **PLoS Genetetics**, v. 9, n. 3, 2013.

KASETA, M. K.; GOMATOS, I. P., KHALDI, L.; TZAGARAKIS, G. P; ALEVIZOS L. Prognostic value of bax, cyto- chrome C, and caspase-8 protein expression in primary osteosarcoma. **Hybridoma**, v. 26, p. 355-362, 2007.

KERR, J. F. History of the events leading to the formulation of the apoptosis concept. **Toxicology**, v.181–182, p. 471–4, 2002.

KERR, J. F.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **Brazilian Journal Cancer**, v. 4, p. 239-257, 1972.

KERR, J. F.; WINTERFORD, C. M.; HARMON, B. V. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. **Cancer**, v.73, p. 2013–26, 1994.

KIM, K. H.; NELSON, S. D.; KIMET D. H. Diagnostic relevance of overexpressions of PKC-0 and DOG-1 and KIT/PDGFR gene mutations in extragastrointestinal stromal tumors: a Korean six-centers study of 28 cases. **Anticancer Research**, v. 32, n. 3, p. 923-937, 2012.

KITAMURA, Y.; HIROTAB, S. Kit as a human oncogenic tyrosine kinase. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 61, n. 23, p. 2924–2931, 2004.

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.; SNYDER, P. W.; SOUTHORN, E.; STEDMAN, N. L.; STEFICEK, B. A.; STROMBERG, P. C.; VALLI, V. E.; WEISBRODE, S. E.; YAGER, J.; HELLER, J.; MILLER, R. Proposal of a 2-Tier Histologic Grading System for Canine Cutaneous Mast Cell Tumors to More Accurately Predict Biological Behavior. **Veterinary Pathology**, v. 48, n. 1, p. 147-155, 2011.

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

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

KLUCK, R. M.; BOSSY-WETZEL, E.; GREEN, D. R.; NEWMAYER, D. D. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. **Science**, v. 275, p. 1132-1136, 1997.

KODRE, V.; CEMAZAR, M.; PECAR, J.; SERSA, G.; COR, A.; TOZON, N. Electrochemotherapy compared to surgery for treatment of canine mast cell tumours. **International Journal of Experimental and Clinical Pathophysiology and Drug Research**, v. 23, p. 55-62, 2009.

KOSTURA, M. J.; TOCCI, M. J.; LIMJUCO, G.; CHIN, J.; CAMERON, P.; HILLMAN, A.G.; CHARTRAIN, N. A.; SCHMIDT, J. A. Identification of a monocyte specific pre-interleukin1 β convertase activity. **Proceedings of the National Academy of the United State of America**, v. 86, p. 5227–5231, 1989.

KRAHWINKE JR., L. D. J. Cryosurgical treatment of skin diseases. **The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice**, v. 10, p. 787–801, 1980.

KRAJEWSKI, S.; BLOMQVIST, C.; FRANSSILA, K. Reduced expression of proapoptotic gene BAX is associated with poor response rates to combination chemotherapy and shorter survival in women with metastatic breast adenocarcinoma. **Cancer Research**, v. 55, p. 4471-4478, 1995.

KRAVIS, L. D.; VAIL, D. M.; KISSEBERTH, W. C.; OGILVIE, G. K.; VOLK, L. M. Frequency of argyrophilic organizer regions in fine-needle aspirates and biopsy specimens from mast cell tumors in dog. **Journal American Veterinary Medical Association**, v. 209, n. 8, p. 1418-20, 1996.

KRISHNASWANY, G.; AJITAWI, O.; CHI, D. S. The human mast cell: an overview. **Methods in Molecular Biology**, v. 315, p. 13-34, 2006.

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

KUMARAGURUPARAN, R.; KARUNAGARAN, D.; BALACHANDRAN, C.; MANOHAR, B. M.; NAGINI, S. Of humans and canines: a comparative evaluation of heat shock and apoptosis-associated proteins in mammary tumors. **Clinica Chimica Acta**, v. 365, n. 1-2, p. 168-176, 2005.

KUPFER, J. Cutaneous mast cell tumours in dogs. **Veterinary Record**, v. 166, p. 407-408, 2010.

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

KUROSAKA, K.; TAKAHASHI, M.; WATANABE, N.; KOBAYASHI, Y. Silent cleanup of very early apoptotic cells by macrophages. **Journal Immunology**, v. 171, p. 4672-9, 2003.

LADUE, T.; PRICE, G. S.; DODGE, R.; PAGE, R. L.; THRALL, D. E.; LANTZ, C. S.; BOESIGER, J.; SONG, C. H.; MACH, N.; KOBAYASHI, T.; MULLIGAN, R. C.; NAWA, Y.; DRANOFF, G.; GALLI, S. J. Role for interleukin-3 in mast-cell and basophil development and in immunity to parasites. **Nature**, v. 392, n. 6671, p. 90093, 1998.

LARSSON, B. Some aspects of canine mastocytoma. **Nordisk Veterinarmed**, v. 9, p. 241, 1957.

LARUE, S. M.; GILLETTE, E. L. Radiation therapy. In: WITHROW, S. J.; VAIL, D. M. (Ed.). **Small animal clinical oncology**. 4. ed. Philadelphia, PA: Saunders, 2007. p. 193-210.

LEITE, N. C.; STREFEZZI, R. F.; KLEEB, S. R.; CATÃO-DIAS, J. L.; XAVIER, J. G. Expressão de Bcl-2 em mastocitomas cutâneos caninos como potencial marcador prognóstico: estudo imuno-histoquímico. In: Resumos da XVIII SEMANA

CIENTÍFICA BENJAMIN EURICO MALUCELLI, 18., 2009, São Paulo. Resumos...
São Paulo: FMVZ-USP, 2009.

LEMARIE, R. J.; LEMARIE, S. L.; HEDLUNG, C. S. **Mast cell tumors**: clinical. falta:
local: editora, data.

LEO, C.; RICHTER, C.; LARS-CHRISTIAN, H.; SCHUTZ, A.; PILCHA, H.;
HOCKEL, M. Expression of Apaf-1 in cervical cancer correlates with lymph node
metastasis but not with intratumoral hypoxia. **Gynecologic Oncology**, v. 97, n. 2, p.
602 – 606, 2005.

LI, P.; BANERJI, S.; MC DOWELL, J.; SAIFELT, J.; PASKIND, M.; JHONSON, C.;
Mice deficient in IL-1 beta converting enzyme are defective in production mature IL-1
and resistant to endotoxic shock. **Cell**, v. 80, p. 401–411, 1995.

LINNEKIN, D.; DEBERRY, C. S.; MOU, S. Lyn associates with the Juxtamembrane
region of c-Kit and is activated by stem cell factor in hematopoietic cell lines and
normal progenitor cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, p. 27450–27455,
1997.

LOBERT, S.; VULEVIC, B.; CORREIA, J. J. Interaction of vinca alkaloids with tubulin:
A comparison of vinblastine, vincristine, and vinorelbine. **Biochemistry**, v. 35, p.
6806–6814, 1996.

LOMBARD, L. S.; MOLONEY, J. B. Experimental transmission of mast cell sarcoma
in dogs. **Federation Proceedings**, v.18, p. 490-495, 1959.

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

LONDON, C. A.; MALPAS, P. B.; WOOD-FOLLIS, S. L. Multi-center, placebo-
controlled, double-blind, randomized study of oral toceranib phosphate (SU11654), a
receptor tyrosine kinase inhibitor, for the treatment of dogs with recurrent (either local
or distant) mast cell tumor following surgical excision. **Clinical Cancer Research**, v.
15, n. 11, p. 3856–3865, 2009.

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, 2003.

LOWE, S. W.; CEPERO, E.; EVAN, G. Intrinsic tumour suppression. **Nature**, v. 432,
p. 307–315, 2004.

LOWE, S. W.; LIN, W. Apoptosis in cancer. **Carcinogenesis**, v. 21 n. 3 p. 485–495,
2000.

LU, Q.-L.; ABEL, P.; FOSTER, C. S.; LALANI, E. N. Bcl2: role in epithelial
differentiation and oncogenesis. **Human Pathology**, v. 27, p. 102–110, 1996.

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, p. 165–170, 1999.

MACY, D. W. Canine and feline mast cell tumors: biologic behavior, diagnosis, and therapy. **Seminars in Veterinary Medicine and Surgery**, v. 1, n. 1, p. 72-83, 1986.

MACY, D. W. Canine mast cell tumors. **Veterinary Clinics of North America: small animal practice**, v. 15, p. 783–803, 1985.

MADDIKA, S.; ANDE, S. S.; PANIGRAHI, T.; WEGLARCZYK, K. Cell survival, cell death and cell cycle pathways are interconnected: implications for cancer therapy. **Drug Resistance Updates**, v. 10, p. 13-29, 2007.

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

MAGA, G.; HUBSCHER, U. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a dancer with many partners. **Journal Cell Science**, v. 116, p. 3051-3060, 2003.

MAIOLINO, P.; CATALDI, M.; PACIELLO, O.; RESTUCCI, B.; DE VICO, G. Nucleo-morphometric analysis of canine cutaneous mast cell tumours. **Journal of Comparative Pathology**, v. 133, p. 209–211, 2005.

MAKIN, G.; DIVE, C. Apoptosis and cancer chemotherapy. **Cell Biology**, v. 11, n. 11, p. 22-6, 2001.

MARTINO, J. C.; GREEN, D. R. Breaking the mitochondrial barrier. *Nature Review Molecular Cell Biology*, v. 2, p. 63–67, 2001.

MARX, D.; BINDER, C.; MEDEN, H.; LENTHE, T.; ZIEMEK, T.; HIDDEMANN T.; KUHN, W.; SCHAUER, A. Differential expression of apoptosis associated genes bax and bcl-2 in ovarian cancer. **Anticancer Research**, v. 17, p. 2233, 1997.

MAURER, C. A.; FRIESS, H.; BUHLER, S. S. Apoptosis inhibiting factor Bcl-xL might be the crucial member of the Bcl-2 gene family in colorectal cancer. **Digestive Disease and Sciences**, v. 43, p. 2641-2648, 1998.

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

MCDONNELL, T. J.; KORSMEYER, S. J. Progression from lymphoid hyperplasia to high-grade malignant lymphoma in mice transgenic for the t(14; 18). **Nature**, v. 349, p. 254–6, 1991.

MCILWAIN, D. R.; BERGER, T.; MAK, T. W. Caspase functions in cell death and disease. **Cold Spring Harb Perspect Biology**, v. 5, p. 8656, 2013.

MEIJERINK, J. P. P.; MENSINK, E. J. B. M.; WANG, K.; SEDLAK, T. W.; SOETJES, A. W. Hematopoietic malignancies demonstrate loss-of-function mutations of BAX. **Blood**, v. 91, p. 2991-2997, 1998.

MEININGER, C. J.; YANO, H.; ROTTAPPEL, R.; BERNSTEIN, A.; ZSEBO, K. M.; ZETTER, B. R. The c-kit receptor ligand functions as a mast cell chemoattractant. **Blood**, v. 79, p. 958-963, 1992.

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

METCALFE, D.D.; BARAM, B.; MEKORI, Y. A. Mast cells. **Physiological Reviews**, v. 77, p. 1033-1079, 1997.

MILLER, D. M. The occurrence of mast cell tumors in young shar-peis. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 7, p. 360–363, 1995.

MINN, A. J.; VÉLEZ, P.; SCHENDEL, S. L.; LIANG, H.; MUCHMORE, S. W.; FESIK, S. W.; FILL, M.; THOMPSON, C. B. Bcl-x(L) forms an ion channel in synthetic lipid membranes. **Nature**, v. 385, n. 6614, p. 353-357, 1997.

MISDORP, W. Mast cells and canine mast cell tumours. A review. **The Veterinary Quarterly**, v. 26, p.156–169, 2004.

MIYASHITA, T.; REED, J. C. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. **Cell**, v. 80, p. 293-299, 1995.

MOLL, U. M.; WOLFF, S.; SPEIDEL, D.; DEPERT, W. Transcription independent pro-apoptotic functions of p53. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 17, p. 631–636, 2005.

MOORE, A. S.; LONDON, C. A.; WOOD, C. A. Lomustine (CCNU) for the treatment of resistant lymphoma in dogs. **Journal Veterinary Int Medical**, v. 13, p. 395-398, 1999.

MULLINS, M. N.; DERNELL, W. S.; WITHROW, S. J.; EHRHART, E. J.; THAMM, D. H.; LANA, S. E. Evaluation of prognostic factors associated with outcome in dogs with multiple cutaneous mast cell tumors treated with surgery 73 with and without adjuvant treatment: 54 cases (1998-2004). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 228, n. 1, p. 91-95, 2006.

MUNDAY, N. A.; VAILLANCOURT, J. P.; ALI, A.; CASANO, F. J.; YU, V. L.; NICHOLSON, D. W.; YAMIN, T. T. Molecular cloning and proapoptotic activity of ICE rel II and ICE rel III members of ICE/Ced 3 family of cysteine proteases. **Journal Biology Chemistry**, v. 270, p. 15870–15876, 1995.

MURPHY, S.; SPARKES, A. H.; BLUNDEN, A. S.; BREARLEY, M. J.; SMITH, K. C. Effects of stage and number of tumours on prognosis of dogs with cutaneous mast cell tumours. **Veterinary Record**, v. 158, p.287-291, 2006.

MUSTIKA, R.; BUDIYANTO, A.; NISHIGORI, C. Decreased expression of Apaf-1 with progression of melanoma. **Pigment Cell Research**, v. 18, p. 59–62, 2005.

MUZIO, M.; STOCKWELL, B. R.; STENNICKE, H. R.; SALVESEN, G. S.; DIXIT, V. M. An induced proximity model for caspase-8 activation. **Journal Biology Chemistry**, v. 273, p. 2926–2930, 1998.

MYLONA, E.; NOMIKOS, A.; MAGKOU, C.; KAMBEROU, M.; PAPASSIDERI, I.; KERAMOPOULOS, A. The clinicopathological and prognostic significance of membrane type 1 matrix metalloproteinase (MT1- MMP) and MMP-9 according to their localization in invasive breast carcinoma. **Histopathology**, v. 50(3), p. 338–47, 2007.

NAKOPOULOU, L.; ALEXANDROU, P.; STEFANAKI, K.; PANAYOTOPOULOU, E.; LAZARIS, A. C.; DAVARIS, P. S. Immunohistochemical expression of caspase-3 as an adverse indicator of the clinical outcome in human breast cancer. **Pathobiology**, v. 69, p. 266–273, 2001.

NGUYEN, M.; MILLAR, D. G.; YONG, V. W.; KORSMEYER, S. J.; SHORE, G. C. Targeting of Bcl-2 to the mitochondrial outer membrane by a COOH-terminal signal anchor sequence. **Journal Biology Chemistry**, v. 268, p. 25265–25268, 1993.

NIELSEN, S. W.; COLE, C. R. Canine mastocytoma. A report of one hundred cases. **American Journal Veterinary Research**, v. 19, p. 417–432, 1958.

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

O'CONNELL, K.; THOMSON, M. Evaluation of prognostic indicators in dogs with multiple, simultaneously occurring cutaneous mast cell tumors: 63 cases. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 1, p. 51–62, 2011.

O'KEEFE, D. A. Canine mast cell tumors. **Veterinary Clinics of North America: small animal practice**, v. 20, p. 1105–1115, 1990.

OHASHI, E.; HONG, S. H.; TAKAHASHI, T.; NAKAGAWA, T.; MOCHIZUKI, M.; NISHIMURA, R.; SASAKI, N. Effect of retinoids on growth inhibition of two canine melanoma cell lines. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 63, n. 1, p. 83–86, 2001.

OHASHI, E.; MIYAJIMA, N.; NAKAGAWA, T.; TAKAHASHI, T.; KAGECHIKA, H.; MOCHIZUKI, M.; NISHIMURA, R.; SASAKI, N. Retinoids induce growth inhibition and apoptosis in mast cell tumor cell lines. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 68, n. 8, p. 797–802, 2006.

ORTH, K.; ROURKE, O.; SALVESEN, G. S.; DIXIT, V. M. Molecular ordering of apoptotic mammalian CED-3/ICE like proteases. **Journal. Biology. Chemistry**, v. 271, p. 20977-20980, 1996.

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.

PAIK, S.; JANG, K-S.; SONG, Y. S.; JANG, S. H.; MIN, K. W.; HAN, H. X.; NA, W.; LEE, K. H. CHOI, D.; JANG, S. J. Reduced expression of Apaf-1 in colorectal adenocarcinoma correlates with tumor progression and aggressive phenotype. **Annals Surgical Oncology**, v. 14, p. 3453–9, 2007.

PAIK, S.; SHAK, S.; TANG, G. A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. **The new England Journal of Medicine**, v. 351, p. 2817-2826, 2004.

PALMERINI, F.; DEVILARD, E.; JARRY, A.; BIRG, F.; XERRI, L. Caspase 7 downregulation as an immunohistochemical marker of colonic carcinoma. **Human Pathology**, v. 32, p. 461–467, 2001.

PATNAIK, A.; 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.

PAYNE, P. C. A. Kam mast cell tryptase: a review of its physiology and clinical significance. **Anaesthesia**, v. 59, p. 695-703, 2004.

PEREIRA, R. S.; SCHWEIGERT, A.; DIAS DE MELO, G.; FERNANDES F. V.; SUEIRO, F. A. R.; MACHADO, G. F. Ki-67 labeling in canine perianal glands neoplasms: a novel approach for immunohistological diagnostic and prognostic. **BMC Veterinary Research**, v. 9, p. 83, 2013.

PHILCHENKOV, A.; ZAVELEVICH, M.; KROCZAK, T. J.; LOS, M. Caspases and cancer: Mechanisms of inactivation and new treatment modalities. **Experimental Oncology**, v. 26, p. 82–97, 2004.

PINCZOWSKI, P.; TORRES N. R.; FABRIS, V. E.; LAUFER-AMORIM, R. Mastocitoma cutâneo canino: variação da graduação histopatológica entre patologistas. **Revista Clínica Veterinária**, v. 77, p. 76-78, 2008.

PINELLO, K. C.; NAGAMINE, M.; SILVA T. C.; MATSUZAKI P.; CAETANO H. V.; TORRES, L. N.; FUKUMASU, H.; AVANZO, J. L.; MATERA J. M.; DAGLI, M. L. Z. In vitro chemosensitivity of canine mast cell tumors grades II and III to all-trans-retinoic acid (ATRA). **Veterinary Research Communication**, v. 33, p. 581–588, 2009.

PINGOUD-MEIER, C.; LANG, D.; JANSS, A. J.; RORKE, L. B.; PHILLIPS, P. C.; SHALABY, T.; GROTZER, M. A. Loss of caspase-8 protein expression correlates

with unfavorable survival outcome in childhood medulloblastoma. **Clinical Cancer Research**, v. 9, p. 6401-9, 2003.

PINKAS, J.; MARTIN, S. S.; LEDER, P. Bcl-2-mediated cell survival promotes metastasis of Eph4 β MEKDD mammary epithelial cells. **Molecular Cancer Research**, v. 2, p. 551-6, 2004.

PITTMAN, S. M.; STRICKLAND, D.; IRELAND, C. M. Polymerization of tubulin in apoptotic cells is not cell cycle dependent. **Experimental Cell Research**, v. 215, p. 263-272, 1994.

POIRIER, V. J.; ADAMS, W. A.; FORREST, L. J.; GREEN, E. M.; DUBIELZIG, R. R.; VAIL, D. M. Radiation therapy for incompletely excised grade II canine mast cell tumors. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 42, n. 6, p. 430-434, 2006.

PRELICH, G.; TAN, C. K.; KOSTURA, M.; MATHEWS, M. B.; SO, A. G.; DOWNEY, K. M.; STILLMAN, B. Functional identity of proliferating cell nuclear antigen and a DNA polymerase-delta auxiliary protein. **Nature**, v. 326, p. 517-520, 1987.

PREZIOSI, R.; SARLI, G.; PALTRINIERI, M. Multivariate survival analysis of histological parameters and clinical presentation in canine cutaneous mast cell tumours. **Veterinary Research Communication**, v.31, p. 287-296, 2007.

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, p. 143-151, 2004.

QUI, F. H.; RAY, P.; BROWN, K.; BARKER, P. E.; JHANWER, S.; RUDDLE F. H.; BESMER, P. Primary structure of c-kit: relationship with the CSF-1/PDGF receptor kinase family-oncogenic activation of v-kit involves deletion of extracellular domain and C terminus. **EMBO Journal**, v. 7, p. 1003, 1988.

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

RAFFO, A. J.; PERLMAN, H.; CHEN, M. W.; DAY, M. L.; STREITMAN, J. S.; BUTTYAN, R. Overexpression of bcl-2 protects prostate cancer cells from apoptosis in vitro and confers resistance to androgen depletion in vivo. **Cancer Research**, v. 55, p. 4438, 1995.

RASSNICK, K. M.; BAILEY, D. B.; FLORY, A. B.; BALKMAN, C. E.; KISELOW, M.A.; INTILE, J. L.; AUTIO, K. Efficacy of vinblastine for treatment of canine mast cell tumors. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 22, n. 6, p. 1390-1396, 2008.

RAY, S. K.; PATEL, S. J.; WELSH, C. T. Molecular evidence of apoptotic death in malignant brain tumors including glioblastoma multiforme: upregulation of calpain and caspase-3. **Journal Neuroscience Research**, v.69, p.197-206, 2002.

REED, J. C. Bcl-2 family proteins. **Oncogene**, v. 17, p. 3225–3236, 1998.

ROBERTS, S. M.; SEVERIN, G. A.; LAVACH, J. D. Prevalence and treatment of palpebral neoplasms in the dog: 200 cases (1975–1983). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.189, p. 1355–1359, 1986.

ROGERS, K. S. Mast cell tumors. Dilemmas of diagnosis and treatment. **Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice**, v. 26, p. 87, 1996.

ROMAN-GOMEZ, J.; JIMENEZ-VELASCO, A.; BARRIOS, M.; PROSPER, F.; HEINIGER, A.; TORRES, A.; AGIRRE, X. Poor prognosis in acute lymphoblastic leukemia may relate to promoter hypermethylation of cancer related genes, **Leuk Lymphoma**, v. 48, p. 1269-1282, 2007.

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

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.

ROZENFELD-GRANOT, G.; JANAKIRAMAN, K.; KARUPPIAH, K.; AMOS, T.; NINETTE, A.; DAVID, G.; GIDEON, R. A positive feedback mechanism in the transcriptional activation of Apaf-1 by p53 and the coactivator Zac-1. **Oncogene**, v. 21, p. 1469-1476, 2002.

SABATTINI, S.; BETTINI, G. Prognostic value of histologic and immunohistochemical features in feline cutaneous mast cell tumors. **Veterinary Pathology**, v. 47, n. 4, p. 643-653, 2010.

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

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

SAMUELSON, D. A. Connective tissue. In: Textbook of veterinary histology. St. Louis: Saunders Elsevier, 2007. cap. 5, p. 72-99.

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

SAVILL, J.; FADOK, V. Corpse clearance defines the meaning of cell death. **Nature**, v. 407, p. 784–8, 2000.

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

SCHLEGEL, R. A.; WILLIAMSON, P. Phosphatidylserine, a death knell. **Cell Death Differ**, v. 8, p. 551-63, 2001.

SCHNEIDER, P.; TSCHOPP, J. Apoptosis induced by death receptors. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**, v. 74, p. 281-286, 2000.

SCHULTEISS, P. C.; GARDINER, D. W.; RAO, S.; OLEA-POPELKA, F.; TUOHY, J. L. Association os 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, p. 1464-1469, 2011.

SCHUSSER, E. G. B. C. G. Immunotherapy for a mast-cell neoplasm in a dog. **Wiener Tier"arztliche Monatsschrift**, v. 77, p. 334-336, 1990

SCOTT, D. W.; MILLER, W. H.; GRIFFIN, C. E. **Dermatologia de pequenos animais**. 5. ed. Rio de Janeiro: Interlivros, 1996. Cap.19, p. 926-1054.

SÉGUIN, B.; BESANCON, M.F.; MCCALLAN, J. L. 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 Veterinary Internal Medicine**, v. 20, n. 4, p. 933-40, 2006.

SELVAKUMARAN, M.; LIN, H-K.; MIYASHITA, T. Immediate early upregulation of bax expression by p53 but not TGF-1, a paradigm for distinct apoptotic pathways. **Oncogene**, v. 9, p.1791-1798, 1994.

SFILIGOI, G.; RASSNICK, K. M.; SCARLETT, J. M.; NORTHRUP, N. C.; GIEGER, T. L. Outcome of dogs with mast cell tumors in the inguinal or perineal region versus other cutaneous locations: 124 caes (1990-2001). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 226, p. 1368-1374, 2005

SHEN, X. G.; WANG, C.; LI, Y.; WANG, L.; ZHOU, B.; XU, B.; JIANG, X.; ZHOU, Z. G.; SUN, X. F. Downregulation of caspase-9 is a frequent event in patients with stage II colorectal cancer and correlates with poor clinical outcome. **Colorectal Disease**, v.12, n. 12, p. 1213-1218, 2010.

SHI, Y. Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. **Molecular Cell**, v. 9, p. 459-470, 2002.

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

SIMPSON, A. M.; LUDWIG, L. L.; NEWMAN, S. J.; BERGMAN, P. J.; HOTTINGER, H. A.; PATNAIK, A. K. Evaluation of surgical margins required for complete excision of cutaneous mast cell tumours in dogs. **Journal American Veterinarian Medical Association**, v. 224, n. 2, p. 236-40, 2004.

SLEE, E. A. Serial killer: ordering caspase activation events in apoptosis. **Cell Death Differ**, v. 6, n. 11, p. 1067-1074, 1999.

SOINI, Y.; PUHAKKA, A.; KAHLOS, K.; SEAILY, M.; PEAEAKKEO, P. Endothelial nitric oxide synthase is strongly expressed in malignant mesothelioma but does not associate with vascular density or the expression of VEGF, FLK1 or FLT1.

Histopathology, v. 39, p.179-186, 2001.

SPUGNINI, E. P.; VINCENZI, B.; BALDI, F.; CITRO, G.; BALDI, A. Adjuvant electrochemotherapy for the treatment of incompletely resected canine mast cell tumours. **Anticancer Research**, v. 26, p. 4585– 4589, 2006.

SRINIVASULA, S. M.; FERNANDES-ALNEMRI, T.; ZANGRILLI, N.; ROBERTSON, R.C.; ARMSTRONG, L.; WANG, J. A.; TRAPANI, K.J.; TOMASELLI, G.; LITWACK, E. S. The Ced-3/ interleukin 1b converting enzyme-like homolog Mch6 and the lamin-cleaving enzyme Mch2a are substrates for the apoptotic mediator CPP32. **Journal Biology Chemistry**, v. 271 p. 27099-27106, 1996.

STANCLIFT, R. M.; GILSON, S. D. Evaluation of neoadjuvant prednisone administration and surgical excision in treatment of cutaneous mast cell tumors in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 232, n. 1, p.53-62, 2008.

STEGH, A. H.; PETER, M. E. Apoptosis and caspases. **Cardiology Clinical**, v. 19, p. 13–29, 2002.

STREFEZZI, D. R. F.; KLEEB, S. R.; XAVIER, J. G.; CATÃO-DIAS, J. L. Avaliação da proliferação celular como indicador prognóstico para mastocitomas cutâneos caninos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 7, p. 559–656, 2010.

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

STREFEZZI, R. 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, p. 314-319, 2012.

STREFEZZI, R. F.; XAVIER, J. G.; KLEEB, S. R.; CATAO-DIAS, J. L. Nuclear morphometry in cytopathology: a prognostic indicator for canine cutaneous mast cell tumors. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 21, n. 6, p. 821-825, 2009a.

STREFEZZI, R.D.; KLEEB, S. R.; XAVIER, J. G.; CATÃO-DIAS, J. L.; Prognostic indicators of mast cell tumors. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, v. 2, p. 101-121, 2009b.

SUN, T.; SUN, B.; ZHAO, X.; ZHAO, N.; DONG, X.; CHE, N. Promotion of tumor cell metastasis and vasculogenic mimicry by way of transcription coactivation by Bcl2 and Twist1: A study of hepatocellular carcinoma. **Hepatology**, v. 54, p.1690–706, 2011.

TAKEUCHI, Y.; FUJINO, Y.; WATANABE, M. 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.; GEAR, R.; HOATHER, T.; DOBSON, J. Chlorambucil and prednisolone chemotherapy for dogs with inoperable mast cell tumours: 21 cases. **The Journal of Small Animal Practice**, v. 50, p. 284-289, 2009.

TEICHER, B. Antitumor alkylating agents In: DEVITA, V. (Ed.). **Cancer: principles and practice of oncology**. 5th ed. Philadelphia, PA: Lippincott-Raven, 1997. p. 405–418.

THAMM, D. H.; TUREK, M. M.; VAIL, D. M. Outcome and prognostic factors following adjuvant prednisone/vinblastine chemotherapy for high- risk canine mast cell tumour: 61 cases. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 68, n. 6, p. 581-587, 2006.

THAMM, D. H.; VAIL, D. M. Mast cell tumors. In: WITHROW, S. J.; MACEWEN, E. G. (Ed.). **Small animal clinical oncology**. 3rd ed. Philadelphia, PA: WB Co, 2001. p. 267-274.

THAMM, D. H.; VAIL, D. M. Mast cell tumours. In: WITHROW, S. J.; VAIL, D. M, (Ed.). **Small animal clinical oncology**. 4. ed. St. Louis: Saunders-Elsevier, 2007. p. 402–424.

THOMPSON, C. B. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. **Science**, v. 267, p. 1456–1462, 1995.

THORNBERRY, N. A.; BULL, H. G.; CALAYCAY, J. R.; CHAPMAN, K. T.; HOWARD, A. D.; KOSTURA, M. J.; MILLER, D. K.; MOLINEAUX, S. M.; WEIDNER, J. R.; AUNINS, J. A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. **Nature**, v. 356, p. 768–774, 1992.

TINSLEY JR., P. E.; TAYLOR, D. O. Immunotherapy for multicentric malignant mastocytoma in a dog. **Modern Veterinary Practice Journal**, v. 68, p. 225-228, 1987.

TIZARD, I. R. (Ed). **Imunologia veterinária: uma introdução**. 5. ed. São Paulo: Roca, 1998. 545 p.

TOWER, J. Programmed cell death in aging. Review. **Ageing Research Reviews**, v. 23, p. 90-100, 2015.

TOZON, N.; SERSA, G.; CEMAZAR, M. Electrochemotherapy: potentiation of local antitumour effectiveness of cisplatin in dogs and cats. **Anticancer Research**, v. 21, p. 2483-2488, 2001.

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

UMETANI, N.; FUJIMOTO, A.; TAKEUCHI, H. Allelic imbalance of APAF-1 locus at 12q23 is related to progression of colorectal carcinoma. **Oncogene**, v. 23, p. 8292–300, 2004.

VASCELLARI, M. M.; GIANTIN, K.; CAPELLO, A.; CARMINATO, E. M.; MORELLO, A.; VERCELLI, A.; GRANATO, P.; BURACCO, M.; DACASTO, F.; MUTINELLI.

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.

VASSILIKI, N.; MARIA, M.; KONSTANTINOS, P.; NEKTARIOS, T. Review. Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1833 p. 3448–3459, 2013.

VERMUNDM, H.; GOLLINM, F. F. mechanisms of action of radiotherapy and chemotherapeutic adjuvants. Review. **Cancer**, v. 21, p. 58-76, 1968.

VERMUNDM, H.; GOLLINM, F. F.; BAGINSKI, H.; DAVIS, G.; BASTIAN, R. P. The prognostic value of lymph node metastasis with grade 2 MCTs in dogs: 55 cases (2001-2010). **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 50, n. 2, p. 89–95, 2014.

VICKERY, K. R.; WILSON, H.; VAIL, D. M.; THAMM, D. H. Dose-escalating vinblastine for the treatment of canine mast cell tumors. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 6, n. 2, p. 111-119, 2008.

VIKHANSKAYA, F.; LEE, M. K.; MAZZOLETTI, M.; BROGGINI, M.; SABAPATHY K. Cancer derived p53 mutants suppress p53-target gene expression–potential mechanism for gain of function of mutant p53. **Nucleic Acids Research**, v. 35, n. 6, p. 2093-2104, 2007.

VILLAMIL, J. A.; HENRY, C. J.; BRYAN, J. N.; ELLERSIEK, M.; SCHULTZ, L.; TYLER, J. W.; HAHN, A. W. Identification of the most common cutaneous neoplasms in dogs and evaluation of breed and age distributions for selected neoplasms. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 239, n. 7, p. 960-965, 2011.

VINOTHINI, G.; MURUGAN, R. S.; NAGINI, S. Mitochondria-mediated apoptosis in patients with adenocarcinoma of the breast: Correlation with histological grade and menopausal status. **Breast**, v. 20, n. 1, p. 86–92, 2011.

VOYTYUK, O.; LENNARTSSON, J.; MOGI, A.; CARUANA G. Src family kinases are involved in the differential signaling from two splice forms of c-Kit. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, p. 9159-9166, 2003.

WALLS, A. F.; JONES, D. B.; WILLIAMS, J. H.; CHURCH, M. K.; HOLGATE, S.T. Immunohistochemical identification of mast cells in formaldehyde-fixed tissue using monoclonal antibodies specific for tryptase. **Journal of Pathology**, v. 162, p. 119-126, 1990.

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

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

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

WEBSTER, J. D.; KIUPEL, M.; YUZBASIYAN-GURKAN, V. Evaluation of the kinase domain of c-KIT in canine cutaneous mast cell tumours. **BMC Cancer**, v 6, p. 1–8.2006b.

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

WEIDNER, N. Intratumoral microvessel density as a prognostic factor in cancer. **American Journal Pathology**, v.147, p. 9-19, 1995.

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

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

WHITE, C. R.; HOHENHAUS, A. E.; KELSEY, J.; PROCTER-GRAY, E. Cutaneous mast cell tumors: 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.

WONG, R. S.Y. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to Treatment. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 30, p. 87, 2011.

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

WYLLIE, A. H. Apoptosis and the regulation of cell numbers in normal and neoplastic tissues: an overview. **Cancer Metastasis Review**, v. 11, p. 95–103, 1992.

YANG, X.; CHANG, Y.; BALTIMORE, D. Autoproteolytic activation of procaspases by oligomerization, **Molecular Cell**, v. 1, p. 319–325, 1998.

YARDEN, Y.; KUANG, W.; YANG-FENG, T.; COUSSENS, L. ; MUNEMITSUL, S.; DULL T.; CHEN, E.; SCHLESSINGER, J.; FRANCKE U.; ULLRICH, A. Human proto-oncogene c-kit: a new cell surface receptor tyrosine kinase for an unidentified ligand. **The EMBO Journal**, v. 6, n. 11, p. 3341-3351, 1987.

YIP, K. W.; REED, J. C. Bcl-2 family proteins and cancer. **Oncogene**, v. 27, p. 6398–6406, 2008.

YOO, N. J.; KIM, H. S.; KIM, S.Y.; PARK, W. S.; KIM, S. H.; LEE, J. Y.; LEE, S. H. Stomach cancer highly expresses both initiator and effector caspases; an immunohistochemical study. **Apmis**, v. 110, p. 825–832, 2002.

YUAN, J.; SHAHAM, S.; LEDOUX, S.; ELLIS, H. M.; Horvitz, H. R. The *C. elegans* cell death genes *ced3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 β -converting enzyme. **Cell**, v. 75, p. 641–652, 1993.

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

ZHOU, Q.; SNIPAS, S.; ORTH, K.; MUZIO, M.; DIXIT, V. M.; SALVESEN, G. S. Target protease specificity of the serpin CrmA analysis of five caspases. **Journal Biology Chemistry**, v. 272, p. 7797–7800, 1997.

ZLOBEC, I.; MINOO, P.; BAKERA, K.; HAEGERTA, D.; KHETANIA, K.; TORNILLO, L.; TERRACCIANO, L.; JASSA, R.; LUGLI, A. Loss of APAF-1 expression is associated with tumour progression and adverse prognosis in colorectal cancer. **European Journal of Cancer**, v. 43, p. 101–1107, 2007.

ZSEBO, K. M.; WYPYCH, J.; MCNIECE, I. K.; LU, H. S.; SMITH, K. A.; KARKARE, S. B.; SACHDEV, R. K.; VUSCHENKOFF, V. N.; BIRKETT, N. C.; WILLIAMS, L. F. T.; SATYAGAL, V. N.; TUNG, W.; BOSSELMAN, R. A.; MENDIAZ, E. A.; LANGLEY, K. E. Identification, Purification, and Biological Characterization of Hematopoietic Stem Cell Factor from Buffalo Rat Liver-Conditioned Medium. **Cell**, v. 63, p. 195–20, 1990.