THAÍS RODRIGUES MACEDO

Comparação da eficácia do mesilato de imatinibe com a vimblastina associada a prednisona no tratamento do mastocitoma canino: estudo clínico, histopatológico, imunohistoquímico e molecular

São Paulo

2014

THAÍS RODRIGUES MACEDO

**Comparação da eficácia do mesilato de imatinibe com a
vimblastina associada a prednisona no tratamento do mastocitoma
canino:** estudo clínico, histopatológico, imunohistoquímico e molecular

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

Departamento:

Cirurgia

Área de concentração:

Clínica Cirúrgica Veterinária

Orientador:

Prof^a. Dr^a. Julia Maria Matera

SÃO PAULO

2014

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.3002
FMVZ

Macedo, Thaís Rodrigues

Comparação da eficácia do mesilato de imatinibe com a vimblastina associada a prednisona no tratamento do mastocitoma canino: estudo clínico, histopatológico, imunohistoquímico e molecular / Thaís Rodrigues Macedo. -- 2014.
150 f. : il.

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

Programa de Pós-Graduação: Clínica Cirúrgica Veterinária.

Área de concentração: Clínica Cirúrgica Veterinária.

Orientador: Profª. Drª. Julia Maria Matera.

1. c-kit. 2. Inibidores tirosina-quinase. 3. Mastócito. 4. Quimioterapia. 5. Receptor tirosina-quinase. I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Comparação da eficácia do mesilato de imatinib com a vimblastina associada prednisona no tratamento do mastocitoma canino: estudo clínico, histopatológico, imunoistoquímico e molecular", protocolado sob o nº 2092/2010, utilizando 30 (trinta) cães, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Julia Maria Matera, 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 16/02/2011.

We certify that the Research "Comparison of the efficacy of imatinib mesylate with vinblastine and prednisone in the treatment of canine mast cell tumor: clinical, histopathological, immunohistochemical and molecular study", protocol number 2092/2010, utilizing 30 (thirty) dogs, under the responsibility Profa. Dra. Julia Maria Matera, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 02/16/2011.

São Paulo, 15 de julho de 2014.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: MACEDO, Thaís Rodrigues

Título: Comparação da eficácia do mesilato de Imatinibe com a vimblastina associada a prednisona no tratamento do mastocitoma canino: estudo clínico, histopatológico, imunohistoquímico e molecular

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

Data: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

DEDICATÓRIA

Ao grande amor da minha vida, **Rodrigo Barbosa Cardoso**, pelo apoio, paciência e compreensão, por me incentivar sempre. Obrigada por tornar a minha vida tão feliz

Ao meus pais, **Arnaldo e Vera Lucia**, que sempre acreditaram em mim, e me apoiaram, obrigada por tudo, pelo amor, carinho, incentivo, presença constante, mesmo estando longe. Sem vocês eu não seria nada.

As minhas amadas irmãs, amigas e confidentes **Mia, Mili e Thamy**, só tenho a agradecer pelo Papai do Céu ter colocado vocês três na minha vida, por isso sou mais feliz.

A minha eterna princesinha **Nala**, tudo isso é para você também, sei que um dia iremos nos encontrar novamente. Saudades eternas

A minha “filhota” **Ximbica**, sempre me inspirado a melhorar para poder tornar a vida dos animais melhor.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Prof^a Julia Maria Matera, pela confiança depositada em mim na execução deste trabalhos, pela orientação, pela amizade, carinho, conversas e risadas. Por me trazer de volta para cirurgia, área que eu tanto adoro.

A minha queridíssima amiga Samanta Rios Melo, a Sassa, por tudo! Por toda a ajuda na realização desta pesquisa, pela amizade, que vai além dos corredores da faculdade, por todas as conversas, risadas, viagens e cafés, tenho certeza que essa amizade ainda vai longe.

A Thaís Andrade Costa-Casagrande, mais que uma amiga, uma irmã, que mesmo longe esteve sempre pronta para me ajudar. Amiga obrigada por dividir comigo as ideias e sonhos deste projeto.

A pós graduanda Pamela A Alexandre por ter sido meu anjinho da guarda, por toda a ajuda, pelas horas de laboratório, por todas as explicações, por me fazer “quase” gostar de ir para Pira e principalmente pelo carinho, serei eternamente grata.

A pós graduanda Fernanda Rodrigues Agreste pela inestimável ajuda na execução de muitas das minhas avaliações laboratoriais.

A pós graduanda Juliana Guerra, pela paciência e ajuda na execução e interpretação do sequenciamento do DNA.

Aos amigos de pós graduação por estarem sempre perto para dar aquela ajuda, aquele conselho, por aguentarem os desabafos, vocês tornarem essa loucura de doutorado muito mais leve e divertida; em especial: Carolina Scarpa Carneiro, Claudia Inglez de Souza, Fernanda Auler, Leda Marques, Maria Fernanda Rizzo, Ana Eyherabide, Bruno Pedron, Paula Finkensieper, Adriana Valente, Jaqueline França, Marcos Della Nina, Kelly Ito, Daniela Izquierdo, Renato Cavalcante, Olicies Cunha

Ao Prof. Heidge Fukumasu por toda a contribuição na realização deste projeto, por ter me recebido em seu laboratório em Pirassununga e me introduzido nesse mundo difícil da biologia molecular.

Ao Prof. Dr. Bruno Cogliati por todo o tempo dedicado na execução deste projeto

As Prof^a Ana Carolina B.C. Fonseca Pinto e Prof^a Carla Aparecida Batista Lorigados pela realização das tomografias e análises de volume e por todo o tempo dedicado a execução deste projeto.

Ao Prof. Paulo Eduardo Brandão pela colaboração e disposição na execução desta pesquisa.

As médicas veterinárias do Serviço de Cirurgia e Serviço de Anestesia de Pequenos Animais do HOVET-USP, Andressa Nitrini, Patrícia Ferreira de Castro, Sandra Rosner, Patrícia Flor, Geni Cristina Patrício, Luciane Maria Kanayama, Viviane Galeazzi, Tatiana Soares, por estarem sempre dispostas a ajudar, encaminhando pacientes, auxiliando nos casos complicados, mas mais do que isso, muito obrigada pela amizade, por todas as conversas na copinha, pelas risadas, pelo conselhos, por tornarem a realização deste doutorados mais feliz. Vocês não imaginam a falta que irão fazer.

Aos enfermeiros e amigos de todas as horas, Cledson Lélis dos Santos, Jesus dos Anjos, Otávio Rodrigues dos Santos, vocês são maravilhosos

A todos os cães que participaram deste estudo, meu muito obrigada.

A todos os proprietário dos cães utilizados neste experimento por confiarem a mim a tarefa de cuidar de seus “bichinhos”.

Aos secretários da pós graduação Belarmino Ney Pereira e Livia Gimenes, que tanto me ajudaram na conclusão desta etapa tão corrida e muitas vezes tão difícil.

Ao Serviço de Biblioteca e Documentação da FMVZ-USP, pela ajuda na conclusão desta obra.

A todos os que me auxiliaram na tarefa de realizar este experimento, não só no campo profissional, mas principalmente no pessoal

A Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo por ter me aceitado há 7 anos atrás, por ter se tornado minha nova casa e proporcionar a realização de muitos dos meus sonhos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da Bolsa de auxílio pesquisa (Processo 2010/15093-6) e do Auxílio pesquisa, sem o qual não seria possível a realização deste estudo

RESUMO

MACEDO, T. R. **Comparação da eficácia do mesilato de imatinibe com a vimblastina associada a prednisona no tratamento do mastocitoma canino: estudo clínico, histopatológico, imunohistoquímico e molecular** [Comparison of the efficacy of imatinib mesylate with vinblastine and prednisone in the treatment of canine mast cell tumor: clinical, histological, immunohistochemical and molecular study]. 2014. 149 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficácia do mesilato de imatinibe, em comparação com a quimioterapia usual com vimblastina e prednisona, no tratamento do mastocitoma canino e descrever os efeitos colaterais apresentados pelas medicações. Bem como analisar a expressão do VEGF (fator de crescimento endotelial), a relação da expressão do gene *c-kit* por RT-PCR e marcação imunoistoquímica do KIT com a presença de mutações na justamembrana e a relação desta mutação com a resposta à terapia. Para tanto foram incluídos 29 animais com diagnóstico citológico de mastocitoma, estes animais foram submetidos a tomografia computadorizada para determinação das medidas das formações cutâneas e em seguida divididos em 2 grupos. O grupo 1 foi tratado com o protocolo quimioterápico de vimblastina e prednisona por 12 semanas e o grupo 2 com o mesilato de imatinibe na dose de 10 mg/Kg a cada 24 horas por 8 semanas. A avaliação da resposta ao tratamento foi realizada com mensurações periódicas das formações com paquímetro e nova tomografia ao final do tratamento para mensuração do maior diâmetro e volume tumoral. Um fragmento das formações cutâneas foi coletado antes do início do tratamento para graduação histológica da neoplasia, determinação do índice mitótico e imunomarcagem para KIT, VEGF e Ki-67. Parte do material coletado teve o DNA e RNA extraídos e posterior sequenciamento dos exons 11 do gene *c-kit* e determinação da expressão deste e do seu ligante por RT-PCR. A toxicidade a medicação foi avaliada segundo as normas do VCOG 1.1. A taxa de resposta do grupo VP foi de 7,7 % e no grupo MI de 28,6%, embora os pacientes tratados com mesilato de imatinibe tenham apresentado maior chance de resposta a terapia, não foi observado diferença entre

os dois grupos. Os dois protocolos foram bem tolerados, os pacientes do grupo MI d menor número de efeitos colaterais. O grau histológico, Índice mitótico, padrão imunohistoquímico do KIT, além da quantificação do ki-67 foram homogêneos nos dois grupos e não influenciaram na resposta ao tratamento. A quantificação do VEGF foi mais intensa nos pacientes com remissão parcial e total. Não foi observado relação entre a quantificação do KIT e a expressão do gene *c-kit*, que foi maior nos pacientes que responderam ao tratamento, porém a associação desta com a resposta a terapia não pode ser determinada. Mutações ativantes no exon11 do gene *c-kit* não foram identificadas. O tratamento com o mesilato de imatinibe é bem tolerado pelos animais, no entanto este não se mostrou superior ao protocolo padrão de quimioterapia para o tratamento do mastocitoma; este resultado pode ter sido influenciado pelo número de animais incluídos no estudo. Mutações em outros domínios do receptor KIT e a ação do ITK em receptores como do PDGF e o VEGF podem estar relacionados a resposta a esta classe de fármacos observada neste estudo, a despeito da ausência de mutações ativantes no exon 11 do gene *c-kit*.

Palavras-chave: *c-kit*. Inibidores tirosina-quinase. Mastócito. Quimioterapia. Receptor tirosina-quinase

•

ABSTRACT

MACEDO, T. R. **Comparison of the efficacy of imatinib mesylate with vinblastine and prednisone in the treatment of canine mast cell tumor: clinical, histological, immunohistochemical and molecular study** [Comparação da eficácia do Mesilato de Imatinibe com a Vimblastina associada a Prednisona no tratamento do mastocitoma canino: estudo clínico, histopatológico, imunohistoquímico e molecular]. 2014. 149 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

The objective of this study was to evaluate the efficacy of imatinib mesylate, compared with the usual chemotherapy with vinblastine and prednisone in the treatment of canine mast cell tumor and describe the side effects submitted by medications. Well as analyzing the expression of VEGF (vascular endothelial growth factor), the relationship between the expression of c-kit gene by RT-PCR and immunohistochemical staining of KIT with the presence of mutations in the juxtamembrane and the relationship of this mutation with response to therapy. For both 29 animals with cytological diagnosis of mast cell tumor were included, these animals underwent computed tomography to determine the measured skin formations and then divided into 2 groups. Group 1 was treated with the chemotherapeutic protocol vinblastine and prednisone for 12 weeks and the second group with the imatinib mesylate in a dose of 10 mg / kg every 24 hours for 8 weeks. The assessment of response to treatment was performed with periodic measurements of the formations Caliper and a new computed tomography in the end of treatment to measure the largest tumor diameter and volume. A fragment of skin formations was collected before the initiation of treatment for histological grading, determination of mitotic index, KIT and VEGF staining patterns and the proliferation marker Ki67. Part of the collected material was extracted RNA and DNA and subsequent sequencing of 11 exons of the c-kit gene and determination and expression of its ligand by RT-PCR. The medication toxicity was evaluated according to the standards of VCOG 1.1. A response rate of the VP group was 7.7% and 28.6% MI group, although patients treated with imatinib had a higher chance of response therapy, no difference in response between the two groups was observed. The two

protocols were well tolerated, patients in the MI group had a smaller number of side effects. The histological grade, mitotic index, staining patterns KIT, beyond the quantification of Ki-67 were homogeneous in both groups and did not influence the response to treatment. Quantification of VEGF was intensely in patients with partial and total remission. It was no relationship between KIT and quantification of the expression of c-kit gene, which was higher in patients who responded to treatment, but its association with response to therapy can't be determined. Exon11 activating mutations in the c-kit gene were not identified. Treatment with imatinib mesylate is well tolerated by the animals, however this was not superior to standard chemotherapy protocol for the treatment of mast cell tumors; this result may have been influenced by the number of animals included in the study. Mutations in other domains of the KIT receptor and action in ITK receptors as PDGF and VEGF may be related to response to this class of drugs in this study, despite the absence of activating mutations in exon 11 of c-kit gene

Keywords: c-kit. Chemotherapy. Mast cell. Tyrosine kinase inhibitors. Tyrosine kinase receptor.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Resultados das comparações entre os grupos VP e MI, quanto a resposta ao tratamento e metodologia de aferição das formações cutâneas.....	92
Tabela 2 –	Resultados quanto a resposta ao tratamento e metodologia de aferição das formações cutâneas nos grupos VP e MI.....	93
Tabela 3 –	Distribuição e comparativo dos pacientes pertencentes aos dois grupos de estudo, quanto aos achados de histopatológico e índice mitótico.....	95
Tabela 4 –	Associação dos resultados do exame histopatológico e valores de índice mitótico à resposta ao tratamento.....	95
Tabela 5 –	Distribuição dos animais de acordo com a resposta ao tratamento e valores individuais da expressão gênica do c-Kit e do Ligante do KIT.....	100
Tabela 6 –	Expressão gênica média do c-kit e do seu ligante de acordo com a classificação por padrão de marcação do KIT em imunoistoquímica.....	101
Tabela 7 –	Frequência genotípica e alélica da mutação pontual identificada neste estudo.....	106

LISTA DE FIGURAS

Quadro 1 –	Estadiamento clínico dos mastocitomas, segundo a Organização Mundial de Saúde.....	47
Quadro 2 -	Caracterização dos cães diagnosticados com mastocitoma cutâneo pertencentes ao Grupo VP e MI.....	66
Quadro 3 -	Normas RECIST 1.1.....	69
Quadro 4 –	Caracterização das lesões nos cães diagnosticados com mastocitoma cutâneo pertencentes aos Grupos VP e MI.....	83
Quadro 5 –	Medidas comparativas da mensuração clínica, maior diâmetro e volume tumoral a tomografia computadorizada no grupo tratado com Vimblastina e Prednisona (VP) e caracterização da resposta ao tratamento segundo as normas do RECIST 1.1.....	90
Quadro 6 –	Medidas comparativas da mensuração clínica, maior diâmetro e volume tumoral a tomografia computadorizada no grupo tratado com Mesilato de Imatinibe (MI) e caracterização da resposta ao tratamento segundo as normas do RECIST 1.1.....	91
Quadro 7 –	Incidência dos efeitos colaterais a aplicação de quimioterápicos nos grupos VP e MI de acordo com critérios de avaliação da toxicidade comum adaptada para cães (Veterinary Cooperative Oncology Group (VCOG), 2011).....	94
Quadro 8 –	Quadro 8 - Caracterização das lesões alvo, classificação histológica e imunohistoquímica, presença de mutação, expressão do RNAm do gene c-kit e do seu ligante, porcentagem de variação da mensuração clínica, maior diâmetro e volume tumoral a tomografia computadorizada no grupo tratado com Vimblastina e Prednisona (VP)e caracterização da resposta ao tratamento segundo as normas do RECIST 1.1.....	107
Quadro 9 –	Quadro 8 - Caracterização das lesões alvo, classificação histológica e imunohistoquímica, presença de mutação, expressão do RNAm do gene c-kit e do seu ligante, porcentagem de variação da mensuração clínica, maior diâmetro e volume tumoral a tomografia computadorizada no grupo tratado com Mesilato de Imatinibe (MI) e	108

	caracterização da resposta ao tratamento segundo as normas do RECIST 1.1.....	
Figura 1 –	Paciente C23 com uma mastocitoma em região de prepúcio.....	86
Figura 2 –	Paciente C15 com tumor em região de focinho.....	86
Figura 3 –	Imagens de tomografia computadorizada, em corte transversal do cão C26.....	87
Figura 4 –	Imagens de tomografia computadorizada, em corte transversal do cão C23.....	88
Figura 5 –	Imagens de tomografia computadorizada, em corte transversal do cão C15.....	88
Figura 6 –	Mensuração do volume tumoral, pelo princípio de Cavalieri do cão C28.....	89
Figura 7 -	Padrões de coloração por imunohistoquímica do KIT.....	97
Figura 8 -	Padrões de marcação imunohistoquímica do VEGF.....	98
Figura 9 -	Fotomicrografias da marcação imunoistoquímica com Ki-67, com contracoloração por hematoxilina.....	99
Figura 10 -	Eletroforese em gel de agarose 2% dos produtos de PCR do exon 11.....	102
Figura 11 -	Sequência de nucleotídeos do DNA genômico do domínio justamembrana de c-kit.....	103
Figura 12 -	Eletroferograma do sequenciamento do exon 11 do gene c-kit.....	103
Figura 13 -	Pareamento das bases do RNAm e do produto do exon 11 do gene c-kit pelo programa BLAST, mostrando o não pareamento na posição 1759.....	104
Figura 14 -	Eletroferograma do sequenciamento do exon 11 do gene c-kit demonstrando a troca de uma Citosina por uma Timina na posição 1759 do códon 586.....	104
Figura 15 -	Pareamento das bases do RNAm e do produto do exon 11 do gene c-kit pelo programa BLAST, mostrando o não pareamento na posição 1759, devido a troca C→T.....	105

Figura 16 -	A figura ilustra a região do códon 576 do exon 11 do gene c-kit, onde ocorreu a troca de uma Citosina por uma Timina, mantendo o aminoácido Tirosina.....	105
-------------	---	-----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

MCT	Mastocitoma
SCF	<i>Stem cell factor</i>
IL	Interleucinas
Ig	Imunoglobulina
C	Complemento
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
RTK	Receptor tirosina-quinase
VEGF	Fator de crescimento endotelial
VEGFR	Receptor para o fator de crescimento endotelial
PDGFR	Receptor para o fator de crescimento derivado das plaquetas
EGFR	Receptor para o fator de crescimento endotelial
GIST	Tumor estromal gastrointestinal
PAAF	Punção aspirativa por agulha fina
OMS	Organização mundial de saúde
TC	Tomografia computadorizada
MO	Medula óssea
PCNA	Antígeno nuclear de proliferação celular
AgNOR	Região organizadora nuclear com afinidade pela prata
IM	Índice mitótico
VBL	Vimblastina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
RNA	Ácido ribonucleico
PCR	Polymerase chain reaction – reação em cadeia de polimerase
RT-PCR	Real time - Polymerase chain reaction
VP	Grupo tratado com vimblastina e prednisona
MI	Grupo tratado com Mesilato de imatinibe
RECIST	Response Evaluation Criteria in Solid Tumors guidelines
RC	Remissão completa
RP	Remissão parcial

DP	Doença progressiva
DE	Doença estável
VCOG-CT CAE	<i>Veterinary Co-operative Oncology Group (Common Terminology Criteria for Adverse Events)</i>
FMVZ-USP	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo
HOVET-USP	Hospital Veterinário da Universidade de São Paulo
MPD	Membro Pélvico Direito
MPE	Membro Pélvico Esquerdo
MTE	Membro Torácico Esquerdo
SNP	Polimorfismo de Nucleotídeo Único
sid	Uma vez ao dia (<i>semel in die</i>)
bid	Duas vezes ao dia (<i>bis in die</i>)
DIT	Duplicação interna em tandem
ITK	Inibidor de tirosina quinase
IHQ	Imunohistoquímica
HPT	Histopatológico
VCI	Departamento de Cirurgia

LISTA DE SIMBOLOS

mg	Miligrama
m ²	Metro quadrado
IV	Intravenoso
Kg	Quilograma
μl	Microlitro
<i>g</i>	Força centrífuga relativa – aceleração da gravidade
nm	Nanômetro
ng	Nanograma
pH	Indicador ácido básico
Nº	Numero
pMOL	picomol
g	Grama
p	Valor de p; nível descritivo.
cm	Centímetro
%	Porcentagem
°C	Grau Celsius
®	Marca registrada
α	Alfa
β	Beta
<	Menor
>	Maior
+	Positivo e/ou mais
–	Negativo e/ou menos

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	24
2 OBJETIVOS.....	27
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	29
3.1 O MASTÓCITO.....	29
3.2 MASTOCITOMA.....	31
3.2.1 Etiologia.....	31
3.2.2 Histórico e comportamento biológico.....	37
3.3 DIAGNÓSTICO.....	39
3.3.1 Punção aspirativa por agulha fina (PAAF).....	39
3.3.2 Exame histopatológico.....	42
3.3.3 Exames de imagem.....	44
3.3.4 Exames laboratoriais.....	46
3.4 ESTADIMENTO CLÍNICO.....	46
3.5 PROGNÓSTICO.....	47
3.5.1 Parâmetros clínicos.....	48
3.5.2 Graduação histológica.....	49
3.5.3 Índice mitótico.....	50
3.5.4 Marcadores de ciclo celular.....	51
3.5.5 Padrão imunohistoquímico do KIT.....	52
3.5.6 Mutações no oncogene c-kit.....	53
3.6 TRATAMENTO.....	55
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	65
4.1 ANIMAIS.....	65
4.2 TRATAMENTO QUIMIOTERÁPICO.....	67
4.3 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA AO TRATAMENTO.....	67
4.3.1 Mensuração Clínica.....	67
4.3.2 Mensuração do maior diâmetro e volume tumoral à tomografia computadorizada.....	68
4.4 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE QUIMIOTERÁPICA.....	69
4.5 EXAMES LABORATORIAIS.....	70

4.5.1 Processamento e graduação histológica.....	71
4.5.2 Avaliação imunoistoquímica.....	71
4.5.2.1 Avaliação da expressão do KIT.....	72
4.5.2.2 Avaliação da expressão do VEGF-A.....	73
4.5.2.3 Avaliação do índice de proliferação celular Ki-67.....	73
4.5.3 Avaliação da Expressão do KIT e do Ligante por PCR em Tempo Real....	73
4.5.3.1 Extração do RNA.....	73
4.5.3.2 PCR em tempo real – RT-PCR.....	75
4.5.4 Extração e Sequenciamento de DNA.....	76
4.5.4.1 Reação em cadeia da polimerase – PCR.....	77
4.5.4.2 Sequenciamento de DNA.....	78
4.6 AVALIAÇÃO DOS RESULTADOS.....	79
5 RESULTADOS.....	82
5.1 GRUPOS DE ESTUDO.....	82
5.2 DETERMINAÇÕES OBJETIVA DA RESPOSTA TUMORAL FRENTE AO TRATAMENTO ATRAVÉS DAS NORMAS DO RECIST 1.1.	84
5.2.1 Mensuração clínica.....	84
5.2.2 Medida do maior diâmetro tumoral a tomografia computadorizada.....	86
5.2.3 Avaliação do volume tumoral a tomografia computadorizada.....	89
5.2 COMPARATIVO DA RESPOSTA AO TRATAMENTO DO GRUPO VP E MI.....	92
5.3 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE QUIMIOTERÁPICA.....	93
5.4 AVALIAÇÕES LABORATORIAIS.....	95
5.4.1 Classificação histopatológica e índice mitótico (IM).....	95
5.4.3 Avaliação da expressão do VEGF-A.....	97
5.4.4 Avaliação do índice de proliferação celular Ki-67.....	98
5.4.5 Avaliação da Expressão do gene c-kit e do Ligante do KIT por PCR em Tempo real.....	100
5.4.6 Sequenciamento do DNA e pesquisa de mutações no exon 11 do gene c- Kit.....	101
6 DISCUSSÃO.....	110
6.1 ESTUDO CLINICO.....	111
6.2 DETERMINAÇÃO OBJETIVA DA RESPOSTA TUMORAL FRENTE AO TRATAMENTO ATRAVÉS DAS NORMAS DO RECIST 1.1.....	113
6.3 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA E ÍNDICE MITÓTICO.....	115

6.4 AVALIAÇÃO IMUNOHISTOQUIMICA: QUANTIFICAÇÃO DO KI-67 E VEGF E CLASSIFICAÇÃO QUANTO A LOCALIZAÇÃO DO KIT.....	117
6.5 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DO GENE C-KIT E DO SEU LIGANTE POR RT-PCR.....	119
6.6 AVALIAÇÃO DAS MUTAÇÕES NO EXON 11 DO GENE <i>C-KIT</i>	120
6.7 PROTOCOLOS DE QUIMIOTERAPIA.....	123
6.8 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	130
6 CONCLUSÕES.....	136
REFERÊNCIAS.....	138

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A prevalência das neoplasias entre os animais de estimação tem aumentado consideravelmente e uma das causas é o aumento sobrevida (LAVALLE; CARNEIRO; HORIZONTE, 2003). Dentre as neoplasias cutâneas observadas com maior frequência em cães está o mastocitoma compreendendo cerca de 7 a 21% dos tumores cutâneos e 11 a 27% das neoplasias malignas em cães (MACY, 1985), estes são tumores potencialmente malignos, com alto poder metastático. O mastocitoma é uma neoplasia de células redondas, em que a idade média de ocorrência é de 8 a 9 anos (LAVALLE; CARNEIRO; HORIZONTE, 2003), não havendo predisposição sexual.

Os mastocitomas, geralmente, são tumores pequenos, firmes e bem circunscritos, podendo ser eritematosos, alopecicos e/ou ulcerados, formando nódulos ou placas. Podem apresentar-se pobremente definidos, macios ou como lesões flutuantes, assemelhando-se a outros tumores, como lipoma ou assumem a forma de grandes formações, difusos, podendo envolver outros órgãos (GOLDSCHIMIDT; HENDRICK, 2002; LAVALLE; ARAÚJO; CARNEIRO, 2003). Os principais locais de ocorrência desta neoplasia são a derme e o tecido celular subcutâneo, sendo raras as manifestações em outros sítios (LONDON; SEGUIN, 2003).

Sua graduação baseia-se em aspectos histomorfológicos, dividindo esta neoplasia em três graus, bem diferenciado ou grau I, intermediariamente diferenciado ou grau II, e pouco diferenciado ou grau III (PATNAIK et al., 1984), podem ainda ser classificados em baixo e alto grau (KIUPEL et al., 2011). A graduação é utilizada para direcionamento da conduta terapêutica dos animais portadores do mastocitoma.

A decisão do tratamento é baseada na presença ou ausência de fatores prognósticos negativos e o estágio clínico da doença. As opções de tratamento para os mastocitomas são: cirurgia, quimioterapia, radioterapia ou a combinação de tratamento. A excisão cirúrgica é o tratamento de escolha para os mastocitomas, que se apresentem como massas únicas, localizados em áreas que possibilitem a excisão ampla, com ou sem o acometimento dos linfonodos regionais (SÉGUIN et

al., 2001; THAMM; VAIL, 2007). Nos casos de apresentação múltipla, tumores inoperáveis ou presença de metástases distantes, outras modalidades de tratamento são indicadas (MACY, 1985; O'KEEFE, 1990; MISDORP, 2004).

A quimioterapia para o mastocitoma é indicada no tratamento de tumores de alto grau, nos estádios clínicos avançados, para citorredução ou ainda para evitar a recorrência local nos casos de excisões incompletas. (GRANT et al., 2008). O protocolo padrão para o tratamento do mastocitoma é a associação da vimblastina com prednisona (THAMM et al., 2006).

Dada à presença de mutações ativas no gene *c-kit*, que codifica o receptor tirosina-quinase KIT no mastocitoma canino, é razoável afirmar que estes tumores possam responder ao tratamento com pequenas moléculas inibidoras deste tipo receptor. Além disso, os mastócitos são produtores do fator de crescimento endotelial (VEGF) envolvido no processo de angiogênese. Com estas informações foram promovidos estudos com intuito de avaliar a eficácia de medicações inibidoras dos receptores tirosino-quinase, dentre as medicações avaliados estão o mesilato de imatinibe, o fostato de toracenibe e o masitinibe (LONDON, 2009). Em decorrência da alta incidência de mastocitomas na espécie canina e da baixa resposta as quimioterapias tradicionais nos cães portadores de mastocitoma de alto grau e multicêntricos, buscaram-se alternativas mais eficazes na terapêutica destes animais.

O mesilato de imatinibe tem ação direta sobre as células portadoras de atividade tirosina-quinase, possuindo, possivelmente, maior efetividade no tratamento e menores efeitos colaterais em seu protocolo terapêutico. O objetivo desta pesquisa foi avaliar a importância da desregulação da proteína tirosino-quinase na intervenção terapêutica dos mastocitomas caninos, por meio da avaliação do potencial terapêutico do mesilato de imatinibe em comparação com o protocolo padrão de poliquimioterapia com vimblastina associada a prednisona.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

Os objetivos principais deste trabalho incluíram:

1. Comparar o potencial terapêutico/efetividade do mesilato de Imatinibe em relação ao protocolo padrão de poliquimioterapia com vimblastina associada à prednisona no tratamento do mastocitoma canino.
2. Avaliar os efeitos colaterais do mesilato de imatinibe em cães portadores de mastocitoma.
3. Avaliar a importância da desregulação do receptor KIT na resposta aos tratamentos acima citados, tanto nos casos de mutações como nos casos ausência desta no gene c-Kit.
4. Verificar se existe associação entre a quantificação da expressão do KIT e do seu ligante, através de sua quantificação por RT-PCR e a resposta ao tratamento.
5. Verificar a expressão imunohistoquímica do KIT.
6. Avaliação da expressão imunohistoquímica do VEGF.

REVISÃO DE LITERATURA

3 REVISÃO DE LITERATURA

A prevalência das neoplasias entre os animais de estimação tem aumentado consideravelmente em decorrência do aumento da sua sobrevida (LAVALLE; ARAÚJO; HORIZONTE, 2003). Em muitas espécies as neoplasias com origem nos mastócitos são pouco comuns, em cães o mastocitoma (MCT) esta dentre as neoplasias cutâneas com maior frequência compreendendo cerca de 7 a 21% dos tumores cutâneos e 11 a 27% das neoplasias malignas (MACY, 1985).

3.1 O MASTÓCITO

Os mastócitos são componentes normais do tecido conjuntivo, sendo encontrados na maior parte dos órgãos e tecidos do corpo, estando presentes em maior número em locais que interagem com o ambiente, como a pele, o pulmão e o trato gastrointestinal, em cães os órgãos com a maior concentração destas células são a pele e o fígado (O'KEEFE, 1990; WELLE et al., 2008). Os mastócitos originam-se a partir de células progenitoras CD34 (+) existentes na medula óssea, diferente das células da linhagem granulocítica, deixam a medula óssea ainda imaturos e sofrem diferenciação, proliferação e maturação no tecido conjuntivo e mucosas (RADIN; WELLMAN, 2010)

Citocinas importantes no desenvolvimento e maturação dos mastócitos incluem interleucina (IL)-3, IL-6, IL-4 e o stem cell factor (SCF), produzido por células endoteliais, fibroblastos e células epiteliais. O microambiente tecidual, no qual o mastócito sofrera maturação, determina as capacidades funcionais subsequentes desta célula. Ao contrário das outras linhagens de granulócitos, os mastócitos mantém elevados os níveis do KIT, o receptor para o SCF, que quando ativado dá início ao processo de proliferação e diferenciação dos mastócitos e seus efeitos são potencializados pela IL-3; quando o KIT é ativado envia sinais para inibição da

apoptose, além de prolongar a sobrevivência dos mastócitos (LONDON; SÉGUIN, 2003; RADIN; WELLMAN, 2010).

Os mastócitos são células pleomórficas, possuem núcleo redondo e grânulos citoplasmáticos que contêm proteoglicanos, os quais se ligam a corantes catiônicos, como o Azul de Toluidina, Giemsa e Azul de Metileno. Alguns corantes, como o Romanowsky, assumem coloração diferente quando se ligam aos grânulos e quando se ligam ao DNA nuclear, sendo então chamados metacromático. Estes grânulos armazenam mediadores inflamatórios, incluindo histamina, heparina, serotonina, proteases, fatores quimiotáticos, citocinas e metabolitos do ácido araquidônico, conferindo ao mastócitos um papel importante na resposta imune, inflamatória e alérgica (O'KEEFE, 1990; LONDON; SÉGUIN, 2003).

Os mastócitos expressam em sua superfície receptores para IgE (FceRI) e componentes do complemento, particularmente o C5a. A principal forma de ativação dos mastócitos é a ligação da IgE ao seu receptor, levando a produção e liberação de vários mediadores, como prostaglandinas, leucotrienos, citocinas e interleucinas, como o fator de necrose tumoral (O'KEEFE, 1990; LONDON; SEGUIN, 2003; GIEGER et al., 2005).

A ativação dos mastócitos resulta em 3 tipos de respostas biológicas: (1) a desgranulação, na qual o conteúdo pré-formado dos grânulos é liberado por exocitose, (2) síntese de mediadores químicos derivados de membranas celulares, como os metabólitos do ácido araquidônico e (3) transcrição, tradução e secreção de citocinas. A ativação pode ser desencadeada por estímulos, químicos, físicos, neurológicos e imunológicos (MACY, 1985). A liberação destes mediadores pode acarretar aumento da permeabilidade vascular, vasodilatação, espasmo musculares, prurido, alteração na coagulação, ativação de eosinófilos e neutrófilos, estes efeitos podem levar a reações de hipersensibilidade local e/ou sistêmica (LONDON, SEGUIN, 2003). Em cães as principais doenças relacionadas aos mastócitos são as reações de hipersensibilidade tipo 1 e mastocitomas cutâneos e sistêmicos (RECH et al., 2004).

3.2 MASTOCITOMA

Como já mencionado anteriormente o mastocitoma é a neoplasia cutânea mais comum em cães, sendo observado em cães idosos com média de idade de 8 a 9 anos (LAVALLE et al., 2003), embora já tenham sido diagnosticados em cães a partir dos 4 meses de idade (DAVIS et al., 1992). A predisposição sexual não é observada. As raças mais predispostas são Boxer, Labrador Retriever, Golden Retriever, Staffordshire Bull Terriers, Boston Terrier, Bull Terrier, Fox Terrier, Beagle, Schnauzer, Shar-pei e cães sem raça definida (PATNAIK et al., 1984; SIMOES et al., 1994; GOLDSCHIMIDT; HENDRICK, 2002; LONDON; SÉGUIN, 2003; STREFEZZI; XAVIER; CATÃO-DIAS, 2003; MISDORP, 2004; RECH et al., 2004; LONDON; THAMM, 2013; WARLAND; DOBSON, 2013). A maior incidência do mastocitoma em determinadas raças sugere o envolvimento de fatores genéticos na carcinogênese desta neoplasia, raças que descendem do bulldog, como o Boxer e o Pug, são mais predispostas ao desenvolvimento dos mastocitomas (LONDON; THAMM, 2013)

3.2.1 Etiologia

A etiologia do mastocitoma permanece desconhecida, assim como as causas da sua maior incidência na espécie canina. Não existem evidências epidemiológicas do envolvimento de carcinógenos tópicos na carcinogênese do mastocitoma, embora esta neoplasia já tenha sido associada a dermatites crônicas, cicatrizes ou aplicação de substâncias irritantes na pele (LONDON; SEGUIN, 2003; WELLE et al., 2008; LONDON; THAMM, 2013). O envolvimento viral foi sugerido por alguns autores, que transplantaram células tumorais, oriundas de tecido tumoral ou de extratos celulares, para cães de laboratório muito jovens ou imunocomprometidos, mas não foram evidenciadas partículas virais nestas células, após o transplante; faltam evidências epidemiológicas, que indiquem a possibilidade de transmissão horizontal (BOWLES et al., 1972; LONDON; THAMM, 2013).

Os oncogenes derivam de proto-oncogenes, genes que regulam o crescimento e a diferenciação celular. Diversos produtos dos oncogenes, as oncoproteínas já foram estudadas, sendo que os receptores de fatores de crescimento desempenham um papel importante podendo estar ativados constantemente ou hiperexpressos no câncer (KUMAR et al., 2005). As proteínas tirosina quinase, são oncoproteínas que tem por ação a fosforilação de outras proteínas em resíduos de tirosina. O KIT (CD117), um receptor tirosina quinase tipo III, codificado pelo proto-oncogene *c-kit*, tem demonstrado papel importante na etiologia do mastocitoma canino (LONDON et al., 1996).

Os receptores tirosina quinase (RTK) pertencem a uma família de proteínas de membrana que são encontradas apenas em metazoas, cujo papel é mediar à comunicação intercelular através do reconhecimento de ligantes extracelulares, e traduzir a informação em resposta celular apropriada, exercendo papel fundamental na transdução de sinal, regulação do crescimento, diferenciação, sobrevivência e morte celular. As proteínas quinases catalisam a fosforilação de resíduos de treonina/serina ou resíduos de tirosina próprios (autofosforilação) ou de outras proteínas, através da ligação ao ATP e transferência do grupamento fosfato para chaves presentes nestes resíduos, iniciando, assim, a cascata de sinalização celular. Estão localizadas na membrana celular, citoplasma ou núcleo (LONDON, 2004; BAVCAR; ARGYLE, 2012; LONDON, 2013).

As proteínas expressas na superfície das células, que se ligam a fatores de crescimento, recebem o nome de receptores tirosina quinase. Existem 90 proteínas do tipo tirosina quinase identificadas no genoma humano, destas 58 apresentam função receptora, são exemplos: o KIT, que é o receptor para o *Stem cell factor*, o receptor para o fator de crescimento vascular endotelial (VEGFR), receptor para fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGFR) e o receptor para fator de crescimento epitelial (EGFR) (LONDON, 2013). Estes receptores são formados por um domínio extracelular, que se liga ao fator de crescimento, um domínio transmembrana e um domínio tirosina quinase citoplasmático, além de um domínio justamembrana que regula a fosforilação do receptor. Muitos dos RTK apresentam-se na superfície da célula na forma monomérica e ao ligarem-se ao fator de crescimento sofrem dimerização, este processo resulta na autofosforilação do domínio quinase, seguida da fosforilação de proteínas-alvo e receptores não quinase

citoplasmáticos, este processo inicia uma cascata de reações citoplasmáticas que culmina em diversas resposta (BAVCAR; ARGYLE, 2012; LONDON, 2013).

Alterações na expressão ou desregulação dos RTK estão relacionados com inúmeras doenças. Mutações com consequente ativação aberrante das vias de sinalização intracelular estão associadas ao diabetes, doenças inflamatórias, desordens ósseas e alterações nas vias de angiogênese. Inúmeros estudos apontam para o envolvimento da desregulação destes receptores na carcinogênese da maioria das neoplasias, tanto em humanos quanto em animais, que resulta em ativação das vias de sinalização. Isto pode ocorrer secundário a mutações, aumento da expressão dos receptores, translocação cromossomal ou ainda por ativação autócrina, quando a célula passa a expressar ambos, o receptor e o fator de crescimento, a consequência disso é a sinalização celular persistente na ausência do ligante do receptor, induzindo, assim, a proliferação celular descontrolada e sobrevivência (BAVCAR; ARGYLE, 2012; LONDON, 2013).

O receptor KIT consiste em um domínio extracelular de cinco alças de imunoglobulina like (exons 1 a 9), um domínio transmembrana (exon 10) e um domínio tirosina-quinase intracelular, este é dividido em um domínio justamembrana (exons 11 e 12) e um domínio quinase (exon 13), além do domínio citoplasmático fosfotransferase (exon 17) (ROSKOSKI, 2005). O seu ligante, o *stem cell factor* (SCF), também conhecido como fator de crescimento do mastócito, está envolvido com a sobrevivência destas células, sua proliferação, maturação, diferenciação, quimiotaxia, degranulação, supressão da apoptose e adesão da fibronectina. O KIT é expresso por mastócitos e células progenitoras de mastócitos, células intersticiais de Cajal, que são as células marcapassos do trato gastrointestinal, melanócitos, células germinativas, células progenitoras hematopoiéticas (ZEMKE et al., 2002; KIUPEL et al., 2004; WEBSTER et al., 2006)

Mutações nos domínios quinase e justamembrana têm sido mostradas como causa da ativação constitutiva do KIT na ausência da ligação do ligante. A ativação constitutiva do KIT em certas linhagens de células murinas resulta em crescimento celular descontrolado e comportamento agressivo típico do desenvolvimento tumoral (ZEMKE et al., 2002). Mutações no receptor tirosina quinase têm sido descritos em diversos distúrbios de mastócitos em humanos, como na urticária pigmentosa ou mastocitoses agressivas, leucemias de linhagens de mastócitos em humanos e nos Tumores estromais gastrointestinais. (GISTs). As mutações ocorrem na porção do

domínio quinase do c-kit, nas mastocitoses em humanos, porém nos GISTs elas se encontram no domínio justamembrana. Já nas leucemias estas mutações ocorrem em ambos os domínios (justamembrana e quinase) do *c-kit*. Independente do local das mutações, estas resultam em uma proteína KIT constitutivamente ativada, que pode ser fosforilada mesmo na ausência do SCF (WEBSTER et al., 2006).

Recentemente, vários estudos têm demonstrado que, aproximadamente 15 a 40% dos MCTs caninos apresentam mutações no gene *c-kit*. Vários tipos de mutações já foram identificadas, incluindo diferentes mutações pontuais, deleções e duplicações internas em tandem (DIT), observadas nos exons 8 e 9, exon 11 e exon 17. Evidências sugerem que duplicações internas em tandem no exon 11 levam a alterações na estrutura espacial do domínio justamembrana, resultando em ativação constitutiva do receptor (RIVA et al., 2005; LETARD et al., 2008; LONDON, 2009; TAKEUCHI et al., 2013), mutações ativadoras também foram identificadas no domínio extracelular do c-kit e estas também promoveram a autofosforilação do receptor. Mutações em outros domínios, em particular o quinase (exon 13), local mais frequente de mutações em humanos, não foram identificadas em cães (LONDON et al., 1999; WEBSTER; KIUPEL; YUZBASIYAN-GURKAN, V, 2006; LETARD et al., 2008; LONDON, 2009). Uma correlação muito próxima foi identificada entre a presença de mutações, a agressividade do tumor e alto grau histopatológico. Muitas destas tem sido implicada no desenvolvimento e progressão da neoplasia de mastócitos canina (ZENKE et al., 2002; PREZIOSI et al., 2004; ZAVODOVSKAYA et al., 2004; WEBSTER et al., 2006; WEBSTER; KIUPEL; YUZBASIYAN-GURKAN, 2006).

A mutação no exon 11 consistindo em Duplicação interna em tandem é identificada em 9 a 45% dos mastocitomas canino grau II e III e esta associada a tumores mais agressivos, aumento do risco de metástases e recidiva local, maior taxa proliferativa e localização aberrante do KIT (ZEMKE et al., 2002; DOWNING et al., 2002; WEBSTER et al., 2006; TAKEUCHI et al., 2013; AMAGAI et al., 2013). Riva et al. (2005), assim como Zemke et al. (2002) não identificaram associação entre os tipos de mutações no KIT e a raça, sexo ou idade dos animais.

Zavodavskaya et al. (2004) relataram que presença de uma única mutação somática no oncogene ou no gene supressor do tumor pode ser utilizada para determinar a origem clonal de múltiplos tumores. Desta forma, as células malignas dos mastócitos podem permanecer quiescentes por um longo período de tempo,

antes de retornarem ao mesmo local de origem ou em localizações distantes. A habilidade em distinguir mastocitomas recorrentes e metástases, dos considerados como nova doença primária pode corroborar para a escolha do tratamento, como a quimioterapia, por exemplo. Marconato et al. (2013) observaram que o estado mutacional do *c-kit* é conservado entre o MCT primário e sua metástase, deste modo a terapia com inibidores de tirosina quinase também seria válida no tratamento da doença metastática, resultados opostos foram encontrados por Amagai et al. (2013), que ao analisar o status mutacional de 12 cães com múltiplos mastocitomas, encontraram DIT em 2 cães e esta estava presente somente no tumor primário.

No entanto, nem todos os mastocitomas exibem mutações no gene *c-kit*. Assim, para além do KIT e do seu ligante, outros fatores e citoquinas (e seus receptores) podem estar envolvidos na regulação do crescimento e sobrevivência dos mastócitos neoplásicos (OHMORI et al., 2008a). O fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) é a chave regulatória da angiogênese em vários órgãos, tanto em tecidos saudáveis quanto em condições patologias. A angiogênese é o processo de formação de um novo vaso sanguíneo, sendo fundamental para a progressão tumoral e propagação das metástases. Este processo é regulado por fatores pro-angiogênicos e anti-angiogênicos, liberados pelas células tumorais e hospedeiras, incluindo células endoteliais e células do sistema imune (REBUZZI et al., 2007; CAPP et al, 2009).

O VEGF é uma proteína homodimérica ligante da heparina com diversas isoformas geradas por *splicing* alternativo. Seis tipos de proteínas compõem a família do VEGF: Fator de crescimento placentário, VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, estes últimos envolvidos com a angiogênese linfática. Estas proteínas compartilham uma estrutura comum de oito resíduos de cisteína no domínio de homologia do VEGF e embora atuem de maneira semelhante, diferem na habilidade de se ligar à heparina e a matriz extracelular, além de possuírem receptores distintos. Destes, o VEGF-A, ou apenas VEGF, é o fator mais bem estudado e compreendido (FERRARA et al., 2003; REBUZZI et al., 2007a; CAPP et al., 2009; AMORIM et al., 2010; GIANTIN et al., 2012).

O VEGF exerce função crítica na angiogênese fisiológica, patológica e na linfangiogênese, através da ativação, paracrina ou autócrina, de receptores do tipo tirosina quinase, expressos na superfície das células endoteliais, são eles o VEGFR-1 (fms-like tyrosine kinase 1 ou Flt-1), VEGFR-2 (fetal liver kinase, Flk-1 ou

KDR) e VEGFR-3 (fms-like tyrosine kinase 4, Flt4). O VEGFR-1 e VEGFR-2 são expressos nas células do endotélio vascular. VEGFR-2 e VEGFR-3 são os principais receptores da sinalização nas células endoteliais dos vasos sanguíneos e linfáticos, respectivamente. O VEGF, ao se ligar a seu receptor específico promove uma cascata de eventos intracelulares, que incluem a proliferação, invasão e atividade quimiotática endotelial, funcionando como regulador da angiogênese em tecidos saudáveis e doentes (SHINKARUK et al., 2003; REBUZZI et al., 2007a; CAPP et al., 2009; AMORIM et al., 2010; GIANTIN et al., 2012).

Vários estudos têm demonstrado que o VEGF funciona como um mediador em doenças relacionadas com a angiogênese ou ainda como um regulador de crescimento autócrino de neoplasias hematopoiéticas e vários tumores não-hematopoiéticos. Em muitos casos, as células neoplásicas expressam VEGF bem como os seus receptores, portanto, utilizam o VEGF como um fator de crescimento autócrino, funcionando como um fator preditivo de progressão tumoral e recidiva em humanos e cães (SHINKARUK et al., 2003; AMORIN et al., 2010).

O VEGF é secretado por várias células, tais como o macrófagos, linfócitos e mastócitos, células epiteliais e células neoplásicas, que desempenham um papel importante na angiogênese tumoral por meios da liberação de citocinas angiogênicas armazenados no seu citoplasma (SHINKARUK et al., 2003; PATRUNO et al., 2009). Mastócitos de várias espécies podem expressar e liberar o VEGF sob determinadas situações, como na regulação da angiogênese nos processo de reparação tecidual, mas pouco se sabe sobre a sua expressão nos mastócitos neoplásicos e da sua influência na tumorigênese do mastocitoma. (CAPP et al., 2009; AMORIM et al., 2010).

O envolvimento dos mastócitos na angiogênese tumoral tem sido demonstrada em várias neoplasias sólidas e hematológicas em humanos. Estudos demonstram o acúmulo de mastócitos próximos à células tumorais, antes do início da angiogênese, participando da propagação das metástases. A expressão do VEGF em mastócitos neoplásicos é pouco compreendida; em pacientes humanos com mastocitose expressam quantidades detectáveis de VEGF (REBUZZI et al., 2007a; PATRUNO et al., 2009).

No mastocitoma canino, a função do VEGF não está bem estabelecida. Rebuzzi et al (2007) em seu estudo demonstraram que as células do mastocitoma expressam VEGF e seus receptores, VEGF receptor-1 (Flt-1) e VEGF receptor-2

(KDR), e que estes são funcionais, mas apesar desta co-expressão o VEGF não é utilizado como um regulador de crescimento autócrino. Aumento da expressão imunohistoquímica do VEGFR em mastocitomas caninos tem sido relacionada a tumores de maior grau de agressividade, embora não tenha sido observado correlação significativa entre a intensidade de marcação e os graus histológicos (REBUZZI et al., 2007a; AMORIM et al., 2010; GIANTIN et al., 2012).

3.2.2 Histórico e comportamento biológico

O mastocitoma apresenta-se em sua maioria, como formações cutâneas pequenas e isoladas raramente associadas a alterações sistêmicas, embora 5% a 25% dos animais possam apresentar tumores múltiplos, que podem ocorrer de forma sincrônica ou sequencialmente. Ainda não é claro se esta apresentação representa uma origem multicêntrica ou metastática (LONDON; SEGUIN, 2003; TURIN et al., 2006; WELLE et al., 2008).

Raramente, a forma primária do mastocitoma tem origem em outros locais, que não a pele, como a cavidade oral, orofaringe, laringe e trato gastrointestinal e a forma visceral, com envolvimento de baço, fígado e medula óssea geralmente é consequência da disseminação de um tumor cutâneo primário. Aproximadamente 50% a 60 % das formações cutâneas são observadas em tronco e região perineal, 25% a 40% nas extremidades e somente 10% em região de cabeça e pescoço.(LONDON; SEGUIN, 2003; WELLE et al., 2008).

A aparência clínica desta neoplasia pode ser bastante variável, e esta, geralmente, está relacionada com o grau de diferenciação tumoral. Formações pequenas, circunscritas, solitárias, alopécicas ou não, raramente ulceradas e de crescimento lento, normalmente estão associadas a tumores bem ou moderadamente diferenciados, já os mastocitomas de alto grau em sua maioria apresentam-se como grandes formações, ulceradas, eritematosas, infiltradas nos tecidos adjacentes e com rápido crescimento, podem ainda ser observadas a presença de edema peritumoral e pequenos nódulos satélites. A forma subcutânea

muitas vezes caracteriza-se por formações mal circunscritas de consistência macia, assemelhando-se a outros tumores como o lipoma (LONDON; THAMM, 2013).

O comportamento biológico do mastocitoma é extremamente variável, fazendo com que clínicos e cirurgiões o considerem potencialmente maligno. Tumores bem diferenciados mostram comportamento geralmente pouco agressivo, com longo período de evolução e ausência de sinais clínicos, já os tumores pouco diferenciados ou indiferenciados apresentam crescimento rápido e alto poder infiltrativo, maior potencial metastático e presença de sinais sistêmicos (PATNAIK et al., 1984; DOBSON; SCASE, 2007; WELLE et al., 2008).

Os sinais sistêmicos associados à presença do mastocitoma são consequência da liberação substâncias bioativas presentes nos grânulos dos mastócitos, como a histamina, heparina, fatores quimiotáticos dos eosinófilos e enzimas proteolíticas. Ocasionalmente, a manipulação do tumor, resulta em degranulação dos mastócitos com consequente vasodilatação local, edema, eritema e formação de pápulas em torno do tumor, fenômeno conhecido como sinal de Darier. Da mesma forma, a manipulação de mastocitomas viscerais pode causar vômitos e dor abdominal (WELLE et al., 2008; LONDON; THAMM, 2013).

Úlceras gastrointestinais podem estar presentes nos cães com mastocitoma, sendo esta, a síndrome paraneoplásica mais comum nesta neoplasia. Níveis elevados de histamina, observados nestes animais, estimulam os receptores H₂ das células parietais, com consequente aumento na produção de ácido clorídrico, a liberação de histamina leva ainda a hipomotilidade e vasodilatação de veias e capilares gástricos, além de um aumento significativo da permeabilidade endotelial, podendo ocasionar a formação de trombos e áreas de isquemia na mucosa gástrica (FOX et al., 1990; O'KEEFE, 1990), este mecanismo leva ao desenvolvimento de gastrite e úlceras gastrointestinais, que causam disorexia, vômito, hematêmese, diarreia, melena, dor abdominal e anemia e em casos mais graves perfuração gástrica e/ou intestinal (ISHIGURO et al., 2003; LONDON; SEGUIN, 2003). Cães com mastocitoma apresentam níveis de histamina significativamente maiores que cães normais e níveis mais baixos de gastrina, provavelmente como resultado de feedback negativo (WELLE et al., 2008). Os níveis de histamina podem ajudar no monitoramento da progressão da doença, Ishiguro et al., (2003) demonstraram correlação positiva entre a progressão da doença e o aumento dos níveis de

histamina, embora estes níveis não estejam relacionados ao estágio clínico da doença, grau histológico e tamanho do tumor.

O retardo na cicatrização observado em alguns pacientes é atribuído a enzimas proteolíticas e aminas vasoativas liberadas pelo tumor durante a manipulação cirúrgica. A histamina liberada liga-se aos receptores H1 e H2 dos macrófagos, que liberam o fator supressor dos fibroblastos, resultando em atrasos da cicatrização (LONDON; THAMM, 2013). O excesso de histamina liberada no período transoperatório pode ocasionar episódios de hipotensão, que podem evoluir para choque. O aumento do tempo de sangramento durante a cirurgia, ou ainda, após a realização da biopsia aspirativa com agulha fina ou manipulação excessiva de tumores ulcerados, deve-se a liberação de heparina, também presente nos grânulos dos mastócitos. Estes pacientes podem apresentar sangramento excessivo da ferida cirúrgica, embora hemorragias sistêmicas ou incontroláveis associadas a este fenômeno sejam raras. A maioria dos pacientes apresenta parâmetros de coagulação pré-cirúrgico normais (WELLE et al., 2008).

3.3 DIAGNÓSTICO

3.3.1 Punção aspirativa por agulha fina (PAAF)

A avaliação diagnóstica de cães com suspeita de mastocitoma tem três objetivos: estabelecer o diagnóstico definitivo por meio de citologia aspirativa e/ou exame histopatológico, determinar o estadiamento clínico e documentar as síndromes paraneoplásicas existentes (ROGERS, 1996; MISDORP, 2004).

A punção aspirativa por agulha fina (PAAF) de formações em derme e subcutâneos é um método diagnóstico de fácil execução, não invasivo e pouco traumático para o tecido tumoral (LAVALLE; CARNEIRO; HORIZONTE, 2003; LONDON; SEGUIN, 2003), deve ser realizada antes de excisões de formações cutâneas, uma vez que o diagnóstico pré-operatório de mastocitoma influencia no procedimento cirúrgico (LONDON; SEGUIN, 2003; DOBSON; SCASE, 2007; WELLE

et al., 2008; LONDON; THAMM, 2013), embora seja um bom método para o diagnóstico pré-operatório, apresentando correspondência de 92 a 96% com o exame histopatológico, a citologia não gradua o mastocitoma, dando apenas informações sobre o grau de diferenciação das células (WELLE et al., 2008).

Scarpa et al. (2012) avaliaram a aplicabilidade dos critérios propostos pelo novo esquema de classificação histológica de Kiupel, na avaliação citológica dos mastocitomas caninos e sua correlação com o grau histológico. Os achados, embora forneceram informações úteis ao clínico, não foram capazes de prever de maneira segura o grau tumoral, isto porque, muitos dos pontos de corte utilizados neste esquema, não foram alcançados devido amostragem insuficiente, baixa celularidade e esfregaços de má qualidade, o que levou a uma subestimação do grau em 15.4% dos paciente classificados histologicamente como alto grau.

Nos casos em que o diagnóstico citológico não é possível, a biópsia incisional com *punch* ou agulha *tru-cut* deve ser realizada, mesmo sendo este um método mais invasivo com risco de sangramento, não cicatrização do ponto de biópsia e estímo do crescimento tumoral, embora estas complicações sejam mais frequentes em biópsias incisórias de grandes fragmentos tumorais. O diagnóstico pré-operatório deve ser sempre buscado para um melhor planejamento cirúrgico (LONDON; SEGUIN, 2003; GIEGER et al., 2005).

O mastocitoma é uma neoplasia de células redondas, deste modo seus principais diferenciais são o linfoma, o plasmocitoma, histiocitoma, tumor venéreo transmissível e o melanoma. O mastócito diferencia-se das demais células redondas pela presença de grânulos citoplasmáticos (FOX, 1998; LAVALLE et al., 2003; LONDON; SEGUIN, 2003). A citologia do mastocitoma revela discreta população células redondas, com quantidades moderadas de citoplasma contendo grânulos metacromáticos de número e tamanhos variáveis, o núcleo é central e este pode ser encoberto pelos grânulos citoplasmáticos. O tamanho das células varia com o grau de diferenciação celular e tumores indiferenciados podem apresentar células binucleadas e figuras de mitose atípicas. Outras células que podem ser encontradas na citologia são eosinófilos, em número variável, e células fusiformes (O'KEEFE, 1990; FOX, 1998; GOLDSCHIMIT; HENDRICK, 2002; LAVALLE et al., 2003; LONDON; SEGUIN, 2003; WELLE et al., 2008).

A maioria das colorações hematológicas de rotina podem ser utilizadas no diagnóstico do mastocitoma, as colorações rápidas como a de Romanowsky coram

os grânulos de vermelho púrpura (metacromáticos), no entanto, em tumores indiferenciados ou que apresentem mastócitos com poucos grânulos, estas colorações podem ser incapazes de corá-los, neste caso colorações especiais como Wright-Giemsa, Giemsa e o Azul de Toluidina, que coram os grânulos de azul-violáceo, devem ser empregadas (O'KEEFE, 1985; DOBSON; SCASE, 2007; WELLE et al., 2008; LONDON; THAMM, 2013). Tumores indiferenciados podem apresentar poucos ou nenhum grânulo citoplasmático, neste caso a citologia é mais hábil em identificar os mastócitos que o exame histopatológico, isso se deve a maior resolução dos grânulos nesta técnica (MACY et al., 1985).

Os linfonodos regionais devem ser avaliados para pesquisa de metástases, sempre que estes estiverem aumentados, ou mesmo quando normais, devem ser avaliados em pacientes que apresentam fatores prognósticos negativos (GIEGER et al., 2003; WELLE et al., 2008). Estudos demonstraram que a citologia é um método eficaz para a detecção de metástases nos linfonodos (O'KEEFE, 1990; FOX, 1998; LAVALLE et al., 2003).

A interpretação da citologia do linfonodo pode ser um desafio, uma vez que mastócitos podem ser encontrados em aspirados de linfonodos normais, segundo os critérios seguidos pela OMS, somente a presença de mastócitos em aspirados de linfonodo é suficiente para o diagnóstico de metástase, outro esquema proposto determina que linfonodos que apresentam mais de 3% da população de células do aspirado composta por mastócitos são considerados metastáticos (SÉGUIN et al., 2001; DOBSON; SCASE, 2007; WELLE et al., 2008), seguindo estes dois esquemas o número de falsos positivos seria grande, Bookbinder et al. (1992) demonstraram que 24% dos aspirados de linfonodos de Beagles normais continham mastócitos.

Krick et al. (2009) propuseram um novo esquema de avaliação dos linfonodos, neste estudo os linfonodos foram classificados em normais, reativos, hiperplásicos e possivelmente metastáticos. Os linfonodos foram classificados como provavelmente metastáticos quando eram visualizados mais que 3 agregados de 2-3 mastócitos e/ou, dois a cinco agregados com mais de três mastócitos. A classificação de linfonodo metastático foi dada para esfregaços onde o infiltrado mastocitário encobria as células linfóides e/ou os mastócitos mostravam-se pobremente diferenciados, com pleomorfismo, anisocitose, anisocariose e/ou presença de mais de cinco agregados de mastócitos com mais de três células. A classificação seguindo estes critérios mostrou uma especificidade de 96% e uma

sensibilidade de 100%. Os pacientes que tiveram os linfonodos considerados metastáticos apresentaram sobrevida inferior aos que não tinham metástases, mostrando que a citologia do linfonodo contribui para o estadiamento clínico destes pacientes.

3.3.2 Exame histopatológico

Como mencionado anteriormente o exame citológico, embora um bom método para o diagnóstico do mastocitoma, não é capaz de graduar esta neoplasia. A graduação destes tumores é realizada a partir da avaliação histológica de fragmentos obtidos por biopsia incisional ou após a excisão cirúrgica, e neste caso, o exame histopatológico é fundamental não só para a graduação do tumor, como também para a avaliação das margens cirúrgicas (O'KEEFE, 1990; LONDON; SEGUIN, 2003; MISDORP, 2004; DOBSON; SCASE, 2007; LONDON; THAMM, 2013). O grau histopatológico é o fator prognóstico mais consistente para prever o comportamento biológico do mastocitoma canino, correlacionando-se significativamente com o tempo de sobrevivência (LONDON; SEGUIN, 2003; THAMM et al., 2006).

O diagnóstico histológico do mastocitoma é simples, na maioria dos casos os tumores apresentam-se como formações dérmicas e/ou subcutâneas não encapsuladas, de crescimento infiltrativo, compostas por células redondas. A morfologia celular depende do grau de diferenciação tumoral, mas a maioria dos mastócitos neoplásicos mostra membrana celular distinta, núcleo esférico e central com número variável de grânulos citoplasmáticos que se coram de cinza azulado com Hematoxilina - Eosina ou roxo com colorações metacromáticas, como o Azul de Toluidina (GOLDSCHIMIT; HENDRICK, 2002; WELLE et al., 2008).

Eosinófilos podem ser observados na periferia do tumor como células isoladas ou formando grandes agregados, estas células não devem ser interpretadas como parte do tumor no momento da avaliação das margens (GOLDSCHIMIT; HENDRICK, 2002). No mastocitoma os eosinófilos participam da formação do estroma e influenciam a angiogênese, são associados à necrose e

hemorragia, sendo atribuída a eles a responsabilidade pelos efeitos deletérios aos tecidos infiltrados. A IL-5 produzida por mastócitos e pelos próprios eosinófilos tem papel fundamental na atração destas células para o local da lesão (RECH et al., 2004). Segundo Goldschmidt e Hendrick (2002), a presença de eosinófilos pode auxiliar no diagnóstico dos mastocitomas pouco diferenciados, diferenciando estes tumores de outras neoplasias de células redondas, o método histoquímico Azul de Toluidina, também pode auxiliar nesta confirmação, pois permite a visualização dos grânulos citoplasmáticos, que são de difícil visualização em outras técnicas de coloração, a diminuição da afinidade por corantes básicos deve-se a diminuição da sulfatação dos grânulos citoplasmáticos em mastócitos neoplásicos, tornando-os menos ortocromáticos, a perda da afinidade por estes corantes é maior quanto menor o grau de diferenciação celular (RECH et al., 2004).

A graduação histopatológica tem sido o método de eleição para predizer o comportamento biológico dos mastocitomas. Vários esquemas de graduação têm sido propostos, sendo o mais utilizado o de Patnaik, Ehler e MacEwen (1984) (MACY, 1986; O'KEEFE, 1990; LONDON; SEGUIN, 2003; STREFEZZI; XAVIER; CATÃO-DIAS, 2003). Este esquema divide os tumores em 3 categorias: grau I ou bem diferenciado, o grau II ou moderadamente diferenciado e grau III ou pouco diferenciado, esta classificação se baseia em critérios histomorfológicos subjetivos, como extensão do tumor, celularidade, morfologia celular, índice mitótico e reação estromal (PATNAIK et al., 1984), gerando com isso variações intra e interobservadores, sendo esta apontada como a maior fraqueza deste sistema de classificação (O'KEEFE, 1990 STREFEZZI; XAVIER; CATÃO-DIAS, 2003; NORTHRUP et al., 2005). Diante disso Kiupel et al., (2011), procurando melhorar a concordância entre patologistas e proporcionar uma melhor significância prognóstica, propuseram um novo esquema de classificação dos mastocitomas caninos dividindo-os em tumores de baixo e alto grau. O diagnóstico de mastocitomas de alto baseia-se na presença de qualquer um dos seguintes critérios: pelo menos 7 figuras de mitose em 10 campos de alta definição, pelo menos três células multinucleadas (3 ou mais núcleos) em cada 10 campos de alta definição, pelo menos três núcleos bizarros em 10 campos de alta definição; cariomegalia (diâmetro nuclear de pelo menos 10% das células neoplásicas variam

com aumento de pelo menos duas vezes). Os campos com maior atividade mitótica ou com o maior grau de anisocariose devem ser selecionados para

avaliação dos diferentes parâmetros. Em contraste a classificação de Patnaik critérios como: a invasão tumoral, reação estromal e granulação citoplasmática não foram incluídos. Esta nova classificação demonstrou uma concordância de 96,8% entre os patologistas. No comparativo dos dois esquemas de classificação Takeuchi et al. (2013) observaram uma concordância significativamente maior inter-observador para o sistema de Kiupel em comparação com a classificação de Patnaik.

3.3.3 Exames de imagem

A decisão pela realização dos exames de imagem, como ultrassom de abdômen, RX de tórax, citologia de formações esplênicas ou hepáticas e tomografia computadorizada (TC), baseia-se na presença ou ausência de fatores prognósticos negativos, estes exames auxiliam no estadiamento clínico e determinação do prognóstico de cães com mastocitoma, (LONDON; THAMM, 2013). A ultrassonografia é indicada para a avaliação dos linfonodos abdominais e sublobares, fígado e baço e pesquisa de mastocitoma visceral, as alterações ultrassonográficas associadas ao mastocitoma não são específicas, no entanto quando a metástase está presente ela apresenta um padrão mais nodular que difuso (ROGERS, 1996). Citologia aspirativa, guiada pelo ultrassom de formações localizadas em fígado e baço, é recomendada, mas a sua interpretação pode ser um pouco difícil, uma vez que os mastócitos estão presentes nestes órgãos mesmo em condições normais (LONDON; THAMM, 2013).

A radiografia torácica raramente apresenta alguma alteração, uma vez que a metástase pulmonar não é comum nesta neoplasia, quando esta ocorre há a prevalência do padrão intersticial ao nodular, embora linfonodomegalia, efusão pleural e formações mediastinais, já tenham sido documentadas. A radiografia fica indicada para a avaliação dos linfonodos mediastinal, esternal e hilar e pesquisa de afecções concomitantes (ROGERS, 1996; LONDON; SEGUIN, 2003; LONDON; THAMM, 2013).

A TC é indicada como forma de prover informações a respeito do tamanho da formação cutânea, grau de invasão nos tecidos adjacentes e resposta ao tratamento quimioterápico, auxiliando no melhor planejamento clínico-cirúrgico (LORIGADOS et al., 2012; LONDON; THAMM, 2013), embora a mensuração do mastocitoma possa ser realizada clinicamente, as margens tomográficas fornecem mensurações mais precisas, especialmente quando essas lesões se estendem em direção ao subcutâneo e musculatura adjacente (LORIGADOS et al., 2012). Os achados tomográficos são utilizados no auxílio da avaliação da resposta tumoral frente ao tratamento quimioterápico, seguindo os critérios do RECIST (Response Evaluation Criteria in Solid Tumors), essa avaliação utiliza mensurações unidimensionais dos tumores antes e depois de serem submetidos a quimioterapia, classificando a doença em quatro categorias: remissão completa, remissão parcial, doença estável e doença progressiva (EISENHAUER et al., 2009; A et al., 2013).

Com a introdução de novos softwares de reconstrução de imagens multiplanares e 3D, as mensurações volumétricas dos tumores passaram a ser consideradas na avaliação da resposta terapêutica. Sohaib et al. (2000) afirmam que há certa limitação na acurácia e reprodutibilidade do método para lesões pequenas. Quando mensurações volumétricas são utilizadas, um aumento maior que 40% do volume das lesões é considerado como doença progressiva e uma redução de pelo menos 65%, resposta parcial. A introdução das terapias direcionadas a alvos moleculares tem promovido uma discussão a respeito das reais alterações observadas a TC e na mensuração do volume que correspondem a resposta tumoral a determinada terapia. Em pacientes com tumores estromais gastrointestinais (GIST) tratados com mesilato de imatinibe a diminuição do tamanho do tumor nem sempre é observada, nestes caso, o surgimento de áreas de hipotenuação no interior das lesões também são consideradas na determinação da resposta (STACCHIOTTI et al., 2009b; DESAI, 2011).

3.3.4 Exames laboratoriais

Fazem parte da avaliação laboratorial mínima de pacientes com câncer o hemograma, perfil bioquímico e exame de urina. Cães com mastocitoma podem apresentar eosinofilia e basofilia, devido à liberação de fatores quimiotáticos e IL-5 pelos mastócitos, anemia devido ao hiperesplenismo ou sangramento gastrointestinal e os mastócitos podem ser vistos, ocasionalmente, no esfregaço sanguíneo indicando um quadro de mastocitose sistêmica (MACY, 1986; O'KEEFE, 1990; LONDON; SEGUIN, 2003). A detecção de mastócitos no sangue periférico é melhor realizada através da avaliação da capa leucocitária, mas este exame deve ser interpretado com cautela, uma vez que doenças inflamatórias são a principal causa de mastocitemia em cães, deste modo a avaliação da capa leucocitária fica indicado para os casos de suspeita de leucemia ou mastocitose sistêmica (O'KEEFE, 1990; LONDON; THAMM, 2013).

Os mastócitos são raramente observados na medula óssea (MO) de animais saudáveis. Em cães com mastocitoma a infiltração na MO está associada a um prognóstico ruim, geralmente a infiltração vem seguida de alterações no sangue periférico incluindo anemia, trombocitopenia, leucocitose, leucopenia, eosinofilia, e basofilia. Em dois estudos recentes 33% e 21.4% dos animais, respectivamente, com comprometimento da medula óssea apresentaram hemograma normal, os autores concluíram que a falta do mielograma pode resultar em estadiamento inadequado dos pacientes, esta avaliação deve ser realizada através de múltiplas punções, uma vez que as células tumorais não apresentam uma distribuição uniforme na MO e aspirados únicos podem subestimar o comprometimento medular (MARCONATO et al., 2008; AUBRY et al., 2014).

3.3 ESTADIMENTO CLÍNICO

O estadiamento clínico é uma maneira, estabelecida pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (Quadro 1), de determinar, de forma subjetiva, o envolvimento local

ou sistêmico de uma neoplasia, influenciando o prognóstico e auxiliando na decisão do tratamento.

Quadro 1 – Estadiamento clínico dos mastocitomas, segundo a Organização Mundial de Saúde

Estadiamento	Características
0	Tumores incompletamente excisados, confinados a derme, sem envolvimento de linfonodo regional
I	Tumores confinados a derme, sem envolvimento de linfonodo regional
II	Tumores confinados a derme com envolvimento do linfonodo regional
III	Múltiplos tumores, ou tumor grande e infiltrado, com ou sem envolvimento do linfonodo regional
IV	Qualquer tumor com presença de metástases distantes, incluindo infiltração em MO e mastocitemia, ou recorrência com metástase
a	Ausência de sinais sistêmicos
b	Presença de sinais sistêmicos

Fonte: (LONDON; THAMM, 2013)

3.5 PROGNÓSTICO

A dificuldade em prever o comportamento biológico dos mastocitomas, faz com que a busca por indicadores prognósticos mais precisos seja intensa, diversos métodos tem sido investigados e utilizados, mas nenhum fator é capaz de prever, sozinho, o comportamento biológico ou resposta desta neoplasia. Os fatores que podem influenciar o prognóstico são: localização, aparência clínica da neoplasia, velocidade de crescimento, tamanho tumoral, presença de síndrome paraneoplásica, raça e estágio clínico, margens cirúrgicas, atividade mitótica, morfometria nuclear, densidade vascular, bem como marcadores moleculares, incluindo marcações imunohistoquímica para proliferação, como o Ki-67, PCNA e, AgNOR e padrão de marcação imunohistoquímica do KIT e do VEGF. As mutações no gene *c-kit* também tem apresentado correlação com o prognóstico (LONDON; SEGUIN, 2003; STREFEZZI et al., 2010; THOMPSON et al., 2011).

3.5.1 Parâmetros clínicos

A localização do mastocitoma é uma variável importante na determinação do prognóstico (CAHALANE et al., 2004). Tumores localizados na cavidade oral, junções muco-cutâneas, leito ungueal, região inguinal, prepucial e perineal, independentemente do grau histológico, têm prognóstico mais reservado, que os tumores localizados em outras regiões, apresentando maior predisposição a metástase, recorrência local e menor tempo de sobrevida (GIEGER et al., 2003; CAHALANE et al., 2004)

Tumores ulcerados, eritematosos e presença de prurido local, têm sido associados a um pior prognóstico, assim como a recorrência local (WELLE et al., 2008, LONDON; THAMM, 2013). A presença de tumores múltiplos também é indicativa de pior prognóstico (KIUPEL et al., 2005) embora estudos recentes não tenham encontrado correlação negativa entre a presença de múltiplos nódulos e redução do tempo e sobrevida ou aumento na incidência de metástases (MULLINS et al., 2006; MURPHY et al., 2006; SCHULTHEISS et al., 2011).

A taxa de crescimento tumoral, é determinada dividindo o volume tumoral pelo tempo que o tumor está presente, é um importante indicador de prognóstico. Tumores presentes por longo período de tempo, de tamanho e características estáveis, tendem a ter comportamento benigno e prognóstico favorável, já tumores grandes e de evolução rápida apresentam pior prognóstico (LONDON; SEGUIN, 2003).

A raça pode influenciar no prognóstico, cães da raça boxer e outras raças braquiocefálicas, apresentam uma alta incidência de mastocitoma, que tendem a ser de baixo grau ou grau intermediário, portanto, associados a um melhor prognóstico. Os shar-peis, também apresentam predisposição ao desenvolvimento de mastocitomas, mas nestes animais, assim como nos labradores retrievers, a doença tende a ser mais agressiva. Os golden retrievers apresentam maior risco de desenvolvimento de tumores múltiplos (MILLER, 1995; MURPHY et al., 2006; DOBSON; SCASE, 2007; WELLE et al., 2008).

O estadiamento clínico é utilizado para auxiliar na decisão do tratamento, estabelecimento do prognóstico e da resposta ao tratamento. Quanto maior o estágio do animal pior o prognóstico, deste modo pacientes com estágio 0 da

doença apresentam maior tempo e sobrevida, que aqueles com doença metastática. Paciente com comprometimento do linfonodo regional no momento do diagnóstico apresentam aumento da incidência de metástases distantes e consequentemente menor tempo de sobrevida. Em um estudo, onde 220 cães com MCT tiveram os linfonodos regionais palpáveis (normais e aumentados) avaliados por PAAF, 30,9% apresentavam linfonodos comprometidos, destes 39,5% mostravam metástases distantes. No entanto, estudos recentes têm sugerido que, quando instituída a terapia apropriada, a estágio clínico passa a ter valor prognóstico menor e pacientes com estágio clínico mais alto podem apresentar baixa incidência de metástases e longo tempo de sobrevida (MURPHY et al., 2006; THAMM et al., 2006; WARLAND; DOBSON, 2013). Os sinais sistêmicos, como anorexia, vômitos, melena, eritema generalizado, edema e ulceração gastrointestinal são mais frequentes na forma visceral do mastocitoma, estando associados a um pior prognóstico (LONDON; THAMM, 2013).

3.5.2 Graduação histológica

O grau histológico é o fator prognóstico mais consistente e correlaciona-se significativamente com a sobrevivência, mas não é capaz de prever o comportamento de todos os tumores. A maioria dos cães com tumores bem diferenciados (80% a 90%) apresentam comportamento benigno e a excisão cirúrgica completa geralmente é curativa, destes cães 75% a 90% não irão morrer como consequência do mastocitoma, estes representam entre 30% e 55% dos mastocitomas (PATNAIK et al., 1984; SIMOES et al., 1994; LONDON; SEGUIN, 2003; SCHULTHEISS et al., 2011). Pacientes com tumores moderadamente diferenciados têm prognóstico altamente variável, podendo apresentar comportamento benigno como o grau I ou extremamente agressivo como o grau III. Representam entre 25% e 45% dos mastocitomas e aproximadamente 75% destes animais apresentam longo tempo de sobrevida após excisão cirúrgica completa (PATNAIK et al., 1984; SCHULTHEISS et al., 2011). Séguin et al. (2001) relataram baixo índice de recorrência para o grau II e longo tempo de sobrevida em 84 % dos cães avaliados. Tumores pouco diferenciados representam entre 20% e 40% dos

casos de mastocitoma, comportam-se frequentemente de forma agressiva, exibindo metástases no início do curso da doença. O tempo médio de sobrevida de cães com tumores grau III tem sido de aproximadamente 1 ano, quando tratados apenas com cirurgia (LONDON; THAMM, 2013). Estudos tem demonstrado que o esquema de classificação proposto por Kiupel, tem apresentado uma melhor correlação com o prognóstico, quando comparado com o de Patnaik. Mastocitomas de alto grau foram significativamente associados com menor tempo de desenvolvimento de metástase ou de novos tumores, ou seja, com menor tempo de intervalo livre de doença, e com menor tempo de sobrevida, nestes animais o tempo médio de sobrevida foi menos de 4 meses comparados com mais de que 2 anos para mastocitomas de baixo grau, sendo assim este esquema tem se mostrado uma ferramenta prognóstica útil para cães e um fator preditor independente para sobrevida global e intervalo livre de doença. (KIUPEL et al., 2011; TAKEUCHI et al., 2013).

3.5.3 Índice mitótico

O índice mitótico (IM) é uma medida indireta da proliferação celular baseado na quantificação das figuras de mitose em uma amostra histopatológica, é uma técnica de fácil execução, não sendo necessário uso de colorações especiais. Tem sido realizada para avaliação da atividade proliferativa de neoplasias humanas, como carcinomas tireoidianos e mamários, e de animais, como sarcomas de partes moles, tumores mamários e melanomas cutâneos, tendo demonstrado ser um indicador prognóstico. Entre as limitações desta técnica estão as variações intra-observadores, a necessidade do uso de objetivas de tamanhos variados, a dificuldade de identificação dos núcleos em divisão em mastócitos altamente granulado, além de representarem apenas uma das fases do ciclo celular, a fase M (ROMANSIK et al., 2007; WELLE et al., 2008; ELSTON et al., 2009; BLACKWOOD et al., 2012).

Em cães com mastocitoma a contagem do número de figuras de mitoses tem sido descrita como fator prognóstico independente de outras características histológicas. Romansik et al. (2007) demonstraram uma correlação positiva entre o

grau da neoplasia, segundo PATNAIK et al. (1984) e o índice mitótico, além disso, pacientes com índice mitótico maior que 5 apresentaram maior taxa de metástase e redução significativa no tempo de sobrevida. Outros *cut-off* também foram utilizados e em todos os estudos índices mitóticos maiores foram relacionados a pior prognóstico (WELLE et al., 2008a; BLACKWOOD et al., 2012). Na nova classificação histológica proposta por Kiupel (2011) o índice mitótico está entre os critérios para determinação do grau, onde tumores com IM maior que 7 são classificados como alto grau e relacionados a pior prognóstico.

3.5.4 Marcadores de ciclo celular

A propensão para a proliferação celular descontrolada é uma característica marcante no câncer, conseqüentemente as medidas de proliferação celular têm sido amplamente utilizada para determinar o prognóstico das doenças neoplásicas (WEBSTER et al., 2007).

Alguns índices de proliferação celular têm sido amplamente estudados no mastocitoma, de forma geral, quanto maior a contagem/expressão desses marcadores, pior o prognóstico. A determinação da frequência de regiões organizadoras nucleares com a afinidade pela prata (AgNOR) proporciona uma mensuração indireta da proliferação celular. A contagem de AgNOR tem sido correlacionada com o grau do tumor: contagens mais elevadas AgNOR são vistas em tumores de maior grau. A contagem elevada de AgNOR também foi associada com uma menor tempo de sobrevida, deste modo, quanto maior a contagem do AgNOR pior o prognóstico (SIMOES et al., 1994; LONDON; SEGUIN, 2003; WEBSTER et al., 2007).

O ki-67 é uma proteína nuclear formada por duas subunidades proteicas expressa em todas as fases ativas do ciclo celular (G1, S, G2, e mitose) estando ausente em células em repouso (G0). Estas características fazem do Ki-67 um excelente marcador de proliferação celular, sendo considerado a melhor ferramenta para avaliação da fração de crescimento de uma população de células. O número relativo de células positivas para Ki67 é utilizada para determinar o índice de

proliferação ou o número relativo de células ativamente envolvidas no ciclo celular. A meia vida desta proteína é curta, sendo degradado aproximadamente uma hora após a mitose, sendo assim, mesmo marcações tênues podem ser consideradas positivas. O anticorpo monoclonal MIB-1 é utilizado para detecção da proteína Ki-67 expressa em tumores de cães e humanos (SCASE et al., 2006a; OZAKI et al., 2007).

Em alguns tumores caninos a frequência de expressão do Ki-67 por células neoplásicas é significativamente associada ao prognóstico, no mastocitoma canino a alta expressão de ki-67 está associada ao aumento da mortalidade e consequente redução da sobrevida, sendo assim, sua importância está em ser um indicador prognóstico para sobrevida global independente da classificação histológica, sendo útil na subdivisão dos mastocitomas grau II quanto à agressividade (SCASE et al., 2006a; DOBSON; SCASE, 2007; MAGLENNON et al., 2008). A mesma correlação não é observada na predição da recorrência local, em tumores incompletamente excisados, e desenvolvimento da doença metastática, no entanto, a sua combinação aos escores de PCNA mostrou-se prognóstica para recorrência local em mastocitomas grau II com margens comprometidas (SÉGUIN et al., 2006; OZAKI et al., 2007).

3.5.5 Padrão imunohistoquímico do KIT

O padrão de expressão imunohistoquímica da proteína KIT no mastocitoma tem sido relacionado ao comportamento biológico e classificação histológica desta neoplasia (KIUPEL et al., 2004; PREZIOSI et al., 2004). Reguera et al. (2000) identificaram aumento da expressão de KIT quanto menor a diferenciação tumoral, além da existência de dois padrões de marcação imunohistoquímica, sendo um na membrana citoplasmática e outro no citoplasma, geralmente ao redor do núcleo.

Kiupel et al (2004) estabeleceram 3 padrões de marcação da proteína KIT, o padrão membranoso ou KIT I, com marcação evidente da membrana celular e mínima marcação citoplasmática, padrão citoplasmático focal, com perda da marcação membranosa, ou KIT II e o padrão citoplasmático difuso ou KIT III, onde a

marcação obscurece outras características citoplasmáticas. Estes padrões foram correlacionados com a agressividade do tumor, sendo que animais que possuíam padrões de KIT II e III apresentaram prognóstico desfavorável, estando esta localização aberrante da proteína relacionada à mutação no gene c-kit. A expressão do KIT tem alta correlação com o grau histológico, índice mitótico, Ki67 e AgNOR, a análise conjunta destes marcadores proporciona melhores resultados na caracterização do comportamento biológico dos mastocitomas (WEBSTER et al., 2006; GIL DA COSTA et al., 2007; WEBSTER et al., 2007; WEBSTER et al., 2008).

SAILASUTA et al. (2014) avaliaram o padrão de expressão do KIT por imunocitoquímica e observaram uma predominância do padrão membranoso em mastocitomas de baixo grau e do padrão difuso nos mastocitomas de alto grau, resultados estes semelhantes aos observados na avaliação imunohistoquímica; mostrando que a citologia é um bom método de coleta de material para avaliação da biologia dos mastocitomas, mas não é capaz de predizer o grau histológico com base nos achados de expressão do KIT e presença de mutações.

3.5.6 Mutações no oncogene c-kit

A presença de mutações no gene c-kit está associada a tumores de comportamento biológico mais agressivo, e consequentemente a um pior prognóstico (ZEMKE et al., 2002; WEBSTER et al., 2007).

Webster et al. (2006) observaram uma correlação positiva entre a mutação no domínio da justamembrana do mastocitoma e a localização aberrante do KIT por imunohistoquímica. Os animais que possuíam mutação no gene c-kit apresentavam uma localização aberrante do receptor KIT, que coincidiu com a agressividade da neoplasia e um prognóstico ruim relacionado a menor sobrevida e/ou baixo intervalo de tempo livre da doença. Porém nem todos os animais que possuem localização aberrante do KIT possuem mutação do c-kit, mostrando que outros fatores também podem provocar uma localização aberrante do receptor. Webster; Kiupel; Yuzbasiyan-Gurkan (2006) pesquisaram mutações no domínio quinase, porém estes pesquisadores não encontraram mutações ou polimorfismos que justificassem o

padrão de expressão aberrante do KIT, além disso o domínio quinase parece não contribuir para a progressão dos mastocitomas caninos.

Webster et al. (2007) demonstraram que mutações do tipo duplicações internas em tandem estavam associadas a localização aberrante do receptor KIT e ambos, associados ou não, apresentavam correlação com o aumento dos índices de proliferação celular Ki67 e AgNOR, sugerindo um papel fundamental do *c-kit* na progressão do mastocitoma.

Takeuchi et al. (2013) avaliaram 47 cães com mastocitoma, 72% apresentavam mutações no gene *c-kit*, mas somente 17% foram descritas como DIT e estas estavam presentes somente nos pacientes com tumores de alto grau, sua presença foi correlacionada a tumores mais agressivos, menor intervalo livre de doença e sobrevida reduzida; confirmando os achados já descritos, resultados semelhantes foram observados por Sailasuta et al., (2014) ao utilizarem material proveniente de biopsias aspirativas de mastocitomas para avaliação da natureza biológica destes tumores, este grupo observou correlação significativa entre o alto grau histológico, localização aberrante do receptor KIT e presença de mutações do tipo duplicações constitutivas internas. Assim como Marconato et al., (2013) ao compararem as mutações presentes nos tumores primários e nas metástases, também encontraram correlação entre a presença da mutação e tumores mais agressivos.

Turin et al. (2006) avaliaram a expressão do mRNA do *c-kit* através de Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real realizada tanto na formação, como no sangue dos animais com mastocitoma, sendo este sangue coletado em 3 tempos – antes da cirurgia, durante e após a cirurgia, com 3, 6 e 9 meses. Estes autores avaliaram esta aferição como indicador de prognóstico para mastocitomas em cães, avaliando seu comportamento clínico, comparando com outros parâmetros. A expressão do *c-kit* não foi significativamente relacionado com o tamanho, localização, graduação do tumor, comportamento biológico, tratamento e sobrevivência dos animais.

Giantin et al. (2012) avaliaram a expressão do mRNA do gene *c-kit* em 60 tecidos tumorais de cães com mastocitoma e sua correlação com o grau histológico, padrão de expressão imunohistoquímica do KIT e status de mutação. Os pacientes com mastocitoma apresentaram expressões do gene significativamente maiores que a pele normal e embora a expressão tenha sido maior nos tumores de alto grau, não

foi observada correlação significativa entre as duas variáveis. A expressão do gene também não foi relacionada ao padrão de expressão do KIT ou a presença de mutação, sugerindo que estes 3 eventos sejam independentes.

Costa Casagrande et al. (2013) observaram um aumento da expressão do gene *c-kit* e do ligante do KIT em tecido tumoral de cães com mastocitoma, a expressão do ligante do KIT apresentou associação prognóstica com a recidiva e sobrevida destes pacientes, mesmo resultado não foi observado com a expressão do KIT. Este grupo concluiu ainda que a RT-PCR é um método sensível para a detecção quantitativa da expressão do gene KIT no mastocitoma canino

3.6 TRATAMENTO

A decisão do tratamento é baseada na presença ou ausência de fatores prognósticos negativos e o estágio clínico da doença. As opções de tratamento para os mastocitomas são: a cirurgia, a quimioterapia, a radioterapia ou a combinação destes (LONDON; THAMM, 2013). Os tumores localizados podem ser tratados com terapia local, como cirurgia e/ou radioterapia (LAVALLE et al., 2003), entretanto, tumores disseminados devem ser tratados com medicações sistêmicas, como os quimioterápicos, onde a remissão pode acontecer, mas dificilmente a cura é conseguida. Os tumores bem diferenciados e aproximadamente 60 a 75% dos cães com mastocitomas de grau intermediário têm demonstrado sobrevida mais longa após a excisão cirúrgica completa de tumores cutâneos. Os cães com tumores pouco diferenciados com a mesma terapia apresentam sobrevida de aproximadamente seis meses devido a metástases ou recorrência local. A cirurgia e a radioterapia são descritas como as melhores opções de tratamento. (LONDON; THAMM, 2013).

A cirurgia é o tratamento de escolha para tumores localizados em pele, subcutâneo ou áreas onde é possível a realização de excisão cirúrgica ampla, com margens de segurança de pelo menos três centímetros de diâmetro nas quatro direções (SÉGUIN et al., 2001; LONDON; THAMM, 2013), embora alguns estudos têm demonstrado que 2 cm de margens laterais pode ser suficiente para

mastocitomas bem diferenciados (SIMPSON et al., 2004). As margens profundas são tão importantes quanto às margens laterais, os tecidos adiposo, subcutâneo e parenquimatoso não são capazes de conter a invasão tumoral, não sendo considerado uma margem segura, já tecidos conjuntivos ou pouco vascularizados são resistentes a invasão tumoral, comportam-se como boas barreiras biológicas contra o câncer (LIPTAK; PAGE, 2009), portanto, a margem profunda deve incluir um plano de fáscia, que não tenha sido invadido pelo tumor, que deve ser removido em bloco com a formação cutânea, isto pode implicar na remoção da fáscia muscular e, em alguns casos, de grupos musculares, os linfonodos regionais citologicamente positivos para metástase também devem ser excisados. Todo o material excisado deve ser avaliado histologicamente, incluindo as margens cirúrgicas, uma vez que as células neoplásicas, muitas vezes ultrapassam as margens observáveis e palpáveis do tumor e a avaliação clínica dos limites tumorais raramente corresponde à extensão real do tumor (LONDON; SEGUIN, 2003; LIPTAK; PAGE, 2009; BLACKWOOD et al., 2012; LONDON; THAMM, 2013).

Nos casos em que as margens cirúrgicas apresentam-se contaminadas, uma nova intervenção cirúrgica deve ser realizada, quando possível, ou terapias adjuvantes como radioterapia local ou quimioterapia devem ser instituídas, apenas 30% dos tumores com bordos contaminados têm histórico de recorrência local (OGILVIE; MOORE, 1995; LONDON; THAMM, 2013; SCHULTHEISS et al., 2011). De forma geral, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a escolha pelo procedimento cirúrgico deve ser feita quando o tumor apresenta-se em massa única, com ou sem acometimento dos linfonodos regionais. Já nos casos onde há metástases, ou na existência de várias massas tumorais, devem-se realizar outros tipos de abordagem como a quimioterapia ou a radioterapia (O'KEEFE, 1990; MISDORP, 2004; BLACKWOOD et al., 2012; LONDON; THAMM, 2013).

A quimioterapia para o mastocitoma é indicada para tratar a doença sistêmica, diminuir o volume tumoral para posterior tratamento cirúrgico, ou ainda para evitar a recorrência da doença, inclusive nos casos de margens comprometidas, ou na existência de metástases para linfonodos regionais ou distantes. Portanto, a indicação maior da quimioterapia é para os tumores multicêntricos, e tumores de grau II e III, doenças com estágio clínico avançado, e tumores com características biológicas sugestivas de agressividade (GRANT et al., 2008).

Os corticosteróides, como a prednisona/prednisolona, têm sido amplamente utilizados, sendo estes citotóxicos para as células neoplásicas. Sua ação baseia-se na redução da síntese de DNA e do índice mitótico, reduzindo consequentemente a multiplicação de células tumorais. A localização citoplasmática dos receptores para este fármaco pode ajudar a explicar a sua eficácia. Os corticosteróides inibem a produção de fatores de crescimento e citocinas, dos quais as células são dependentes, induzindo a apoptose. Os glicocorticóides contribuem aparentemente na resposta anti-tumoral pela diminuição do edema e inflamação peritumoral (MACY, 1985; SUEIRO; DALECK.; ALESSI, 2002; MISDORP, 2004). Stanclift; Gilson (2008) avaliaram 49 animais com mastocitomas inoperáveis, tratados com prednisona antes do tratamento cirúrgico, destes 70% apresentaram redução do volume tumoral, sendo que 13% dos animais apresentaram remissão total, 57% resposta parcial e 91% das formações tornaram-se operáveis.

A vinblastina (VBL) é um agente citotóxico conhecido por diminuir a dinâmica dos microtúbulos, resultando na parada do ciclo celular na metáfase, além disso, apresenta efeito citotóxico sobre as células que não estão em divisão, induz a apoptose, interfere com suprimento vascular do tumor e na síntese de DNA, RNA e proteínas intracelulares (RASSNICK; BAILEY, 2008). A dose preconizada para este quimioterápico é de 2 mg/m², embora estudos recentes tenham demonstrado que doses até 3,5 mg/m²/2 semanas são bem toleradas, a proposta do uso de doses mais altas se baseou no conceito de que quanto maior a dose do fármaco em um intervalo de tempo, maior a eficácia no tratamento. A intensidade da dose quimioterápica é preditiva de taxa de remissão e de sobrevida em pessoas com diferentes tipos de câncer, incluindo as neoplasias mamárias, linfoma não-Hodgkin e o carcinoma pulmonar de pequenas células (BAILEY et al., 2008). Ao se comparar as duas doses da vinblastina, foi observado, 12% dos pacientes tratados com a dose padrão apresentaram resposta parcial com média de duração de 77 dias. A taxa de resposta global com a dose de 3,5 mg/m²/2 semana foi de 27%, destes 4% apresentaram remissão completa com duração de 63 dias e 23% resposta parcial com duração de 28 dias, o principal efeito tóxico observado neste grupo foi a leucopenia. (RASSNICK; BAILEY, 2008).

O maior sucesso com o tratamento quimioterápico se dá com o uso de protocolos de poliquimioterapia. O uso da vinblastina, na dose de 2,0 mg/m², IV, uma vez por semana, por quatro semanas, e após a cada 15 dias, completando 12

semanas de tratamento, em combinação com a prednisona, na dose de 2,0 mg/kg/uma vez ao dia, via oral, por sete dias, após 1,0 mg/kg/uma vez ao dia, via oral, por duas semanas e após 0,5 mg/kg/ uma vez ao dia, até completar 12 semanas, apresenta taxas de resposta acima de 78%, sendo este o protocolo padrão para o tratamento do mastocitoma (THAMM et al., 2006; DOBSON; SCASE, 2007). Pacientes com tumores grau II e III tem se beneficiado com o uso da quimioterapia adjuvante, principalmente aqueles com doença microscópica residual na avaliação histológica das margens do tumor, apresentando maior intervalo livre de doença e tempo de sobrevida, que aqueles tratados somente com cirurgia (DAVIES et al., 2004). Pacientes com grau elevado de mastocitoma, tratados com cirurgia e terapia adjuvante com o protocolo acima, têm média de sobrevida de 331 dias, com 45% destes pacientes com sobrevida entre um e dois anos (THAMM et al., 2006), em outro estudo o mesmo protocolo promoveu taxa de resposta de 50 % com duração de média 154 dias, 40% dos tumores de grau intermediário e 60% dos de alto grau responderam ao tratamento, embora não tenha sido encontrada associação entre grau histológico, a duração e tipo de resposta (THAMM; MAULDIN; VAIL, 1999).

Webster et al. (2008) observaram aumento do tempo de sobrevida dos pacientes com mastocitomas grau III, que receberam tratamento adjuvante com vimblastina e prednisona. Este estudo confirmou o valor prognóstico do grau histológico, mutações no *c-Kit*, padrões de coloração KIT e dos índices de proliferação, estes autores observaram que cães com mutações no c-KIT tendem a apresentar aumento no intervalo livre de doença e tempo de sobrevida em comparação com os pacientes tratados apenas com cirurgia. A associação de vimblastina e prednisona também é indicada como alternativa a radioterapia para o controle local de tumores excisados com margens, sendo relatada taxa de controle local de 12 a 24 meses para tumores de grau intermediário e alto grau (DAVIES et al., 2004).

Outros fármacos são citadas, mas ainda sem comprovação clínica de sua eficiência, como a L-asparaginase, a ciclofosfamida e a doxorubicina (MACY, 1985; O'KEEFE, 1990; SUEIRO; DALECK.; ALESSI, 2002). A vincristina, na dose de 0,75 mg/m², por semana, mostrou-se um tratamento ineficiente como única forma de tratamento para os mastocitomas (MISDORP, 2004). A lomustina é muito utilizada no tratamento de linfoma e tumores cerebrais em cães, e recentemente foi

demonstrada sua efetividade contra o mastocitoma canino, com taxa de resposta em aproximadamente 42% dos animais tratados. (LONDON; SÉGUIM, 2003). A dose utilizada é entre 60 – 100 mg/m², por via oral, a cada três ou quatro semanas. A lomustina é uma nitrosuréia com potencial mielotóxico alto, portanto a dose da medicação deve ser ajustada de acordo com o resultado do hemograma. O principal efeito de mielotoxicidade é neutropenia, sendo esta severa em 41% dos animais. Pode ocorrer simultaneamente emese, hematêmese, hematoquesia e diarreia (BALDI et al., 2006). A hepatotoxicidade é observada com o uso acumulativo deste quimioterápico (CAHALANE et al., 2004).

Os sinais clínicos sistêmicos são tratados conforme necessário. Podem-se utilizar os bloqueadores de histamina (bloqueador de H1 ou H2), como difenhidramina, ou cimetidina, ou ranitidina, ou bloqueadores de bomba de prótons (omeprazol) quando houver sinais de degranulação de histamina. Estes agentes também podem ser utilizados quando sabidamente haverá manipulação tumoral, como no ato cirúrgico, ou quando haverá degranulação *in situ*, como nos casos de radioterapia local, ou quimioterapia intralesional com a finalidade de citoredução. Em casos de ulceração gastroentérica comprovada pode-se associar o sucralfato e ocasionalmente o misoprostol (OGILVIE; MOORE, 1995; LONDON; THAMM, 2013).

Dada a presença de mutações ativas no KIT no mastocitomas caninos e a importância do KIT tipo-selvagem no crescimento e sobrevivência dos mastócitos, é razoável afirmar que estes tumores possam responder ao tratamento com pequenas moléculas inibidoras dos receptores tirosina quinase. Além disso, os mastócitos são sabidamente produtores de fator de crescimento endotelial e expressam o seu receptor contribuindo para o processo de angiogênese. Com estas informações foram promovidos estudos com intuito de avaliar a eficácia de medicações inibidoras do receptor tirosino-quinase (ITK). Estes fármacos são análogos estruturais do trifosfato de adenosina (ATP), com o qual competem para ligação na molécula da quinase, essencialmente atuam como inibidores competitivos, podendo ter a sua ação reversível ou não. Na ausência de ligação do ATP, a quinase não é capaz de se auto-fosforilar e iniciar a cascata de sinalização (LONDON, 2009).

O mesilato de imatinibe (STI571-Glivec, Novartis Phama AG, Suíça) é uma pequena molécula inibidora da proteína tirosina-quinase, foi desenvolvida como um inibidor específico do Bcr-Abl, que induzem o desenvolvimento de leucemia mielóide crônica, inibindo potentemente esta proteína nos níveis *in vitro* celular e *in vivo*.

Adicionalmente, o mesilato de imatinibe é um potente inibidor dos receptores tirosino-quinase PDGFR e KIT, inibindo eventos celulares mediados por PDGF e SCF (LONDON et al., 2003; LONDON et al., 2009).

Como mencionado anteriormente a desregulação do KIT é comum em neoplasias humanas e caninas, um exemplo é o GIST, neoplasia que se desenvolve a partir das células intersticiais de Cajal, onde o imatinibe é utilizado como tratamento inibindo a proliferação e induzindo a apoptose das células tumorais, que possuem mutações no gene *c-kit* (ISOTANI et al., 2008; WALKER et al., 2008; LONDON, 2009). Em cães mutações no domínio justamembrana do KIT estão envolvidas com a fisiopatologia do mastocitoma (WEBSTER et al., 2006), nestes casos o mesilato de imatinibe tem sido utilizado com sucesso (LONDON, 2009).

Kobie et al. (2007) relataram que linhagens de mastocitomas com mutação na região da justamembrana regrediram após o tratamento com o mesilato de imatinibe em culturas xenográficas SCID de camundongos. Takeuchi et al. (2011) ao avaliarem 3 linhagens de células de mastocitomas observaram que as linhagens que abrigam o Kit tipo-selvagem são menos sensíveis que aquelas onde o KIT está mutado, incluindo mutações DIT no domínio justamembrana, no entanto, o crescimento das linhagens com uma mutação pontual no domínio extracelular do Kit foi aparentemente suprimido pelos inibidores tirosina quinase, provavelmente pela inibição da atividade de outros receptores tirosina quinase, que não o KIT, como o PDGFR e o VEGFR. Rossi et al. (2013) utilizaram um modelo *ex vivo* para avaliar o efeito do mesilato de imatinibe no mastocitoma canino grau II com mutação no exon 11 do *c-kit*, concluíram que o imatinibe tem efeito antiproliferativo, reduzindo a expressão do KI-67, Bcl 2 e do KIT e induz a morte celular por apoptose pela via caspase-dependente.

Isotani et al. (2008) utilizaram o mesilato de imatinibe em 24 cães com mastocitoma por um curto período e observaram respostas de remissão completa ou parcial em metade dos pacientes, porém apenas cinco cães foram investigados em relação a mutações do exon 11, estes autores não puderam prever a resposta ao medicamento baseada na presença ou ausência de mutação no exon 11. Yamada et al. (2011) correlacionaram a presença de mutação por substituição no exon 9 do *c-Kit* a resposta satisfatória ao tratamento com mesilato de imatinibe em um cão, este paciente apresentava status de fosforilação alto, não só na presença do SCF, como também na sua ausência, mostrando que o Kit estava constitutivamente ativado.

Kobayashi et al (2011) utilizaram o mesilato de imatinibe no tratamento de um cão diagnosticado com mastocitoma intestinal e metástase esplênica. A pesquisa da mutação no *c-kit* foi realizada em células provenientes de biopsia aspirativa por agulha fina realizada da formação intestinal, sendo identificada uma mutação no exon 8 do gene *c-kit*, constituída de duplicação constitutiva interna, a interferência desta mutação na fosforilação do receptor foi confirmada por Western *blot*. O paciente apresentou resposta parcial com redução a 87,3% do tamanho da formação ao US e redução de 55% do tamanho da metástase com 30 dias de tratamento. O paciente apresentou recidiva no 44º dia e este foi relacionado a possível resistência a medicação adquirida pelas células tumorais.

O fosfato de toracenibe foi o primeiro ITK *multitarget* avaliado em estudos clínicos para uso veterinário. Apresenta uma boa biodisponibilidade quando administrado pela via oral, exibindo um potente efeito inibidor em diferentes receptores tirosina quinase, incluindo VEGFR, PDGFR, e KIT, apresentando, portanto, efeito antiangiogênico e anti-tumoral direto. Pacientes que não apresentam mutações no Kit podem se beneficiar com o tratamento com esta medicação devido a inibição do VEGFR e PDGFR, resultando em regressão da massa tumoral, por efeito antiangiogênico (LONDON et al., 2009; LONDON, 2009). O toracenibe tem demonstrando taxa de resposta de 42,8%, comparada ao grupo que recebeu placebo, sendo esta taxa superior a de outros agentes isolados, como vimblastina, vincristina ou vinorelbina (7 a 30%), lomustina (42%) ou prednisona (20 a 70%). Os autores inferem que deve haver uma melhor resposta na combinação do toracenib com a prednisona, pois há uma melhor taxa de resposta na combinação de vimblastina com prednisona, sendo esta taxa de resposta de 27 a 64% (LONDON et al., 2003; LONDON et al, 2009).

O masitinibe é outro potente ITK, que tem como alvo principalmente KIT e o PDGFR, e as quinases das famílias Src, Fyn, Lck e Lyn, aprovado para o uso em cães, é particularmente eficiente no controle da proliferação, diferenciação e degranulação de mastócitos (DUBREUIL et al., 2009), seu uso no tratamento do mastocitoma foi avaliado através de um estudo randomizado, duplo-cego, controlado com um grupo placebo, realizado com 200 cães diagnosticados com mastocitoma grau II e III, sem metástases, embora a sobrevida total não tenha sido significativamente diferente entre os dois grupo (15% vs 16%), o grupo tratado com masitinibe mostrou uma tendência ao aumento do tempo de sobrevida. O masitinibe

mostrou-se eficaz em inibir a progressão tumoral, aumentando significativamente o tempo de progressão da doença (75 vs 118 dias), no entanto não foi observada diferença significativa na taxa de resposta dos dois grupos. Os melhores resultados foram observados nos cães que apresentavam mutações Kit e que receberam o masitinibe como primeira linha de tratamento (HAHN et al., 2008). Os mesmos autores avaliaram 132 cães tratados com masitibe e placebo e observaram aumento significativo da sobrevida do grupo tratado com o ITK, com 62,1% dos cães sobrevivendo até um ano e 15 % até 2 anos, respostas completas, em 24 meses de tratamento, foram observadas em 9,0% dos cães com mastocitoma não operáveis (HAHN et al., 2010).

Com a finalidade de se avaliar a resposta ao tratamento quimioterápico de tumores sólidos foi criado em 2000, o RECIST (Response Evaluation Criteria in Solid Tumors), uma ferramenta clínica de grande importância na avaliação da resposta objetiva a tratamentos oncológicos, baseado na mensuração de tumores sólidos com o objetivo de determinar a redução tumoral (resposta objetiva) ou a doença progressiva para posterior caracterização da resposta ao tratamento. O critério RECIST é mundialmente aceito e tem sido utilizado em ensaios clínicos, seja por grupos acadêmicos, indústria farmacêutica ou entidades governamentais, com o objetivo de determinar os resultados a determinado tratamento. A fim de resolver uma série de questões práticas desde a sua publicação, foi realizada a coleta e simulação de dados de mais de 6.500 pacientes e uma vasta revisão da literatura, resultando na publicação do RECIST 1.1.

O RECIST 1.1 se baseia na mensuração unidimensional ou bidimensional, realizado com paquímetro e tomografia computadorizada, da lesão alvo, classificando a doença em quatro categorias: remissão completa (RC), remissão parcial (RP), doença estável (DE) e doença progressiva (DP). A RC é caracterizada quando as lesões desapareceram completamente, a RP quando ocorre a diminuição de pelo menos 30% na medida da lesão, a DE quando os critérios não se enquadram nem em RP e nem em DP e DP quando há aumento de pelo menos 20% na mensuração tumoral e/ou aparecimento de novas lesões. Os resultados adquiridos com o uso desta ferramenta auxiliam o oncologista veterinário a decidir por um tratamento que traga melhores resultados para seu paciente ou ainda para avaliar a resposta ao tratamento instituído decidindo pela manutenção do mesmo ou

troca por uma protocolo mais efetivo em casos de doença progressiva (EISENHAUER et al., 2009; A et al., 2013).

MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

O presente projeto foi aprovada pela CEUA da FMVZ/USP em 16 de fevereiro de 2011, recebendo o número de protocolo 2092/2010 . A inclusão dos pacientes no presente trabalho foi autorizada pelos proprietários.

4.1 ANIMAIS

Constituiu o grupo de estudo 29 cães de ambos os sexos e idades variadas, com ou sem definição racial, com diagnóstico histopatológico de mastocitoma grau II e III, na classificação de Patnaik (PATNAIK et al, 1984), provenientes do Serviço de Cirurgia de Pequenos Animais, do Departamento de Cirurgia, junto ao HOVET da FMVZ/USP. Estes animais poderiam apresentar tumores recorrentes, ou não, com ou sem envolvimento de linfonodo regional, ao início do tratamento.

Os animais foram divididos em dois grupos de forma randomizada.

Grupo VP: constituído por 14 cães tratados com vimblastina¹ e prednisona², por 12 semanas (Quadro 2);

Grupo MI: constituído por 15 cães, tratados com mesilato de imatinibe³ por 8 semanas (Quadro 2).

Os critérios de exclusão dos pacientes utilizados foram:

- i. Cardiopatia sintomática, hepatopatia ou doença renal.
- ii. Neoplasias concomitantes.
- iii. Sangramento gastrointestinal secundário a doença mastocitária.
- iv. Qualquer condição mórbida pré-existente que impeça a terapia quimioterápica.
- v. Animais com peso inferior a 5 Kg.

¹ Faublastina 10 mg, Libbs

² Meticorten 5 ou 20 mg, Schering-Plough S.A

³ Glivec 100 ou 400 mg, Novartis Pharma AG, Suíça

- vi. Fêmeas ou machos utilizados para finalidade reprodutiva, incluindo fêmeas gestantes.
- vii. Animais já em tratamento quimioterápico.
- viii. Tumor mastocitário sistêmico ou envolvimento de mais de um linfonodo regional.

Não foi utilizado grupo controle, devido ao comportamento agressivo desta neoplasia, podendo os animais ir a óbito na ausência de tratamento.

Quadro 2- Caracterização dos cães diagnosticados com mastocitoma pertencentes ao Grupo VP e MI

Cão N°/Grupo (Prontuário N°)	Sexo	Idade (anos)	Peso (Kg)	Raça	Número de Formações
C3VP (193912)	F	12	13,4	SRD	1
C4VP (211015)	M	7	16,8	SRD	1
C7VP (213142)	F	10	10	SRD	1
C8VP (216715)	F	10	34	Rottweiler	2
C9VP (211333)	M	10	40,8	Golden Retriever	3
C10VP (214822)	M	4	34,5	Boxer	1
C13VP (219471)	F	5	6,9	Yorkshire Terrier	1
C16VP (220504)	F	9	30	Pit bull	3
C18VP (222195)	F	13	10,4	Basset	1
C19VP (223238)	F	5	37,6	Golden Retriever	1
C21VP (213219)	F	6	25	Boxer	1
C23VP (229803)	M	8	39,5	Labrador	1
C24VP (231115)	M	9	35	Labrador	1
C26VP (232197)	M	7	50	Dogo argentino	1
C1MI (206994)	F	9	35,6	Boxer	2
C5MI (163104)	M	7	30	Boxer	3
C6MI (212345)	M	8	23	SRD	1
C11MI (217341)	F	12	19	Husky Siberiano	1
C12MI (215065)	F	8	33,2	Labrador	1
C14MI (218863)	M	2	25	Bulldog	1
C15MI (220903)	F	10	29,5	Boxer	1
C17MI (222440)	F	5	43,5	Bernese	1
C20MI (225418)	F	7	35,1	Labrador	1
C22MI (228683)	M	9	5	Yorkshire Terrier	1
C25MI (231695)	F	6	7,5	SRD	2
C27MI (232528)	F	16	7,2	SDR	1
C28MI (227390)	F	13	11,2	SRD	2
C29MI (235172)	M	8	5,9	Yorkshire Terrier	1
C30MI (235599)	M	8	22,2	SRD	1

Fonte: . Serviço de Cirurgia de Pequenos Animais –VCI - HOVET – FMVZ/USP. São Paulo, 2014.

4.2 TRATAMENTO QUIMIOTERÁPICO

Os animais do grupo VP (vimblastina e prednisona) foram tratados com o protocolo quimioterápico por 12 semanas, sendo a vimblastina⁴ administrada na dose de 2 mg/m², uma vez por semana, por 4 semanas e após mais 4 aplicações a cada quinze dias, e a prednisona⁵ foi administrada na dose de 2 mg/kg/sid na primeira semana; na 2^a e 3^a semana 1 mg/kg/sid e a partir da 4^a à 12^a semana foi mantida a dose de 0,5 mg/kg/sid até o final do protocolo.

Os animais do grupo MI (mesilato de imatinibe) foram medicados com a dose de 10 mg/kg/sid de mesilato de imatinibe⁶ por 8 semanas.

4.3 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA AO TRATAMENTO

Foram selecionados três métodos de aferição das lesões para posterior avaliação da resposta aos dois protocolos de tratamento. Nos pacientes com múltiplas formações, foi escolhida uma lesão como alvo, sendo a resposta desta frente ao tratamento a considerada para a classificação da resposta. A taxa de resposta total foi dada pela soma dos pacientes com Resposta total e resposta parcial

4.3.1 Mensuração Clínica

O método de escolha para realizar a mensuração clínica das formações tumorais foi o paquímetro, seguindo as normas do RECIST 1.1. - Response Evaluation Criteria in Solid Tumors Guidelines - (EISENHAUER et al., 2009), onde o

⁴ Faublastina 10 mg, Libbs

⁵ Meticorten 5 ou 20 mg, Schering-Plough S.A

⁶ Glivec 100 ou 400 mg, Novartis Pharma AG, Suíça

tamanho tumoral é dado pela soma das medidas dos diâmetros da lesão. A mensuração dos tumores foi realizada no grupo VP a cada aplicação de quimioterapia e no grupo MI a cada 10 dias. A determinação da resposta frente ao tratamento foi classificada em:

- Resposta completa (RC), com desaparecimento completo das lesões;
- Resposta parcial (RP), com pelo menos 30% de redução das lesões, na soma dos diâmetros das formações;
- Doença estável (DE), redução de menos de 30% das lesões ou aumento menor de 20%;
- Doença progressiva (DP), com 20% de aumento na soma dos diâmetros comparado a menor soma em estudo e este aumento deve ser maior que 5mm ou aparecimento de uma ou mais lesões.

4.3.2 Mensuração do maior diâmetro e volume tumoral à tomografia computadorizada

Os animais foram submetidos à tomografia computadorizada no primeiro dia de tratamento e ao termino de cada protocolo, onde se determinou o maior diâmetro da lesão alvo e o seu volume. O exame tomográfico foi realizado em equipamento de tomografia computadorizada helicoidal, *single slice*⁷.

Os pacientes foram submetidos à anestesia geral com a finalidade de se obter a contenção e o posicionamento necessários para a realização dos cortes tomográficos. Foram obtidos cortes no plano transversal, sendo que a espessura e o incremento dos cortes variaram de acordo com as dimensões de cada formação. As imagens tomográficas foram obtidas antes e após a administração intravenosa em bolo de contraste iodado iônico hidrossolúvel⁸, na dose de 1,5ml/kg. A determinação objetiva da resposta tumoral frente ao tratamento foi caracterizada através das

⁷ Modelo XPRESS/G6, Toshiba

⁸ Schering - Urografina 292

normas o RECIST 1.1 (Quadro 3), onde a medida considerada foi o maior diâmetro tumoral e o seu volume.

Foi utilizada a avaliação estereológica, a partir das imagens tomográficas, das formações alvo para a determinação do volume dos mastocitomas, este foi estimado pelo princípio de Cavalieri. A partir das imagens tomográficas em cortes transversais pós-contraste, com espessura e incremento conhecidos, um programa de computador dedicado estimou a área de cada fatia do tumor. O volume foi então estimado de acordo com a seguinte fórmula:

$$V = \sum P \times (a/p) \times t \times k, \text{ sendo}$$

$\sum P$ = somatória dos pontos contidos na área da lesão.

(a/p) = área por ponto (calibrado pelo programa a partir da escala em cm da imagem).

t = espessura do corte.

k = inverso da fração do total de cortes selecionados

Quadro 3 - Normas RECIST 1.1

RESPOSTA	MAIOR DIÂMETRO	VOLUME
Remissão completa (RC)	Resolução de todas as lesões	Resolução de todas as lesões
Remissão parcial (RP)	Redução de pelo menos 30% do tamanho ^a	Redução de pelo menos 65% do volume
Doença estável (DE)	Não segue os critérios nem para RP, nem para DP	Não segue os critérios nem para RP, nem para DP
Doença progressiva (DP)	Aumento maior que 20% do tamanho ^a	Aumento maior que 40% do volume

a Mensurado em seu maior diâmetro. Fonte: SOHAIB et al.

4.4 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE QUIMIOTERÁPICA

Para avaliar a toxicidade quimioterápica, todos os cães foram avaliados de acordo com critérios de avaliação da toxicidade comum adaptada para cães - Common Terminology Criteria for Adverse Events (VCOG - Veterinary Cooperative

Oncology Group, 2011). Os pacientes do grupo VP foram avaliados nos dias da aplicação quimioterápica e do grupo MI a cada 10 dias, quando além da anamnese direcionada para detecção de efeitos adversos a aplicação da medicação, os animais eram submetidos a exame físico completo. A avaliação da toxicidade hematológica, nos pacientes tratados com vimblastina e prednisona, foi realizada através da contagem de leucócitos totais e neutrófilos segmentados antes de cada aplicação quimioterápica e hemograma a cada 30 dias. Nos pacientes pertencentes ao grupo do mesilato de imatinibe a avaliação foi realizada através de hemograma realizado a cada 10 dias. A avaliação da toxicidade renal e hepática, através da realização de dosagem de uréia e creatina, da Alanina-Aminotransferase (ALT) e Fosfatase alcalina (FA), respectivamente, foi realizada a cada 30 dias.

Assim, a gravidade dos eventos adversos foi classificada em: I leve; II moderada; III grave; IV com risco de vida; V morte. Nos casos de contagem de leucócitos $\leq 2500/\mu\text{l}$ e evento adverso de grau III ou IV o tratamento foi interrompido até que o evento adverso fosse resolvido.

4.5 EXAMES LABORATORIAIS

As amostras tumorais foram colhidas assepticamente através de biopsias com *punch* de 6 ou 8 mm de diâmetro (Punch Keys, 8 mm para biopsia de pele), foram colhidos 2 fragmentos, um para avaliação histológica e imunoistoquímica, que foram encaminhadas com pele, e o outro, sem a pele, que foi congelado imediatamente em nitrogênio líquido e mantido -80°C , para posterior extração do DNA e RNA tumoral. A colheita das amostras foi realizada juntamente com o exame tomográfico, quando os animais foram submetidos à anestesia geral, com cloridrato de tramadol na dose de 2 mg/kg via intra-muscular ou metadona na dose de 0,3 mg/kg como medicação pré-anestésica, propofol na dose de 5 mg/kg/endovenosa para indução e mantidos em isoflurano por via inalatória.

4.5.1 Processamento e graduação histológica

As amostras foram encaminhadas para o Laboratório de Histopatologia do Departamento de Patologia – FMVZ/USP para realização da graduação histológica. Foram confeccionadas lâminas com cortes de 5µm de espessura e posterior coloração por Hematoxilina - Eosina . Os tumores foram classificados segundo os critérios propostos por Patnaik et al. (1984), que gradua os tumores em 3 graus histológicos, onde o grau I é representado por tumores formados por células bem diferenciadas, o grau II por células com grau intermediário de diferenciação e o grau III correspondendo aos tumores que mostram células pouco diferenciadas, sendo difícil a visualização dos grânulos citoplasmáticos.

Os fragmentos tumorais também foram classificados segundo a metodologia de Kiupell et al. (2011), que gradua o mastocitoma em alto grau e baixo grau. Os tumores de alto grau são aqueles que apresentam pelo menos 7 figuras de mitose, pelo menos três células multinucleadas (3 ou mais núcleos) e pelo menos três núcleos bizarros em 10 campos de alta definição, além de cariomegalia, onde o diâmetro nuclear, em mais de 10% das células neoplásicas, encontra-se aumentado em, pelo menos, duas vezes. O índice mitótico foi determinado em 10 campos de 40X, conforme descrito por Romansik et al. (2007).

4.5.2 Avaliação imunoistoquímica

O processamento imunohistoquímico foi realizado no Laboratório de Patologia Morfológica e Molecular do Departamento de Patologia - FMVZ/USP.

Para confecção das lâminas para imunoistoquímica foram realizados cortes de 5 µm de espessura, aderidos em lâminas silanizadas, desparafinados e rehidratados. A recuperação dos antígenos para o VEGF-A e KIT foi realizada por aquecimento dos cortes histológicos em solução tampão de citrato a 1%, pH 6,0, por 3,5 minutos em panela de pressão e tampão EDTA, por 20 minutos em panela de pressão para o Ki-67. Após o resfriamento, as lâminas foram tratadas para bloqueio

de peroxidase endógena, por 30 minutos, em solução de peróxido de hidrogênio a 6%, seguindo-se lavagens das lâminas em água corrente por 10 minutos e água destilada por 5 minutos, foram realizados 5 banhos com PBS de 5 minutos cada. Os cortes histológicos foram submetidos a incubação com anticorpos primários anti-KIT¹ (Dako, 1:100), anti VEGF-A¹ (Santa Cruz® SC-152, 1:100) e anti Ki-67³ (Dako, 1:200) diluídos em tampão PBS contendo albumina bovina 1% (BSA; Sigma® A9647) e azida sódica 0,1% (NaN₃) por 30 minutos a 37°C em estufa, seguidos de 18 horas a 4°C em câmara úmida (over night), na sequência foram realizadas lavagens com PBS e incubação com polímero Super Picture SuperPicture Poly HRP conjugate⁴ durante 30 minutos em estufa à 37°C. A revelação foi realizada através solução contendo diaminobenzina (DAB+Chromogen, Dako Carpinteria, CA, USA). A contracoloração foi realizada por Hematoxilina. Em seguida foi realizada a desidratação em banhos de álcool graduado (70%, 95% e álcool absoluto duas vezes, com 5 minutos cada), seguida pela diafanização com solução de álcool misturado a xilol e dois banhos de xilol com 10 minutos e montagem em resina sintética e lamínula.

4.5.2.1 Avaliação da expressão do KIT

A avaliação da expressão de KIT foi realizada de acordo com a metodologia descrita por WEBSTER et al., 2004, classificando os mastocitomas de acordo com o padrão de marcação, sendo considerado KIT I as marcações predominantes em membrana celular, com mínima marcação em citoplasmática; KIT II as marcações pontilhadas ou em focos predominantes em citoplasma; e finalmente KIT III as marcações difusas em citoplasma, encobrindo, muitas vezes, as estruturas citoplasmáticas. Foram realizadas contagens manuais com auxílio do software Image Pro Plus 6.0, objetiva de 40x, as lâminas foram classificadas de acordo com o padrão predominante em pelo menos 10% da população de células neoplásicas (estimado com base em 100 de mastócitos neoplásicos em campo de alto aumento) ou presente em grandes aglomerados de células neoplásicas. As células de Cajal foram utilizadas como controle positivo internos para o KIT.

4.5.2.2 Avaliação da expressão do VEGF-A

Para avaliação da expressão do VEGF-A foram consideradas positivas as células que tiveram o seu citoplasma corado de marrom, estas foram classificadas de acordo com a intensidade de coloração imunohistoquímica em: fraca (+), moderada (++) , intensa (+++). As lâminas foram classificadas de acordo com a marcação predominante da lâmina.

4.5.2.3 Avaliação do índice de proliferação celular Ki-67

A avaliação do índice de proliferação celular Ki-67 foi realizada através da contagem manual, com auxílio do software Image Pro Plus 6.0, objetiva de 40x, onde se determinou a porcentagem de núcleos positivos em um mínimo de 1000 núcleos de mastócito ao acaso, em 10 ou mais campos randomizados. Mesmo os núcleos com marcações fracas foram considerados positivos (SIMOES et al., 1994; ABADIE et al., 1999; SAKAI et al., 2002; SCASE et al., 2006). Utilizou-se linfonodo canino hiperplásico como controle positivo.

4.5.3 Avaliação da Expressão do KIT e do Ligante por PCR em Tempo Real

4.5.3.1 Extração do RNA

A extração do RNA total das amostras foi realizada utilizando-se o Kit comercial Illustra RNAspin Mini Isolation GE®, seguindo o protocolo descrito pelo fabricante. As amostras de mastocitoma obtidas antes do início do tratamento foram mantidas em freezer -80°C até o momento da extração do RNA.

Para a extração foi utilizado uma amostra de 30mg de tecido tumoral, que foi macerada em nitrogênio, com o auxílio de um pistilo e cadinho de porcelana autoclavados e livres RNase, até que o tecido se tornar um pó, que foi transferido para o interior de eppendorfs RNase free com 350 µl de Lysis Buffer RA1 e 3,5 µl de β-Mercaptoetanol.

Após passar no vórtex, o conteúdo foi transferido para o interior da coluna RNase Mini Filter com um tubo coletor, e centrifugado por 2 minutos, 11.000G à 4°C. A coluna RNase Mini Filter foi descartada e o material filtrado transferido para um eppendorff RNase-free. Foram adicionados 350 µl de álcool 70° e passados no vórtex por 5 segundos. As amostras foram, então, transferidas para RNase Mini Columns e levadas à Centrífuga 5804 Eppendorf ® refrigerada por 1 minuto, 8.000G e a 4°C, até que todo o conteúdo fosse filtrado, permanecendo o RNA aderido à coluna. O líquido filtrado foi descartado e adicionado 350 µl de MDB sobre a coluna, seguido de centrifugação por 2 minutos, 11.000G a 4°C. Foi adicionado 95 µl de DNase previamente preparada (90 µl de DNase Reaction Buffer + 10 µl de DNase) sobre a coluna. Após 15 minutos em temperatura ambiente, foram adicionados 200 µl de Buffer RA2 sobre a coluna e as amostras foram levadas à Centrífuga 5804 Eppendorf ® refrigerada por 2 minutos, 11.000G e a 4°C. Em seguida, adicionou-se 600 µl de Buffer RA3 sobre a coluna e centrifugadas por 2 minutos, 11.000G e a 4°C. Foi adicionado mais 250 µl de Buffer RA3 sobre a coluna e centrifugados novamente por 2 minutos, 11.000G e a 4°C. A coluna foi transferida para um novo tubo eppendorff RNase-free (1,5 ml), onde foram adicionados apenas 40 µl de H₂O Miliq RNase-free. As amostras foram centrifugadas por 2 minutos, 11.000G e a 4°C, as colunas foram descartadas e o RNA presente no eppendorff armazenado no freezer -80°C até o momento da transcrição

A quantificação e análise da pureza do RNA foi realizada por espectrofotometria ultravioleta, nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm, utilizando-se o equipamento NanoDrop ND-2000⁹. As amostras com concentração de RNA inferior a 100 ng/µl foram concentradas a cerca de ¼ do volume inicial no aparelho SpeedyVac por cerca de 30 minutos. Em seguida, acrescentamos 5 µl de água DEPC e uma nova mensuração da concentração de RNA foi realizada. A análise da integridade foi feita por meio de eletroforese em gel de agarose a 1%.

⁹ Thermo Scientific NanoDrop (No.:ND-2000-US-CAN)

4.5.3.2 PCR em tempo real – RT-PCR

O RNA viável foi transcrito reversamente formando DNA complementar (cDNA) utilizando o *kit* de retrotranscrição do cDNA (Invitrogen). O preparo do cDNA inicia com o tratamento com DNase, em que é adicionado 1000 ng RNA, 1 µl de Buffer de DNase, 1 µl DNase e 7 µl de água MiliQ com DEPC, e incubado por 15 minutos em temperatura ambiente. Após adicionou-se 2 µl de EDTA (25 mM), sendo incubado 10 minutos a 65° C em termociclador. Após o resfriamento, foi adicionado 1 µl de Oligo DT (0,5 mg/ml), 1 µl de dNTP (10 mM), incubado a 65° C, deixando resfriar. Então iniciou-se o tratamento com RNase, sendo adicionado 4 µl First Strand Buffer (5x), 2 µl de DTT (0,1M), 1 µl de RNase OUT (5000 UI), incubado 2 minutos por 42° C no termociclador. Após adicionou-se 1 µl de Superscript II (10000 U), incubado 50 minutos a 42° C, seguindo-se por uma incubação de 15 minutos a 70° C sendo novamente resfriado.

O cDNA obtido de cada exemplar foi amplificado por reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCR em tempo real), utilizando o *kit* Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG¹⁰, adicionando 12,5 µl de Master Mix, 5 µl de cDNA diluído 1:20 em água MiliQ, 6,25 µl de água MiliQ, e 1,5 µl de Primer, totalizando 25 µl de solução final para cada amostra. A análise por PCR em tempo real foi realizada em sistema de detecção ABI Prism 7000¹¹ o qual contém uma câmera CCD acoplada que captura a fluorescência emitida e analisa os dados utilizando um programa de detecção. Para avaliação da expressão foram colocados em tubos apropriados¹², 25 µl de cada produto de PCR. Após a completa mistura dos reagentes cada tubo foi fechado com tampas MicroAmp Optical¹³. Todas as reações foram realizadas em duplicata. O PCR em tempo real foi executado por 40 ciclos, com as seguintes condições de amplificação: 2 minutos a 50°C, 10 minutos à 95°C; seguidos de 40 ciclos a 95°C por 15 segundos para desnaturação da fita de cDNA e a 60°C por 1 minuto para sua extensão. Os primers utilizados foram o *c-kit* ligante e o primer KIT receptor. Ao final, os dados foram analisados pelo método do 2DDCT, descrito por Livak e colaboradores (LIVAK et al., 2001). Para quantificar a eficiência

¹⁰ Invitrogen

¹¹ Applied Biosystems, Foster City, CA

¹² Optical Tubes Applied Biosystems

¹³ Applied Biosystems

da síntese de cDNA a partir do RNA extraído, o mesmo procedimento foi realizado para o gene GAPDH (Canis familiaris).

4.5.4 Extração e Sequenciamento de DNA

A extração de DNA foi realizada pelo kit de extração por coluna Illustra tissue & cell genomicPrep mini spin (GE Healthcare)¹⁴, conforme as orientações do fabricante, utilizou-se cerca de 5 - 50mg de tecido tumoral congelado à -80°C, que foi macerado com ajuda de martelo, o material foi transferido para tubos de microcentrifuga de 2 ml e acrescido de 100µl da solução de lise 1 e 20 µ de Proteinase K, o material foi incubado a 56°C por 1 hora e em seguida centrifugado rapidamente. Foi adicionado ao lisado 500µl da solução de lise 2 seguido de incubação em temperatura ambiente por 10 minutos, o material foi transferido para uma coluna e centrifugado a 11.000 g por 30 segundos, o material do tubo coletor é descartado, adicionou-se 500µl da solução de lise 2 na coluna e esta foi centrifugada a 11.000 g por 1 minuto. O material do tubo coletor foi descartado e em seguida aplicado à coluna 500 µl do tampão de lavagem, seguido de nova centrifugação a 11.000g por 3 minutos. A coluna foi transferida para um tubo de microcentrifuga de 1,5 ml, quando foi aplicado 200 µl do tampão de eluição pré-aquecido e incubada em temperatura ambiente por 1 minuto. O material foi centrifugado a 11.000 g por 1 minuto para a coleta do DNA genômico purificado.

Os amostras que mostraram o DNA degradado após extração pelo método acima tiveram o DNA extraído do material parafinado com o kit QIAamp® DNA FFPE Tissue (QIAGEN®) seguindo o protocolo descrito pelo fabricante. Foram utilizadas sessões teciduais de aproximadamente 10 mm, que foram colocadas em tubos de microcentrifuga de 2 ml acrescido de 1 ml de xileno, o material foi centrifugado por 2 minutos em temperatura ambiente o sobrenadante foi dispensado. Em seguida foi adicionado 1 ml de etanol e centrifugado por 2 minutos, o sobrenadante foi dispensado. O pellet foi novamente suspenso com 180 µl do Buffer ATL e 20 µl de proteinase K, o material foi incubado a 56°C até a lise completa da amostra, seguido

¹⁴ GE Healthcare – cod 28-9042-75/76

de incubação a 90°C por 1 hora. Posteriormente adicionou-se 200µl do Buffer AL e 200 µl de etanol absoluto, após passagem no vortex o material lisado foi rapidamente centrifugado e transferido para o interior da coluna QIAamp MinElute com um tubo coletor de 2 ml, que foi centrifugada a 8000 rpm por 1 minuto. A coluna foi transferida para um tubo coletor limpo e adicionado 500µl do Buffer AW1, que foi centrifugado a 8000 rpm por 1 minuto. A coluna foi novamente transferida para um tubo coletor limpo e centrifugada a 14.000 rpm por 3 minutos para completa secagem da membrana da coluna. Em seguida esta foi transferida para um tubo de microfúscula de 2 ml. Foi adicionado 20 µl do Buffer ATE no centro da membrana, o material foi incubado a temperatura ambiente por 5 minutos e centrifugado a 14.000 rpm por 1 minuto.

O DNA extraído teve sua qualidade e concentração avaliadas pela determinação da razão A260/280 em espectrofotômetro NanoDrop ND-2000¹⁵ e sua integridade avaliada em gel de agarose a 1%. As amostras que tiveram boa qualidade foram conservadas a – 20° C até o momento do seu uso.

4.5.4.1 Reação em cadeia da polimerase – PCR

Para a realização da PCR foi utilizado o *prime* 5'- ccaccctgctaatacggtg - 3' (forwardprimer) 5'- gaagctaattgggttcctaa - 3' (reverse primer) específico para amplificação do éxon 10/11 e intron 11 do gene c-Kit. A sequência amplificada do gene c-kit de 452 pb inclui a maior parte do domínio justamembrana do gene.

A PCR foi realizada seguindo as instruções do fabricante (Platinum® PCR SuperMix¹⁶) em termociclador com a seguinte proporção de reagentes [45 µL Mix; 100 ng DNA; 2,5 µL *primer* F a 10µM; 2,5 µL *primer* R a 10µM] e as seguintes condições de amplificação [desnaturação inicial por 3 minutos a 94°C; 40 ciclos de 1 minuto à 95°C, 1 minuto a 58°C, 1,3 minutos a 72°C; extensão final à 72°C por 5 minutos]

As reações foram feitas com 50 µL de volume final, as amostras com baixa concentração foram concentradas em concentrador a vácuo. Esses produtos foram

¹⁵ Thermo Scientific NanoDrop (No.:ND-2000-US-CAN)

¹⁶ Invitrogen (cod 11306-016)

então testados quanto a sua concentração por eletroforese em gel de agarose (2%) utilizando-se o marcador Blue Green Loading Dye¹⁷. Em seguida, os produtos de PCR foram purificados utilizando-se o Kit QIAquick PCR Purification¹⁸, seguindo a recomendação do fabricante, na qual para cada 1 µL de amostra foram acrescidos de 5 µL de Tampão PB. A amostra foi transferida para o uma coluna QIAquick spin (com um tubo coletor de 2 ml) e centrifugada a 13.000 rpm por 60 segundos para a aderência do DNA a membrana. O conteúdo do tubo coletor foi descartado e em seguida, para lavagem da membrana, foi adicionado 0.75 ml tampão PE à coluna e uma nova centrifugação a 13.000 rpm por 60 segundos foi realizada. Após descarte do conteúdo do tubo coletor a coluna QIAquick spin foi centrifugada por 1 minuto para remoção completa dos resíduos de etanol contido no tampão PE. A coluna foi transferida para um tubo de microcentrifuga de 2 ml. Para eluição do DNA, foi adicionado 30 µl do tampão EB (10 mM Tris-Cl, pH 8.5) no centro da membrana, deixado em temperatura ambiente por 1 minuto e centrifugado a 13.000rpm por 1 minuto, o produto de PCR purificado foi armazenado a 20°C até o momento do sequenciamento.

4.5.4.2 Sequenciamento de DNA

Para realização do sequenciamento das duas fitas complementares do DNA, os fragmentos correspondentes ao gene c-kit (377 pares de bases) obtidos por PCR e purificados foram quantificados visualmente com Blue Green Loading Dye¹⁹ de acordo com as instruções do fabricante e submetidos ao sequenciamento de DNA em sequenciador automático ABI 3730 DNA Analyser.²⁰

As reações de sequenciamento foram feitas utilizando o BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit²¹, conforme recomendações do fabricante. A reação de sequenciamento consistiu de 4 µL de BigDye, 4 µL de 5x Sequencing buffer, 4 pmol de cada primer senso e em reações separadas e 20 ng do DNA alvo para uma

¹⁷ LGC Biotecnologia (#13-15009-06)

¹⁸ Qiagen (cod 28104)

¹⁹ LGC Biotecnologia (#13-15009-06)

²⁰ Life Technologies – Applied Biosystems (# 3730S).

²¹ Applied Biosystems® (código 4337456)

reação final de 20µL, levando-se ao termociclador PTC-200²² para 35 ciclos de 96°C/30 segundos, 50°C/15 segundos e 60°C/4 minutos, com rampa de 0,7°C/segundo entre cada temperatura.

A seguir, o produto desta reação foi precipitado à temperatura ambiente com 80µL de isopropanol a 75%, incubando-se durante 20 min., centrifugando-se a 12.000 x g/ 25minutos, removendo-se o sobrenadante e adicionando-se 250µL de etanol a 70%, centrifugando-se a 12.000 x g/5minutos e secando-se o precipitado, levando-se as amostras ao sequenciador.

A verificação dos cromatogramas gerados para cada uma das sequências senso e antisenso de cada amostra e gene foi realizada com dois *softwares*: *Data Analysis in Molecular Biology and Evolution*® (XIA; XIE, 2001) e *BioEdit Sequence Alignment Editor*® (HALL, 1999). A sequência *reverse* foi invertida e teve seu eletroferograma comparado com o da sequência *forward* para que possíveis erros de sequenciamento fossem corrigidos. Finalmente, as sequências corrigidas de todos os animais foram alinhadas com o *software* ClustalX2 (LARKIN et al., 2007) para a identificação de sítios polimórficos candidatos a marcadores moleculares.

4.6 AVALIAÇÃO DOS RESULTADOS

As características qualitativas dos animais foram descritas segundo grupos com uso de frequências absolutas e relativas e verificada a existência de associação com os grupos com uso de testes exatos de Fisher ou testes da razão de verossimilhanças (Kirkwood e Sterne, 2006). As características quantitativas foram descritas segundo grupos com uso de medidas resumo (média, desvio padrão, mediana, mínimo e máximo) e comparadas entre os grupos com uso de testes Mann-Whitney (Kirkwood e Sterne, 2006).

Foram agrupados os animais com resposta parcial e remissão completa avaliada pela tomografia, sendo estes considerados como tendo resposta ao tratamento, e verificada se as características dos animais influenciaram na resposta com uso de testes exatos de Fisher ou testes da razão de verossimilhanças para as

²² MJ Research

medidas qualitativas e comparadas as medidas quantitativas entre as respostas com uso de testes Mann-Whitney. Foram estimadas as associações das características avaliadas com a resposta ao tratamento com uso de regressões logísticas bivariadas (Hosmer e Lemeshow, 2000) e estimados os valores de odds ratio (OR) com os respectivos intervalos com 95% de confiança.

Os testes foram realizados com nível de significância de 5%.

]

RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 GRUPOS DE ESTUDO

Durante o período entre agosto de 2010 a setembro de 2013 foram atendidos 245 animais com diagnóstico de mastocitoma, sendo selecionados 29 para inclusão neste estudo. Os animais foram atendidos no Serviço de Cirurgia de Pequenos Animais do Departamento de Cirurgia junto ao HOVET– FMVZ/USP

A média de idade dos cães com mastocitoma foi de 8 anos (mínimo de dois anos e máximo de 16 anos), sendo 17 fêmeas e 12 machos.

- Grupo VP: foi constituído por 14 cães, sendo oito fêmeas e seis machos, com média de idade de 8,2 anos (mínimo de quatro anos e máximo de 13 anos) com e sem definição racial.

- Grupo MI: foi constituído por 15 cães, sendo nove fêmeas e seis machos, com idade média de 8,5 anos (mínimo de dois anos e máximos de 16 anos) com e sem definição racial.

A raça mais prevalente foi a Boxer com 17,2% (5/29) do total de animais, seguida pelos Labrador Retriever com 13,8% (4/29); o Yorkshire com 10,3% (3/29) e Golden Retriever com 6,9% (2/29). As raças Rottweiler, Dogo Argentino, Pit bull, Basset, Husky Siberiano, Bernese e Bulldog foram observadas em igual proporção, cada uma com 3,4% (1/29) do total. Os cães sem raça definida representando 27,6% (8/29) dos animais.

A localização e tamanho das lesões alvo dos cães incluídos no estudo estão descritos no quadro 4. Dos 29 pacientes incluídos sete apresentaram lesões múltiplas (24,1%) e 22 cães formações únicas (75,9%). A distribuição anatômica das lesões nos dois grupos foi uniforme ($p=0,283$). Os locais mais comuns foram:

- i. Membros = 41%(16/39)
- ii. Tronco = 38,5% (15/39)
- iii. Cabeça e pescoço = 10,3% (4/39)
- iv. Gêrito-perineal = 10,3 % (4/39)

Os pacientes foram estadiados de acordo com o Estadiamento Clínico para os Mastocitomas Caninos proposto pela OMS. 34,5% (10/29) dos animais foram

classificados como estágio I no momento do diagnóstico, 6,9% (2/29) estavam no estágio II e 58,6% (17/29) no estágio III. Em relação ao subestágio 72,4% (21/29) dos animais não mostravam sintomas relacionados a presença do mastocitoma no momento do diagnóstico, sendo classificados como subestágio a e 27,6% (8/29) exibiam sintomas associados ao tumor e foram classificados como subestágio. b. Oito animais (27,6%) apresentaram metástase em linfonodo regional no momento do diagnóstico, nenhum animal apresentou metástase distante.

A localização das formações, o estágio clínico e presença de metástase regional não foram associados à resposta ao tratamento ($p=0,073$; 0,565; 0,136 respectivamente).

Quadro 4 – Caracterização das lesões nos cães diagnosticados com mastocitoma pertencentes aos Grupos VP e MI.

Cão Nº	Estadiamento (OMS)	Nº formações	Metástase	Localização da lesão alvo	Medida inicial em cm (CxL)
C3VP (193912)	Ia	1	Ausente	MTD †	5 x 4,9
C4VP (211015)	Ia	1	Ausente	Tronco	5,9 x 5,4
C7VP (213142)	IIIa	1	Ausente	MPD†	6,8 x 5
C8VP (216715)	IIIa	2	Ausente	MPD	5,5 x 5,6
C9VP (211333)	IIIa	3	Ausente	Genito-perineal	5,4 x 4
C10VP (214822)	Ia	1	Ausente	Tronco	5 x 4,3
C13VP (219471)	IIIb	1	Ausente	Tronco	6 x 6,4
C16VP (220504)	IIIa	3	Ausentes	Tronco	7 x 5
C18VP (222195)	IIIb	1	Ausente	Tronco	8 x 7,6
C19VP (223238)	Ia	1	Ausente	Cabeça e pescoço	0,8 x 0,8
C21VP (213219)	Ia	1	Ausente	MPE	6,6 x 3,3
C23VP (229803)	IIb	1	Linfonodo inguinal	Genito-perineal	5,8 x 5,3
C24VP (231115)	IIIa	1	Lesões satélites	Tronco	6,5 x 8,5
C26VP (232197)	IIIa	1	Linfonodo poplíteo	MPE†	7,1 x 6,7
C1MI (206994)	IIIb	2	Linfonodo poplíteo	MPD†	3,0 x 5,0
C5MI (163104)	IIIa	1	Ausente	Genito-perineal	5,4 x 3,0
C6MI (212345)	Ia	1	Ausente	MPE	6,8 x 6
C11MI (217341)	IIIb	1	Ausente	Cabeça e pescoço	7,9 x 5,5
C12MI (215065)	Ia	1	Ausente	MPD	5,5 x 1,8

Continua na próxima página

C14MI (218863)	Ia	1	Ausente	MPD	5,6 x 5,6
C15MI (220903)	IIIb	1	Linfonodos mandibulares	Cabeça e pescoço	3,9 x 4,9
C17MI (222440)	IIa	1	Linfonodo cervical superficial	MPD	1,7 x 1,7
C20MI (225418)	IIIa	1	Ausente	Cabeça e pescoço	4,5 x 2,5
C22MI (228683)	IIIa	2	Linfonodo inguinal	Genito-perineal	5,1 x 6,1
C25MI (231695)	IIIa	1	Ausente	Tronco	3,4 x 3,6
C27MI (232528)	IIIb	2	Linfonodo cervical superficial	MTE†	4,2 x 3,4
C28MI (227390)	IIIb	1	Ausente	Tronco	7 x 9,4
C29MI (235172)	Ia	1	Ausente	MPE	1,5 x 1
C30MI (235599)	Ia	1	Ausente	MPE	3,5 x 4,4

†MTD: Membro pélvico direito; ‡MPD: Membro pélvico direito; †MTE: Membro torácico esquerdo; ‡ MPE: membro pélvico esquerdo; a: assintomático; b: sintomático. Fonte: Serviço de Cirurgia de Pequenos Animais –VCI - HOVET – FMVZ/USP. São Paulo, 2014.

5.2 DETERMINAÇÕES OBJETIVA DA RESPOSTA TUMORAL FRENTE AO TRATAMENTO ATRAVÉS DAS NORMAS DO RECIST 1.1.

5.2.1 Mensuração clínica

A mensuração dos tumores, no grupo VP, foi realizada a cada aplicação de quimioterapia e no grupo MI a cada 10 dias.

No grupo tratado com vimblastina e prednisona (VP) 11 (78,6%) animais concluíram o tratamento e 3 (21,4%) animais vieram a óbito ao longo deste, o paciente C3 como consequência dos efeitos colaterais secundários a medicação e por isso este animal não teve a sua resposta frente ao tratamento caracterizada, e os outros dois, o paciente C13 e C18, como consequência da progressão da doença, estes animais tiveram a resposta caracterizada como doença progressiva (Quadro 5; Figura 1), sendo assim, somente 13 animais tiveram a sua resposta frente ao tratamento determinada:

- i. nenhum paciente apresentou remissão completa,
- ii. 1 (7,7%) cão apresentou remissão parcial,

- iii. 4 (30,8%) cães foram classificados como doença estável
- iv. 8 (61,5%) cães apresentaram doença progressiva

No grupo tratado com mesilato de imatinibe (MI) 13 cães (81,25%) completaram o tratamento, o paciente C1 teve o tratamento suspenso devido efeitos adversos a medicação, por este motivo não foi incluído na análise estatística e o paciente C20 teve a terapia suspensa devido a deterioração clínica e a resposta ao tratamento foi caracterizada como doença progressiva, (Quadro 6; Figura 2). 14 animais tiveram a sua resposta frente ao tratamento determinadas.

- i. 1 (7,1%) cão apresentou remissão completa,
- ii. 2 (14,3%) cães apresentaram remissão parcial,
- iii. 7 (50%) cães doença estável e
- iv. 4 (28,6%) cães exibiram doença progressiva

Ao se comparar as respostas dos dois grupos, levando-se em consideração a avaliação clínica, não foi observada diferença significativa nas respostas dos pacientes as diferentes terapias ($p=275$).

Dez animais (34,5%) tiveram complicações pós biopsia, que consistiram em hemorragia no ponto da biopsia, formação de hematomas, edema e eritema, além do aumento das formações, observado em 20,7% (6/29) dos pacientes.

A menor medida tumoral foi observado entre as 4^o e 5^o semanas de tratamento do protocolo quimioterápico com vimblastina e prednisona em 63,6% (7/11) dos animais que chegaram ao fim do protocolo, destes 6 animais mostraram aumento das medidas tumorais até o termino do tratamento. No Grupo MI as menores medidas foram alcançadas na fase final do tratamento em 57,1% (8/14) dos animais.

Figura 1: Paciente C23 com uma mastocitoma em região de prepúcio

Legenda: A) Mensuração da lesão antes do início do tratamento. B) Aumento acentuado da formação e piora da ulceração ao término do tratamento. Fonte: Serviço de Cirurgia de Pequenos Animais –VCI - HOVET – FMVZ/USP. São Paulo, 2014

Figura 2: Paciente C15 com tumor em região de focinho.

Legenda: A) Lesão antes do início do tratamento B) Redução acentuada da lesão ao término do tratamento. Fonte: Serviço de Cirurgia de Pequenos Animais –VCI - HOVET – FMVZ/USP. São Paulo, 2014.

5.2.2 Medida do maior diâmetro tumoral a tomografia computadorizada

A avaliação do maior diâmetro tumoral e caracterização da resposta ao tratamento foi realizada em 11 animais no grupo VP (Quadro 5; Figuras 3 e 4). Os pacientes C1, C13 e C18 não tiveram a avaliação final do maior diâmetro tumoral e por isso a resposta ao tratamento não foi caracterizada.

- i. Nenhum animal apresentou remissão completa,
- ii. 1 (9,1%) cão teve remissão parcial,
- iii. 6 (54,5%) cães apresentaram doença estável e
- iv. 4 (36,4%) cães apresentaram doença progressiva

No grupo M1 13 animais concluíram o tratamento e tiveram sua resposta a terapia caracterizada (Quadro 6; Figura 5). Os pacientes C3, C20 não tiveram a avaliação final do maior diâmetro tumoral e por isso a resposta ao tratamento não foi caracterizada.

- i. 1 (7,7%) cão teve remissão completa,
- ii. 3 (23,1%) cães apresentaram remissão parcial,
- iii. 5 (38,5%) cães apresentaram doença estável e
- iv. 4 (30,8%) cães apresentaram doença progressiva

Não foi observado diferença significativa entre os dois grupos de tratamento, quando a resposta avaliada à tomografia foi considerada ($p=0,502$)

Figura 3: Imagens de tomografia computadorizada, em corte transversal do cão C26.

Legenda: A) Imagem antes do início do tratamento. B) Imagem ao termino do tratamento, mostrando redução do maior diâmetro tumoral, classificando a resposta ao tratamento como Remissão Parcial. Fonte: Arquivo do Serviço de Diagnóstico por Imagem do Departamento de Cirurgia - FMVZ-USP, 2014.

Figura 4 - Imagens de tomografia computadorizada, em corte transversal do cão C23

Legenda: A) maior diâmetro da lesão antes do início do tratamento. B) maior diâmetro ao término do tratamento, mostrando aumento acentuado do maior diâmetro tumoral, classificando a resposta ao tratamento como Doença Progressiva. Fonte: Arquivo do Serviço de Diagnóstico por Imagem do Departamento de Cirurgia - FMVZ-USP, 2014.

Figura 5: Imagens de tomografia computadorizada, em corte transversal do cão C15

Legenda A) Maior diâmetro tumoral antes (A) e ao término do tratamento (B), mostrando redução acentuada da formação e classificação da resposta como Remissão completa. Fonte: Arquivo do Serviço de Diagnóstico por Imagem do Departamento de Cirurgia - FMVZ-USP, 2014.

5.2.3 Avaliação do volume tumoral a tomografia computadorizada

A avaliação do volume tumoral foi realizada em 11 (78,6%) animais do grupo VP sendo que (Tabela 5; Figura 6):

- i. nenhum cão apresentou remissão completa,
- ii. 1 (9,1%) cão mostrou remissão parcial,
- iii. 5 (45,5%) cães apresentaram doença estável e
- iv. 5 (45,5%) cães apresentaram doença progressiva

No grupo MI 13 (86,7%) animais tiveram a resposta ao tratamento caracterizada com base no volume tumoral (Tabela 6).

- i. 1 (7,7%) cão mostrou remissão completa,
- ii. 4 (30,6%) cães apresentaram remissão parcial,
- iii. 3 (23,1%) cães apresentaram doença estável e
- iv. 5 (38,5%) cães apresentaram doença progressiva

Os dois grupos de tratamento comportaram-se de maneira semelhante quanto a resposta a quimioterapia, quando o volume tumoral foi considerado ($p=302$)

Figura 6: Mensuração do volume tumoral, pelo princípio de Cavalieri do cão C28

Legenda: A) Imagem de tomografia computadorizada, em corte transversal, do cão C28 apresentando mastocitoma em região dorso – lateral do flanco direito, a formação segue um padrão curvilíneo B) Imagem aplicada ao programa que estima o volume pelo princípio de Cavalieri. O número de cruzes contidas na área da lesão é contado em cada corte. Fonte: Arquivo do Serviço de Diagnóstico por Imagem do Departamento de Cirurgia - FMVZ-USP, 2014.

Quadro 5 – Medidas comparativas da mensuração clínica, maior diâmetro e volume tumoral a tomografia computadorizada no grupo tratado com vimblastina e prednisona (VP) e caracterização da resposta ao tratamento segundo as normas do RECIST 1.1.

Cão	Soma dos diâmetros - Inicial	Menor Soma (semana)	Soma dos diâmetros -Final	% Variação	RECIST- Clínico	Maior diâmetro Pré-QT(cm)	Maior diâmetro Pós-QT (cm)	% Variação	RECIST- TC	Volume Pré - QT	Volume Pós - QT	% Variação	RECIST- Volume
C3	óbito	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C4	11,3	9,7(4ª)	12	23,7	DP	6,54	6,55	0,2	DE	64,73	67,9	4,9	DE
C7	11,8	8,8(4ª)	13,7	55,7	DP	6,11	8	30,9	DP	140,87	299,25	112,4	DP
C8	11,1	10,(5ª)	12,2	17,3	DE	4,6	5,55	20,7	DP	124,87	182,66	46,3	DP
C9	13,5	9,5(4ª)	10,4	9,5	DE	6	4,64	-22,7	DE	53,63	37,9	-28	DE
C10	9,3	4,3(6ª)	4,3	-53,8	RP	3,28	2,79	-14,9	DE	9,52	5,04	-47,1	DE
C13	óbito	-	-	-	DP	-	-	-	-	-	-	-	-
C16	13	6,3(4ª)	12,8	103,1	DP	7,77	6,6	-15,1	DE	118,9	42,76	-64	DE
C18	óbito	-	-	-	DP	-	-	-	-	-	-	-	-
C19	1,6	0(5ª)	2,2	220	DP	0,75	0,86	14,7	DE	0,76	1,4	84,2	DP
C21	10,2	6,5(5ª)	7,4	13,9	DE	3,24	2,9	-13,8	DE	29,17	14,35	-50,8	DE
C23	11,11	11,1(1ª)	19,2	72,8	DP	5,78	10,27	43,9	DP	104,4	339,57	69,3	DP
C24	14,4	9,9(2ª)	18,9	90,9	DP	4,89	6,22	27,2	DP	45,5	101,52	123,2	DP
C26	13,8	8(7ª)	8,6	7	DE	6,43	3,72	-42,1	RP	237,79	58,69	-75,3	RP

RC: Remissão completa, RP: Remissão parcial; DE: Doença estável; DP: Doença progressiva. Fonte: Serviço de Cirurgia de Pequenos Animais – VCI –HOVET – FMVZ/USP. São Paulo 2014.

Quadro 6 – Medidas comparativas da mensuração clínica, maior diâmetro e volume tumoral a tomografia computadorizada no grupo tratado com mesilato de imatinibe (MI) e caracterização da resposta ao tratamento segundo as normas do RECIST 1.1.

Cão	Soma dos diâmetros - Inicial	Menor Soma (dias)	Soma dos diâmetros -Final	% Variação	RECIST- Clínico	Maior diâmetro Pré-QT(cm)	Maior diâmetro Pós-QT (cm)	% Variação	RECIST- TC	Volume Pré - QT	Volume Pós - QT	% Variação	RECIST- Volume
C1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C5	11,3	8,8(40°)	9,7	10,22	DE	2	2,26	13	DE	2,79	6,5	133	DP
C6	13	11,1(60°)	11,7	5,4	DE	4,13	5	21,1	DP	58,14	85,04	46,3	DP
C11	13,4	9,8(20°)	22,5	129,6	DP	7,3	9	23,3	DP	47,4	124,2	162	DP
C12	7,3	0(10°)	0	-100	RC	5,28	3	-43,2	RP	22,23	3,76	-83,1	RP
C14	11,2	9,9(50°)	10,1	2	DE	5,35	5,75	7,5	DE	40,95	55,4	35,3	DE
C15	8,8	4,3(60°)	4,3	-51,13	RP	6	0	-100	RC	50,4	0*	-100	RC
C17	3,4	1,7(60°)	1,7	-50	RP	1,69	1	-40,8	RP	4,38	0,6	-86,3	RP
C20	7	Deterioração sintomática			DP	-	-	-	-	-	-	-	-
C22	11,2	10,7(10°)	19,2	71,43	DP	5,78	10,27	77,7	DP	104,4	339,57	225,26	DP
C25	7	5,9(60°)	5,9	-15,7	DE	3,92	3,31	-15,3	DE	180,48	45,36	-74,87	RP
C27	7,6	7,6(1°)	12,1	59,21	DP	3,84	5,11	33,07	DP	374,22	761,46	103,2	DP
C28	16,4	15,9(50°)	15,9	-3	DE	9,03	7,51	-16,8	DE	181,2	174,3	-3,8	DE
C29	2,1	1,9(60°)	1,9	-24	DE	0,93	0,41	-55,9	RP	2,4	0,21	-91,25	RP
C30	7,9	7,9(60°)	7,9	0	DE	3,19	3,05	-4,39	DE	11,08	7,65	-30,96	DE

*Lesões não passíveis de mensuração ao exame tomográfico foram considera com valor zero (0). RC: Remissão completa, RP: Remissão parcial; DE: Doença estável; DP: Doença progressiva. Fonte: Serviço de Cirurgia de Pequenos Animais – VCI –HOVET – FMVZ/USP. São Paulo 2014.

5.2 Comparativo da resposta ao tratamento do grupo VP e MI

As medidas de maior diâmetro tumoral foram consideradas para a determinação da resposta total de cada paciente a cada protocolo de quimioterapia. Os pacientes C13, C18 e C20, embora não tenham realizado a 2ª tomografia, uma vez que vieram a óbito devido a evolução da doença, sendo classificados como doença progressiva.

No grupo VP a resposta global ao tratamento foi de 7,7 %, apenas 1 animal apresentou remissão parcial da doença. No grupo MI a taxa de resposta foi de 28,6%, embora o mesilato de imatinibe tenha se mostrado mais eficaz no controle do mastocitoma, quando comparado com o grupo tratado com a vimblastina e prednisona o tipo de tratamento não influenciou de maneira significativa na resposta dos pacientes ($p=0,326$; Tabela 1).

Foi observada associação significativa entre os métodos de aferição das formações tumorais, quando levado em consideração a resposta clínica e maior diâmetro tumoral ($p=0,013$) e o volume tumoral e a medida do maior diâmetro ($p < 0,001$; Tabela 2).

Tabela 1 – Resultados das comparações entre os grupos VP e MI, quanto a resposta ao tratamento e metodologia de aferição das formações cutâneas.

Variável	Resposta (tomo)				OR	IC (95%)		Total	p
	Estável/Progressiva (N = 22)		Parcial/Completa (N = 5)			Inferior	Superior		
	n	%	n	%					
Grupo									0,326
VP	12	92,3	1	7,7	1,00			13	
MI	10	71.4	4	28.6	4.80	0.47	50.16	14	

Fonte: Serviço de Cirurgia de Pequenos Animais –VCI - HOVET – FMVZ/USP. São Paulo, 2014.

Tabela 2 – Resultados quanto a resposta ao tratamento e metodologia de aferição das formações cutâneas nos grupos VP e MI.

Variável	Resposta (tomo)				OR	IC (95%)		Total	p
	Estável/Progressiva		Parcial/Completa			Inferior	Superior		
	n	%	n	%					
Resposta (clínica)									0,013
Estável/Progressiva	21	91,3	2	8,7	1,00			20	
Parcial/Completa	2	25,0	3	75,0	31,50	2,14	463,45	4	
Resposta (volume)									<0,001
Estável/Progressiva	18	100,0	0	0,0	1,00			18	
Parcial/Completa	1	16,7	5	83,3	&			6	

Fonte: Serviço de Cirurgia de Pequenos Animais –VCI - HOVET – FMVZ/USP. São Paulo, 2014.

5.3 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE QUIMIOTERÁPICA

Dos pacientes pertencentes ao grupo VP, 50% (7/14) dos animais apresentaram algum tipo de efeito colateral, em 84,2% dos animais estes foram de grau leve a moderado, somente 1 animal veio a óbito como consequência dos efeitos colaterais ao tratamento. No grupo MI, 40% (6/15) dos animais tiveram efeitos adversos à medicação, sendo que somente um (1/15) animal apresentou alterações de grau III (12,5%). Os efeitos colaterais mais frequentes foram vômito (8/29); Disorexia/Anorexia (7/29) e leucopenia (4/29). O quadro 7 resume a incidência dos graus dos efeitos colaterais observados nos grupos VP e MI.

QUADRO 7 - Incidência dos efeitos colaterais a aplicação de quimioterápicos nos grupos VP e MI de acordo com critérios de avaliação da toxicidade comum adaptada para cães (Veterinary Cooperative Oncology Group (VCOG), 2011).

	Grau I		Grau II		Grau III		Grau IV		Grau V	
Efeito Colateral [*]	VP	MI	VP	MI	VP	MI	VP	MI	VP	MI
Leucopenia ^{a,b}	3/14	1/15								
Diarreia ^b		1/15	1/14	1/15					1/15	
Vômito ^b	2/14		1/14		2/14	1/15			1/15	
Perda de peso ^c	1/14									
Disorexia/Anorexia ^b	4/14			1/15	2/14					
Toxicidade renal					1/14					
Letargia ^e			2/14							
Dermatológicos ^f	1/14	1/15								

^a VCOG - Veterinary Cooperative Oncology Group, 2011

^a Critérios de toxicidade hematológica: grau I (1.500 - 2.999 neutrófilos / μ L); grau II (1.000-1.499 neutrófilos / μ L); grau III (500-999 neutrófilos / μ L); grau IV (< 500 neutrófilos / μ L).

^b Critérios de toxicidade gastrointestinal: grau I (necessidade de dieta palatável para manter o apetite; episódios <3 vômitos em 24 horas; duas defecações a mais que o normal/dia); grau II (disorexia > 3 dias; 3-5 episódios de vômitos em 24 horas ou >3 episódios / d por >2 mas < 5 dias; 2-6 defecações a mais / d); grau III (anorexia 3-5 dias com perda de peso, >5 episódios vômitos em 24 horas ou vômito >4 dias; mais de 6 defecações a mais que o normal / d); grau IV (anorexia > 5 dias; vômito ou diarreia profusos); grau V (óbito).

^c Perda de peso: grau I (perda de 5-10% do peso); grau II (perda > 10-20% do peso); grau IV (perda >20% do peso); grau V (óbito)

^d Critérios de toxicidade renal: creatinina - grau I (aumento de 1,5 x o limite normal); grau II (aumento de 1,5 – 2 x o limite normal); grau III (aumento de 2 – 3 x o limite normal); grau IV (aumento > 3 x o limite normal); grau V (óbito)

^e Letargia: grau I (letargia leve); grau II (algum grau de letargia com redução na escala de performance) grau III (redução significativa na escala de performance); grau IV (paciente não consegue realizar suas atividades diárias sem ajuda); grau V (óbito).

^f Critérios de toxicidade dermatológica: Alopecia – grau I (aumento do eflúvio, hipotricose alopecia focais) grau II (hipotricose/ alopecia generalizada)

Fonte: Serviço de Cirurgia de Pequenos Animais –VCI - HOVET – FMVZ/USP. São Paulo, 2014.

5.4 AVALIAÇÕES LABORATORIAIS

5.4.1 Classificação histopatológica e índice mitótico (IM)

A graduação histopatológica e a avaliação dos marcadores imunohistoquímicos foram realizadas nas mesmas amostras, para melhor comparação entre os resultados.

Na avaliação histopatológica, segundo a classificação de PATNAIK et al (1984), 89,3% dos animais tiveram os tumores classificados como grau II (25/29) e 10,7% como grau III (3/29). A classificação de Kiupel et al (2011) foi realizada em 22 amostras, sendo classificados como mastocitoma de baixo grau 95,5% dos animais (21/22) e 4,5% como alto grau (1/22) (Quadros 8 e 9). Os dois grupos se mostraram homogêneos quanto à classificação do grau histológico tanto no sistema de Patnaik quanto no de Kiupel ($p > 0,999$ e $p = 0,409$, respectivamente) (Tabela 3).

O paciente do grupo VP que apresentou resposta parcial foi classificado como Grau II baixo grau. No grupo MI o paciente com resposta completa teve o mastocitoma classificado como grau III baixo grau e os 3 pacientes com resposta parcial como grau II baixo grau. Os graus histológicos segundo Patnaik e segundo Kiupel não foram relacionados a resposta ao tratamento ($p = 0,474$ e $p > 0,999$ respectivamente), embora os pacientes Grau III tenham uma chance maior de responder ao tratamento que os pacientes grau II (OR 2,5 IC 95% 0,18-34,7). (Tabela 3)

Vinte e dois (75,9%) animais tiveram o índice mitótico (IM) determinado, estes foram divididos em 2 grupos com base no escore de $IM \leq 5$. A média do índice mitótico foi de $0,73(\pm 1,8)$, somente um animal (1/22) apresentou $IM > 5$. Não foi observada diferença significativa no IM nos dois grupos ($p = 0,948$). O índice mitótico também não foi relacionado à resposta ao tratamento (OR 1,2; $p > 0,999$). (Quadros 8 e 9)

Tabela 3 - Distribuição e comparativo dos pacientes pertencentes aos dois grupos de estudo, quanto aos achados de histopatológico e índice mitótico.

Variável	Grupo				Total (N = 29)		p
	VP (N = 14)		MI (N = 15)				
	n	%	n	%	n	%	
Hitopatológico PATINAIK							>0,999
Grau II	12	92,3	13	86,7	25	89,3	
Grau III	1	7,7	2	13,3	3	10,7	
Histopatológico KIUPEL							0,409
Baixo grau	8	88,9	13	100,0	21	95,5	
Alto grau	1	11,1	0	0,0	1	4,5	
Índice mitótico > 5							0,409
Não	8	88,9	13	100,0	21	95,5	
Sim	1	11,1	0	0,0	1	4,5	
Índice mitótico							0,948
Média (DP)	1,11 (2,67)		0,46(0,88)		0,73 (1,8)		
Mediana (mín.;máx)	0 (0;8)		0(0;2)		0 (0;8)		

Fonte: Serviço de Cirurgia de Pequenos Animais –VCI - HOVET – FMVZ/USP. São Paulo, 2014.

Tabela 4 – Associação dos resultados do exame histopatológico e valores de índice mitótico à resposta ao tratamento. Serviço de Cirurgia de Pequenos Animais –VCI - HOVET – FMVZ/USP. São Paulo, 2014.

Variável	Resposta (tomo)				OR	IC (95%)		Total	p
	Estável/Progressiva (N = 22)		Parcial/Completa (N = 5)			Inferior	Superior		
	n	%	n	%					
Hitopatológico PATINAIK									
Grau II	20	83,3	4	16,7	1,00			24	0,474
Grau III	2	66,7	1	33,3	2,50	0,18	34,70	3	
Histopatológico KIUPEL									
Baixo grau	16	80,0	4	20,0	1,00			20	>0,999
Alto grau	1	100,0	0	0,0	&			1	
Índice mitótico (> 5)									
Não	16	80,0	4	20,0	1,00			20	>0,999
Sim	1	100,0	0	0,0	1,20			1	

& Não foi possível estimar. Fonte: Serviço de Cirurgia de Pequenos Animais –VCI - HOVET – FMVZ/USP. São Paulo, 2014.

5.5.2. Avaliação da expressão do KIT por imunohistoquímica

A classificação imunohistoquímica para quantificação do KIT foi realizada nas amostras tumorais de 29 animais, destes 6,9% foram classificados como KIT I (2/29), 62,1% como KIT II (18/29) e 31% tumores como KIT III (9/29) (Figura 7; Quadros 8 e 9). Não foi observado diferença na quantificação do KIT nos dois grupos de estudo e entre os animais que responderam e não responderam ao tratamento ($p=0,962$; $p=0,226$). Não foi possível estimar a associação entre o grau de quantificação do KIT e a resposta ao tratamento.

Figura 7: Padrões de coloração por imunohistoquímica do KIT

Legenda: Fotomicrografias da marcação imunoistoquímica do receptor KIT com contracoloração por hematoxilina, no mastocitoma caninos. A) Padrão KIT I: marcações predominantes em membrana celular. B) Padrão KIT II: marcação pontilhada ou em focos no citoplasma. C) Padrão KIT III: marcação citoplasmática . difusa (Kiupel et al., 2004). Objetiva de 40x. Fonte: MACEDO, T. M. Departamento de Cirurgia – VCI, 2014.

5.4.3 Avaliação da expressão do VEGF-A

A avaliação imunohistoquímica do VEGF foi realizada em 27 animais (93,1%), em todas as laminas foi possível observar marcação em aproximadamente 100% das células. 25,9% (7/27) das amostras apresentaram padrão de marcação classificado como intensidade leve (+), 37% (10/27) como intensidade moderada (++) e em 37% (7/27) dos tumores a intensidade da marcação foi forte (+++) (Quadros 8 e 9). Não foi observado diferença significativa na quantificação do VEGFA nos dois grupos de tratamento ($p=0,775$). A diferença de quantificação do grupo que respondeu ao tratamento e o que não respondeu é pouco significativa, com uma tendência de quantificação mais intensa nos pacientes que responderam ao tratamento ($p=0,057$). Não foi possível estimar a associação entre o grau de expressão do VEGF e a resposta ao tratamento.

Figura 8: Padrões de marcação imunohistoquímica do VEGF

Legenda: Fotomicrografias da marcação imunoistoquímica do receptor VEGF-A no mastocitoma caninos com contracoloração por hematoxilina. **A)** Padrão de marcação de intensidade fraca (+). **B)** Padrão de marcação de intensidade moderada (++) **C)** Padrão de marcação de intensidade forte (+++). Objetiva de 40x. Fonte: MACEDO, T. M. Departamento de Cirurgia – VCI, 2014.

5.4.4 Avaliação do índice de proliferação celular Ki-67

O índice de proliferação celular Ki-67 foi realizado em 24 animais, a média de núcleos positivos foi de 3,46 ($\pm 5,6$). Os animais foram divididos em dois grupos com base no escore de ki-67 $\leq 1,8\%$. 58,3% (14/24) dos animais apresentaram ki-67 $\leq 1,8\%$ e em 41,7% (10/24) dos animais o número de núcleos positivos foi maior que 1,8%. (Figura 9; Quadros 8 e 9). Não foi observado diferença significativa na avaliação do ki-67 entre os dois grupos de tratamento ($p > 0,999$) e este índice não foi associado a resposta ao tratamento ($p = 609$), embora os pacientes com ki-67 $> 1,8\%$ tenham apresentado chance maior de resposta ao tratamento (OR 2,75; IC 95% 0,49 - 34,50).

Figura 9: Fotomicrografias da marcação imunoistoquímica com Ki-67, com contracoloração por hematoxilina

Legenda: (A) com núcleos marcados em menos de 1,8% das células e (B) com mais de 1,8% de núcleos marcados. As flechas indicam os núcleos positivos para Ki-67. Objetiva de 40x. Fonte: MACEDO, T. M. Departamento de Cirurgia – VCI. 2014

5.4.5 Avaliação da Expressão do gene c-kit e do Ligante do KIT por PCR em Tempo Real

A expressão do gene c-kit e do seu ligante foi expressa em função da expressão dos animais que responderam a terapia quimioterápica. Essa avaliação não foi realizada em função das expressões em pele normal.

Foram analisadas as amostras tumorais de 30 animais, deste, 21 amostras apresentaram RNA viável possibilitando a realização do RT-PCR para avaliação da expressão do gene c-Kit, 10 (71,4%) amostras pertencentes ao grupo VP e 11 (73,4%) do grupo MI. Na avaliação da expressão do ligante do KIT 15 amostras (51,7%) foram amplificadas, nove do grupo VP e seis do grupo MI (Quadros 8 e 9). Foi observado diferença pouco significativa nas expressões do c-kit entre os dois grupos de tratamento ($p=0,05$), com o grupo MI apresentando média de expressão maior que o grupo VP (Tabelas 5). Não foi observado diferença significativa na expressão do ligante do KIT entre os dois grupos ($p=0,313$). Os pacientes que responderam ao tratamento apresentaram média de expressão do c-kit maior que o grupo que não respondeu ($p=0,049$). A expressão do KIT ligante não apresentou diferença significativa em relação as respostas ao tratamento ($p=0,909$).

Não foi observada diferença significativa na expressão do gene c-kit e do seu ligante entre os pacientes classificados como KIT II e KIT III ($p=0,537$; $p=0,594$ respectivamente; Tabela 6).

Tabela 5 - Distribuição dos animais de acordo com a resposta ao tratamento e valores individuais da expressão gênica do c-Kit e do Ligante do KIT..

Doença estável/progressiva (N=14)			Resposta Parcial/completa (N=4)		
	Expressão c-kit	Expressão ligante do KIT		Expressão c-kit	Expressão ligante do KIT
C7-VP	6,497862346	0,375844786	C 26-VP	3,71913001	0,421384424
C8-VP	0,56056951	0,169365143	C15-MI	1,09856702	
C9-VP	0,154959723	0,754299248	C17-MI	7,865960199	0,254962942
C10-VP	0,012473111	0,188574812	C29-MI	1,797040454	
C13-VP	0,238153752	0,104981636			
C16-VP	0,063151691	1,225362744			
C18-VP	0,085375456	0,848630769			
C23-VP	0,488004102				

C24-VP	0,050239474	0,179022012		
C5-MI	0,084238461	0,043385582		
C6-MI	25,82368331	0,900226212		
C11-MI	0,740013188	1,956614418		
C20-MI	0,110768754	4,282221668		
C27-MI	2,166885446			
C28-MI	1,659355367			
Média (DP)	2,58(6,64)	0,91(0,35)	3,62(3,04)	0,34
Mediana (mín; máx)	0,24 (0,01;25,84)	0,57 (0,04; 4,28)	2,76 (1,1;7,87)	0,34 (0,25; 0,42)

Fonte: Serviço de Cirurgia de Pequenos Animais – VCI - HOVET – FMVZ/USP. São Paulo, 2014

Tabela 6 - Expressão gênica média do c-kit e do seu ligante de acordo com a classificação por padrão de marcação do KIT em imunoistoquímica..

	c-kit	Desvio Padrão		Ligante de c-kit	Desvio Padrão
KIT II (N=12)	3,053	7,396	KIT II (N=10)	0,9615	0,8448
KIT III (N=7)	2,369	2,741	KIT III (N=5)	1,301	0,8313

Fonte: Serviço de Cirurgia de Pequenos Animais – VCI - HOVET – FMVZ/USP. São Paulo, 2014

5.4.6 Sequenciamento do DNA e pesquisa de mutações no exon 11 do gene c-Kit.

A extração e sequenciamento do DNA para a pesquisa da presença de mutações no éxon 11 do gene *c-kit* foi realizado em 25 amostras tumorais (86,2%), quatro amostras (13,8%) apresentaram DNA degradado impossibilitando o sequenciamento. Foram amplificadas as porções correspondentes ao exon e intron 10, exon e intron 11, correspondentes a região justamembrana do KIT. A separação dos produtos de PCR em gel de agarose mostrou que 2 (2/25) tumores continham uma banda extra e um paciente 1 banda acima da esperada, o que sugere uma possível duplicação, que não foi confirmada pelo sequenciamento. Essas bandas foram individualizadas e o DNA extraído do gel de agarose foi purificado e sequenciado, juntamente com as outras amostras (Figura7).

Figura 10 : Eletroforese em gel de agarose 2% dos produtos de PCR do exon 11.

Legenda: Os Animais C17 e C19 apresentam uma banda extra, acima da esperada e o animal C29 apresenta uma única banda acima da esperada, sugerindo uma possível duplicação, os demais animais apresentam o padrão selvagem. Fonte: MACEDO, T.M. (2014)

Quatro animais (16%) apresentaram alterações genéticas, que se caracterizaram por 4 trocas de base, todas localizadas próxima a região 3' do exon 11. Esta mutação pontual aconteceu na posição 1759, códon 576. Nos pacientes C4 e C10 esta foi em heterozigose (C>Y)(Figuras 11e 12) e nos pacientes C18 e C27 em homozigose, constituindo uma troca de bases C>T (Figuras 13 e 14), esta troca não alterou o aminoácido formado e consequentemente a proteína codificada (Figura 13). Esta mutação já foi descrita na literatura como um SNP silencioso, por não trazer alteração à proteína Os animais C4/C7/C8/C10/C18/C19/C20/C24/C27 apresentaram mutações pontuais nos intron 10 e 11, regiões estas que não interferem na codificação a proteína (Figura 8).

Figura 11: Sequência de nucleotídeos do DNA genômico do domínio justamembrana de c-kit

Legendas: As letras maiúsculas representam os exons e as minúsculas os introns. As setas indicam os primers. As mutações pontuais estão representas pelas letras nas caixas, onde R = G ou A (G→A), W = C ou T (C→T), Y = T ou C (T→C) E M = T ou C (T→C). MACEDO, R.M.

Figura 12: Eletroferograma do sequenciamento do exon 11 do gene c-kit

Legenda: As setas demonstram uma alteração em heterozigose na posição 1759 do códon 586. A) Sequencia *forward* B) Sequencia *Reversa* Fonte: MACEDO, T. M. (2014).

Figura 13: Pareamento das bases do RNAm e do produto do exon 11 do gene c-kit pelo programa BLAST, mostrando o não pareamento na posição 1759

Query	1673	AAACCCATGTATGAAGTACAGTGAAGGTTGTTGAGGAGATCAATGGAAACAATTATGTT	1732
Sbjct	1	AAACCCATGTATGAAGTACAGTGAAGGTTGTTGAGGAGATCAATGGAAACAATTATGTT	60
Query	1733	TACATAGACCCAACACAGCTTCCTTA	1792
Sbjct	61	TACATAGACCCAACACAGCTTCCTTA	120
Query	1793	AGCTTTG	1799
Sbjct	121	AGCTTTG	127

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

Fonte: MACEDO, T. M. (2014)

Figura 14: Eletroferograma do sequenciamento do exon 11 do gene c-kit demonstrando a troca de uma Citosina por uma Timina na posição 1759 do códon 586.

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

Fonte: MACEDO, T. M. (2014)

Figura 15: Pareamento das bases do RNAm e do produto do exon 11 do gene c-kit pelo programa BLAST, mostrando o não pareamento na posição 1759, devido a troca C→T.

```

Query    1673  AAACCCATGTATGAAGTACAGTGGAAAGGTTGTTGAGGAGATCAATGGAAACAATTATGTT 1732
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct    1      AAACCCATGTATGAAGTACAGTGGAAAGGTTGTTGAGGAGATCAATGGAAACAATTATGTT 60

Query    1733  TACATAGACCCAACACAGCTTCCTTACGATCACAATGGGAGTTTCCCAGAAACAGGCTG 1792
          |||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct    61     TACATAGACCCAACACAGCTTCCTTATGATCACAATGGGAGTTTCCCAGAAACAGGCTG 120

Query    1793  AGCTTTG 1799
          |||||
Sbjct    121  AGCTTTG 127

```

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

Fonte: MACEDO, T. M. (2014).

Figura 16: A figura ilustra a região do códon 576 do exon 11 do gene *c-kit*, onde ocorreu a troca de uma Citosina por uma Timina, mantendo o aminoácido Tirosina

	Codon
	576
Normal	1739 GAC CCA ACA CAG CTT CCT TAC GAT CAC AAA TGG GAG TTT CCC AGA AAC AGG CTG AGC TTT 570 D P T Q L P Y D H K W E F P R N R L S F
Mutado	1739 GAC CCA ACA CAG CTT CCT TA T GAT CAC AAA TGG GAG TTT CCC AGA AAC AGG CTG AGC TTT 570 D P T Q L P Y ↑ D H K W E F P R N R L S F
	Troca C → T

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

Fonte: MACEDO, T. M. (2014)

Mutações ativante, do tipo duplicação constitutiva interna não foram observadas neste estudo. A presença de mutação não foi relacionada a resposta ao tratamento, todos os pacientes com mutação apresentaram doença progressiva. Não foi observada diferença significativa na presença de mutação entre os pacientes que responderam e não responderam ao tratamento quimioterápico ($p=0,544$). A frequência genotípica e alélica da mutação pontual encontrada está descrita na Tabela 7.

Tabela 7: Frequência alélica e genotípica da mutação pontual encontrada.

MUTAÇÃO	Frequência genotípica			Frequência alélica	
	AA%	AB%	BB%	A%	B%
1759 [C→T]	84	8	8	88	12

Fonte: Serviço de Cirurgia de Pequenos Animais – VCI - HOVET – FMVZ/USP. São Paulo, 2014

Quadro 8 - Caracterização das lesões alvo, classificação histológica e imunohistoquímica, presença de mutação, expressão do RNAm do gene *c-kit* e do seu ligante, porcentagem de variação da mensuração clínica, maior diâmetro e volume tumoral a tomografia computadorizada no grupo tratado com vimblastina e prednisona (VP) e caracterização da resposta ao tratamento segundo as normas do RECIST 1.1.

Cão Nº (Prontuário No)	Estadiamento (OMS)	Nº formações	Metástase	Localização da lesão alvo	Paquímetro % Variação	RECIST	Maior diâmetro % Variação	RECIST	Volume % Variação	RECIST	HPT - Patnaik (1984)	HPT – Kiupel (2011)	Índice mitótico	IHQ do KIT	IHQ do VEGF	Ki- 67 %	Mutação	RT-PCR <i>c-kit</i>	RT-PCR LIGANTE DO KIT
C3VP (193912)	Ia	1	Ausente	MTD †	Óbito	-	-	-	-	-	II	-	-	II	++	2,5		0,113437	2,635742
C4VP (211015)	Ia	1	Ausente	Tronco	23,7	DP	0,2	DE	4,9	DE	II	-	-	III	+++	0	1759 [C→T]		
C7VP (213142)	IIIa	1	Ausente	MPD†	55,7	DP	30,9	DP	112,4	DP	II	-	-	II	+	2,1		6,497862	0,375845
C8VP (216715)	IIIa	2	Ausente	MPD	17,3	DE	20,7	DP	46,3	DP	II	-	-	II	+++	0,6		0,56057	0,169365
C9VP (211333)	IIIa	3	Ausente	Genito- perianal	9,5	DE	-22,7	DE	-28	DE	II	baixo grau	0	II	++	0,13		0,15496	0,754299
C10VP (214822)	Ia	1	Ausente	Tronco	-53,8	RP	-14,9	DE	-47,1	DE	II	-	-	III	-	-	1759 [C→T]	0,012473	0,188575
C13VP (219471)	IIIb	1	Ausente	Tronco	Óbito	DP	-	-	-	-	II	baixo grau	0	II	+++	8		0,238154	0,104982
C16VP (220504)	IIIa	3	Ausentes	Tronco	103,1	DP	-15,1	DE	-64	DE	II	baixo grau	0	II-III	+++	0,11		0,063152	1,225363
C18VP (222195)	IIIb	1	Ausente	Tronco	Óbito	DP	-	-	-	-	II	baixo grau	2	II	+	-	1759 [C→T]	0,085375	0,848631
C19VP (223238)	Ia	1	Ausente	Cabeça e pescoço	220	DP	14,7	DE	84,2	DP	II	baixo grau	0	II	++	-			
C21VP (213219)	Ia	1	Ausente	MPE	13,9	DE	-13,8	DE	-50,8	DE	II	baixo grau	0	I	+	1,12			
C23VP (229803)	IIb	1	Linfonodo inguinal	Genito- perianal	72,8	DP	43,9	DP	69,3	DP	III	alto grau	8	II	++	-		0,488004	
C24VP (231115)	IIIa	1	Lesões satélites	Tronco	90,9	DP	27,2	DP	123,2	DP	II	baixo grau	0	II	+	0,66		0,050239	0,179022
C26VP (232197)	IIIa	1	Linfonodo popliteo	MPE	7	DE	-42,1	RP	-75,3	RP	II	baixo grau	0	III	+++	1,9		3,71913	0,421384

Fonte: Serviço de Cirurgia de Pequenos Animais – VCI –HOVET – FMVZ/USP. São Paulo 2014

Quadro 9 - Caracterização das lesões alvo, classificação histológica e imunohistoquímica, presença de mutação, expressão do RNAm do gene *c-kit* e do seu ligante, porcentagem de variação da mensuração clínica, maior diâmetro e volume tumoral a tomografia computadorizada no grupo tratado com vimblastina e prednisona (VP) e caracterização da resposta ao tratamento segundo as normas do RECIST 1.1.

Cão No (Prontuário No)	Estadiamento (OMS)	Nº formações	Metástase	Localização da lesão alvo	Paquímetro % Variação	RECIST	Maior diâmetro % Variação	RECIST	Volume % Variação	RECIST	HPT - Patnaik (1984)	HPT – Kiupe (2011)	Índice mitótico	IHQ do KIT	IHQ do VEGF	Ki- 67 %	Mutação	RT-PCR <i>c-kit</i>	RT-PCR LIGANTE DO KIT
C1MI (206994)	IIIb	2	Linfonodo poplíteo	MPDT	-	-					II	baixo grau	0	II-III	-	0,42		2,40431	
C5MI (163104)	IIIa	1	Ausente	Genito- perianal	10,22	DE	13	DE	133	DP	II	baixo grau	0	II	++	0		0,084238	0,043386
C6MI (212345)	Ia	1	Ausente	MPE ‡	5,4	DE	21,1	DP	46,3	DP	II	-		II	++	0,1		25,82368	0,900226
C11MI (217341)	IIIb	1	Ausente	Cabeça e pescoço	129,6	DP	23,3	DP	162	DP	II	baixo grau	2	II	+++	0		0,740013	1,956614
C12MI (215065)	Ia	1	Ausente	MPD	-100	RC	-43,2	RP	-83,1	RP	II	-		II	++	0,6			
C14MI (218863)	Ia	1	Ausente	MPD	2	DE	7,5	DE	35,3	DE	II	baixo grau	0	II	+	-			
C15MI (220903)	IIIb	1	Linfonodos mandibulares	Cabeça e pescoço	-51,13	RP	-100	RC	-100	RC	III	baixo grau	0	III	+++	0,5		1,098567	
C17MI (222440)	Ila	1	Linfonodo cervical superficial	MPD	-50	RP	-40,8	RP	-86,3	RP	II	baixo grau	0	III	+++	8,6		7,86596	0,254963
C20MI (225418)	IIIa	1	Ausente		-	DP					II	baixo grau	0	II	++	2,76		0,110769	4,282222
C22MI (228683)	IIIa	2	Linfonodo inguinal	Genito- perianal	71,43	DP	77,7	DP	225,26	DP	II	baixo grau	2	I	+	9,8			
C25MI (231695)	IIIa	1	Ausente	Tronco	-15,7	DE	-15,3	DE	-74,87	RP	II	baixo grau	0	II	++	0,47			
C27MI (232528)	IIIb	2	Linfonodo cervical superficial	MTE	59,21	DP	33,07	DP	103,2	DP	II	baixo grau	2	III	++	15,1		2,166885	
C28MI (227390)	IIIb	1	Ausente	Tronco	-3	DE	-16,8	DE	-3,8	DE	III	baixo grau	0	III	+	22,5	1759 [C→T]	1,659355	2,133703
C29MI (235172)	Ia	1	Ausente	MPE	-24	DE	-55,9	RP	-91,25	RP	II	baixo grau	0	II	++	3,83		1,79704	
C30MI (235599)	Ia	1	Ausente	MPE	0	DE	-4,39	DE	-30,96	DE	II	baixo grau	0	II	++	1,19			

Fonte: Serviço de Cirurgia de Pequenos Animais – VCI –HOVET – FMVZ/USP. São Paulo 2014

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Os animais avaliados neste estudo foram provenientes do Serviço de Cirurgia de Pequenos Animais do Departamento de Cirurgia junto ao Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. O estudo foi prospectivo, com acompanhamento clínico dos animais em retornos durante o tratamento quimioterápico. Para que fossem incluídos na pesquisa estes pacientes deveriam ter diagnóstico de mastocitoma por citologia por agulha fina confirmados com histopatológico. Os proprietários deveriam aderir ao protocolo de tratamento quimioterápico e este ter acompanhamento de no mínimo 3 meses (VP) e 2 meses (MI). Foram excluídos deste estudo 216 animais por não atenderem os critérios de inclusão e exclusão propostos, sendo assim a casuística descrita neste estudo não reflete a totalidade dos casos atendidos, portanto não pode ser tomada como base epidemiológica. Durante a realização do projeto 2 pacientes abandonaram o tratamento não sendo possível o contato posterior, assim sendo também não foram incluídos nesta pesquisa.

Os pacientes foram acompanhados durante todo o período do tratamento quimioterápico e após o término deste. Os pacientes que apresentaram resposta ao tratamento foram submetidos a cirurgia e quimioterapia pós cirúrgica se necessário; entretanto os pacientes com doença estável ou progressiva continuaram em tratamento quimioterápico. Os pacientes pertencentes ao grupo MI, o quimioterápico foi trocado pelo protocolo padrão com vimblastina e prednisona, uma vez que o mesilato de imatinibe só foi fornecido durante a duração do estudo e por se tratar de uma medicação com alto custo, os proprietários optaram por não dar continuidade ao tratamento. No grupo VP optou-se pelo uso de doses mais altas de vimblastina ou na associação desta com outros quimioterápicos utilizados no tratamento do mastocitoma. Por se tratar de um estudo prospectivo com duração limitada ao tempo de tratamento, com a impossibilidade de manutenção da terapia com mesilato de imatinibe após o período de dois meses e o uso de diferentes tratamentos após o término do estudo, a avaliação de sobrevida e intervalo livre de doença destes pacientes não foi realizada.

6.1 ESTUDO CLINICO

Foram selecionados 29 cães que preenchiam os critérios acima citados. A raça com maior número de indivíduos incluídos no estudo foi o Boxer (5/29), seguida do Labrador retriever, este achado vem de encontro a incidência descrita na literatura, que coloca estas duas raças entre as mais prevalentes (LONDON; THAMM, 2013; MELO et al., 2012; WARLAND; DOBSON, 2013). A maior representação da raça Boxer é prevista, uma vez que é descrita a predisposição hereditária em animais originários dos Bulldogs (O'KEEFE, 1990; LEMARIÉ et al., 1995; FOX, 1998; LONDON; SEGUIN, 2003; MISDORP, 2004). Foi observado uma grande proporção de cães sem padrão racial (8/29), diagnosticados como portadores de mastocitoma. Os animais sem raça definida frequentemente não são citados na literatura e, tal achado, no presente estudo, pode ser explicada pela predominância de mestiços na casuística do Serviço de Cirurgia de Pequenos Animais – VCI – FMVZ/USP - HOVET, algumas publicações nacionais também trazem a alta incidência de cães sem padrão racial (COSTA-CASAGRANDE et al., 2008; STREFEZZI et al., 2010; MELO et al., 2012).

A predisposição sexual não é relacionada à ocorrência do mastocitoma em cães (O'KEEFE, 1990; GOVIER, 2003;), fato este verificado neste estudo, onde fêmeas e machos foram acometidos na proporção de 1,4:1, porém, alguns autores verificaram uma maior susceptibilidade em cães machos (TAKAHASHI, 2000), enquanto outros referem maior predisposição em fêmeas (SIMOES et al., 1994). A idade média dos animais neste estudo foi de 8 anos, variando de 2 a 16 anos, indo de encontro com o descrito na literatura (LONDON; SEGUIN, 2003; WELLE et al., 2008; COSTA-CASAGRANDE et al., 2013; LONDON; THAMM, 2013).

Na totalidade obtivemos 39 formações de localizações variadas, ou seja, 24,1% (7/29) dos cães possuíam mais de uma formação no corpo, incidência esta descrita na literatura, que refere a presença de formações múltiplas em 3 a 14% dos animais (MACY, 1985; O'KEEFE, 1990; SIMOES et al., 1994). As lesões apresentavam-se principalmente em membros (16/39) e tronco (15/39), locais descritos como os mais acometidos por mastocitomas, seguidos da região de cabeça e pescoço e região perineal. Alguns autores descrevem as lesões perineais juntamente com as localizadas em tronco como sendo as regiões de maior

incidência dos mastocitomas, o que também foi observado neste estudo, que apresentou 48,7% dos tumores nestas duas regiões (LONDON; SEGUIN, 2003; WELLE et al., 2008; LONDON; THAMM, 2013). A localização das lesões tem sido associada ao prognóstico dos pacientes com mastocitoma, lesões localizadas em região genito-perineal, junções muco-cutâneas e focinho foram relacionadas a um pior prognóstico. (GIEGER et al., 2003; WELLE et al., 2008; LONDON; THAMM, 2013).

O estadiamento clínico dos mastocitomas define a extensão da doença, sendo considerado um fator preditivo da evolução clínica. Pacientes com estágios mais altos, apresentam prognóstico pior, embora muitos autores considerem que a terapia adequada influencie mais no prognóstico que o estágio clínico, uma vez que pacientes com tumores múltiplos (estágio III) ou com comprometimento do linfonodo regional (estágio II) tratados de maneira adequada alcançaram resultados semelhantes aos observados nos pacientes estágio 0 ou I (WELLE et al., 2008; LONDON; THAMM, 2013). Com relação ao estadiamento 34,5% (10/29) dos animais foram classificados como estágio I, 6,9% (2/29) estavam no estágio II e 58,6% (17/29) no estágio III. Oito animais (27,6%) apresentaram metástase em linfonodo regional. A distribuição das formações cutâneas, assim como, o estadiamento clínico dos pacientes nos dois grupos de estudo foi homogênea, deste modo a influência na evolução clínica dos pacientes, que estas variáveis poderiam exercer, foi anulada.

O uso da biópsia para obtenção de material para graduação dos tumores e avaliações moleculares trouxe complicações caracterizadas por deiscência de pontos, sangramento, hematoma, edema, eritema e não cicatrização dos pontos de biópsia em 34,5 % dos pacientes, uma incidência alta de complicações se comparadas a simplicidade do procedimento. Essas complicações devem-se a liberação de aminas vasoativas como a histamina, heparina e proteases contidas nos grânulos dos mastócitos, mecanismo semelhante ao associado as complicações pós cirúrgicas observadas neste tipo de neoplasia (LONDON; THAMM, 2013)

6.2 DETERMINAÇÃO OBJETIVA DA RESPOSTA TUMORAL FRENTE AO TRATAMENTO ATRAVÉS DAS NORMAS DO RECIST 1.1.

Neste estudo foram utilizados 3 métodos de aferição das formações cutâneas, conforme proposto nas normas do RECIST. Um clínico, que consistiu nas aferições com o uso de um paquímetro, método este mais acessível, de fácil execução, mas sujeito a maiores erros de interpretação secundários a variáveis relacionadas ao tumor, como o edema, inflamação e a infiltração em tecidos adjacentes, que dificultam a mensuração precisa da formação. Interferências relacionadas ao animal, que muitas vezes não permite o posicionamento para adequado acesso a formação cutânea e ainda as variáveis relacionadas ao observador, neste estudo as mensurações foram realizadas sempre pela mesma pessoa, procurando minimizar as interferências entre observadores.

Os outros dois métodos de aferição utilizaram imagens obtidas por tomografia computadorizada, para determinação do maior diâmetro tumoral e volume da neoplasia. A tomografia computadorizada é considerada o método mais preciso, e de fácil reprodução, para mensuração de tumores sólidos, principalmente na avaliação do grau de infiltração nos tecidos adjacentes, que não pode ser acessado através da avaliação clínica. Os achados de tomografia são úteis na avaliação da resposta ao tratamento quimioterápico/ radioterápico, fornecendo informações para posterior caracterização da resposta a terapia instituída, além de auxiliar no planejamento cirúrgico. (EISENHAUER et al., 2009; A et al., 2013), por este motivo considerou-se a resposta dos pacientes aos protocolos de quimioterapia, aquela determinada pela medida do maior diâmetro tumoral a tomografia.

A avaliação da resposta a quimioterapia citorrredutora, por tomografia computadorizada tem sido realizada com base nas alterações do maior diâmetro tumoral ao longo do tratamento, seguindo os critérios do RECIST. Outras metodologias para este acompanhamento foram propostas, a OMS criou critérios de resposta baseados na mensuração da área tumoral, a partir da medida dos dois diâmetros tumorais, esta metodologia apresenta falhas por desconsiderar alterações na terceira dimensão. O volume tumoral também é utilizado no acompanhamento das terapias citorrredutoras, mostrando-se mais preciso na determinação das alterações tumorais, por ser uma avaliação tridimensional (SOHAIB et al., 2000).

Neste estudo foi observado uma grande associação entre a caracterização das respostas ao tratamento pelos métodos do RECIST e volume, resultado também observado por SOHAIB et al. (2000) e LORIGADOS et al. (2013).

Na avaliação tomográfica os mastocitomas podem assumir padrões bastante variados, podendo apresentar aspecto homogêneo e bem delimitado ou heterogêneo e com limites pouco definidos. Presença de áreas hipoatenuantes, que não realçam após a administração do contraste, podem indicar áreas de necrose, enquanto regiões tumorais mais ativas e com aumento da vascularização exibem aumento do realce pós contraste (LORIGADOS et al., 2012). Alterações nestas características também podem trazer informações quanto a resposta ao tratamento, independente das alterações no tamanho. O acesso a resposta quimioterápica a partir dos critérios do RECIST, tem se mostrado limitado em pacientes tratados com terapias-alvo (CHOI et al., 2007; STACCHIOTTI et al., 2009; DESAI, 2011). O uso destes critérios tem sido questionado principalmente no que diz respeito à resposta do Tumor Estromal Gastrointestinal (GIST) ao mesilato de imatinibe (CHOI et al., 2007) e a determinação da resposta a quimioterapia ou radioterapia citorrredutora em sarcomas de tecidos moles (STACCHIOTTI et al., 2009).

A baixa capacidade do RECIST em determinar a resposta a terapia citorrredutora se deve a alterações induzidas pelo tratamento, que não são consideradas por este método. Choi et al. (2007) propuseram a inclusão das mudanças na atenuação do tecido tumoral, após o realce de contraste, em tomografia computadorizada na avaliação a resposta ao tratamento citorrredutor, este critério mostrou-se melhor em prever prognóstico e da resposta ao tratamento do que os critérios do RECIST. STACCHIOTTI et al. (2009) utilizaram o RECIST1.1 e os critérios de Choi na avaliação da resposta de sarcomas de tecidos moles a terapia quimio-radioterápica e observaram maior sensibilidade dos critérios de Choi na detecção da resposta tumoral, sendo este método preditivo da resposta patológica. Essas mudanças são indicativas de boa resposta ao tratamento independentemente das mudanças no tamanho da formação, podem indicar necrose, hemorragia intratumoral ou degeneração mixomatosa, que podem levar a aumento do volume tumoral, devido ao acúmulo de fluidos, que não deve ser interpretado como progressão da doença (CHOI et al., 2007; DESAI, 2011). Os critérios de Choi não foram utilizados neste estudo, uma vez que para a sua aplicação seria necessário a padronização dos cortes a tomografia, da velocidade de infusão do contraste, além

de equipamento tomográfico e softwares mais avançados (A et al., 2013), os quais não estavam disponíveis para a utilização neste projeto. A sua utilização contribuiria na melhor avaliação da resposta dos pacientes ao tratamento, podendo resultar em maior número de pacientes com remissão parcial.

6.3 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA E ÍNDICE MITÓTICO

O alto grau histopatológico dos mastocitomas caninos é tido como um fator prognóstico negativo, influenciando diretamente no curso da doença (WELLE et al., 2008c). Neste estudo o grau histológico foi determinado seguindo os critérios de Patinaik e Kiupel. Os dois grupos de tratamento se mostraram homogêneos quanto à classificação histológica com 89,3% dos pacientes graduados como Grau II e 95,5% como baixo grau. A homogeneidade dos grupos é interessante neste tipo de estudo, em que dois tratamentos são comparados, uma vez que o grau histológico é um fator preditor da evolução da doença, onde cães com tumores grau III apresentam sobrevida e intervalo livre de doença menores, quando comparados com pacientes grau I e II (SCASE et al., 2006a; TAKEUCHI et al., 2013). O grande viés na classificação de Patinaik está na variação entre observadores, principalmente nos casos de tumores com padrões limítrofes entre grau I e II ou grau II e III, deste modo dentro dos pacientes classificados como grau II podem existir padrões de comportamento tumoral diferentes (STREFEZZI, DE et al., 2009). A classificação de Kiupel foi desenvolvida com o propósito de reduzir a ambiguidade nos mastocitomas de grau intermediário (KIUPEL et al., 2011a) e parece ser mais prognóstica que a graduação de Patinaik, cães com tumores de alto grau tem menor sobrevida e intervalo livre de doença (KIUPEL et al., 2011a; TAKEUCHI et al., 2013).

A predominância do grau II descrita neste trabalho é descrita em literatura (SCASE et al., 2006; WEBSTER et al., 2008; AMORIM et al., 2010; TAKEUCHI et al., 2013), assim como o alto índice de tumores de baixo grau (GIANTIN et al., 2012; TAKEUCHI et al., 2013) e confirma a necessidade de associação do grau histológico a outros marcadores prognósticos como o padrão imunohistoquímico do KIT e marcadores de proliferação como o Índice mitótico e o Ki-67, uma vez que o grau II pode apresentar comportamento bastante variado. (WEBSTER et al., 2008). O fato

da graduação tumoral ter sido realizada em material proveniente de biopsia com punch, resultando muitas vezes em fragmentos tumorais pequenos, representativos de uma pequena parte do tumor, pode ter contribuído para a alta incidência de mastocitomas grau II e de baixo grau, esta metodologia de obtenção de material para o diagnostico pode ter levado a subestimação do real grau das neoplasias deste projeto.

Nesse estudo o grau histológico, pelas duas metodologias, não foi associado à resposta ao tratamento, resultado semelhante ao observado por Thamm; Mauldin; Vail (1999). Este achado pode ser consequência do pequeno número de animais incluídos e pelo grande número de animais graduados como grau II, uma vez que a associação desta variável a resposta ao tratamento mostrou uma tendia maior de resposta dos pacientes grau III comparados com o grau II, embora esse resultado não tenha sido significativo.

Não foi observado diferença significativa no índice mitótico (IM) nos dois grupos de estudo e este não influenciou na resposta ao tratamento. A determinação do IM promove informação sobre a taxa de proliferação tumoral. Altos índices mitóticos estão associados a tumores de comportamento mais agressivo. KIUPEL et al. (2011) incluíram o índice mitótico na graduação dos mastocitomas, utilizaram um *cut-off* de 7, como critérios para classificação dos tumores em alto grau, que foi associado a progressão desfavorável da doença, o uso do cut-off para o IM mais alto também foi proposto por ELSTON et al. (2009) este grupo observou melhor correlação com a sobrevida dividindo os animais em 3 grupos: IM =0, IM entre 1 e 7 e IM > 7 e observaram que a os animais com IM maior que 7 apresentavam prognostico mais reservado que os com IM entre 1 e 7 e por isso não poderiam ser agrupados com os mesmos pacientes do segundo grupo como proposto por outros autores. Em nosso estudo foi utilizado o *cutt-off* de 5, proposto por ROMANSIK et al. (2007), que relacionou os valores de IM acima de 5 ao comportamento biológico mais agressivo dos mastocitomas.

O IM mais alto utilizado por Kiupel explica a baixa incidência de pacientes com tumores de alto grau, uma vez que somente 1 animal apresentou IM>7 no grupo de estudo, este paciente foi graduado como Grau III, devido ao baixo número de animais com esta graduação, não foi possível correlacionar o IM com o grau histológico, no entanto esta relação é descrita, onde quanto maior a graduação do mastocitoma maior o índice mitótico (ROMANSIK et al., 2007; ELSTON et al., 2009).

Um limitante encontrado para a realização desta avaliação, mais uma vez, foi o tamanho da amostra utilizada, não representativa da totalidade do tumor, uma vez que a massa tumoral não é homogeneia podendo apresentar regiões com maior quantidade de tecido necrótico, população de células quiescentes ou regiões formadas por células com uma maior taxa de proliferação.

6.4 AVALIAÇÃO IMUNOHISTOQUIMICA: QUANTIFICAÇÃO DO KI-67 E VEGF E CLASSIFICAÇÃO QUANTO A LOCALIZAÇÃO DO KIT

O *cut-off* do ki-67 utilizado neste estudo foi de 1,8 %, diferente do valor de 23% proposto por alguns autores (WEBSTER et al., 2008), a opção por este escore deve-se a metodologia de contagens dos núcleos positivos utilizada neste estudo, que vai de acordo com a proposta por SCASE et al. (2006). Além disso optou-se pelo uso de um valor já descrito em literatura para melhor comparação dos resultados obtidos com os já descritos, alguns autores utilizam pontos de corte próprios, com base na mediana ou nos resultados dados por uma curva ROC (OZAKI et al., 2007; STREFEZZI et al., 2010). Não foi observado diferença significativa no valor de Ki-67 nos dois grupos de estudo. Altos índices de Ki-67 estão associados a tumores mais agressivos, sendo este índice considerado um fator prognóstico negativo independente para mastocitomas grau II, dividindo estes animais em dois grupos, onde aqueles com maiores índices apresentam menor sobrevida (SCASE et al., 2006a; WEBSTER et al., 2008a; STREFEZZI et al., 2010). No entanto alguns autores consideram o Ki-67 um fraco fator prognóstico para recorrência local e potencial metastático, quando utilizado isoladamente e sugerem a sua associação a fatores cinéticos, como o PCNA para melhor predizer o comportamento biológico deste tumor (OZAKI et al., 2007).

O uso do escore de 1,8% apresenta sensibilidade de 79%, possibilitando o diagnóstico de pacientes falso negativos com uma frequência acima da desejada, outros valores foram propostos na tentativa de aumentar a sensibilidade do teste sem afetar a sua especificidade de 95%, sem sucesso (MAGLENNON et al., 2008), por isso, a avaliação dos valores de Ki-67 por esta metodologia deve ser associada

a outras variáveis, como o PCNA, padrão imunohistoquímico do KIT e pesquisa de mutações, aumentando assim a sensibilidade no diagnóstico de cães com tumores biologicamente mais agressivos.

O comportamento biológico variável do mastocitoma faz com que a busca por novos marcadores preditivos seja constante, assim como a busca por novos alvos terapêuticos. O VEGF tem apresentado relação com um prognóstico desfavorável em pacientes com mastocitoma (MEDERLE et al., 2010; GIANTIN, M et al., 2012). Neste estudo todos os pacientes apresentaram imunomarcação para o VEGF, achado este descrito em trabalhos recentes (REBUZZI et al., 2007b; AMORIM et al., 2010; GIANTIN, M et al., 2012; MELO, 2013).

Não houve diferença na quantificação do VEGF entre os dois grupos, sendo observado proporção igual de marcação moderada e forte nos animais. A metodologia empregada neste estudo levou em consideração somente a intensidade de marcação, diferente da metodologia empregada por AMORIM et al. (2010), que levaram em consideração a relação entre a porcentagem de células positivas e a intensidade de marcação, neste projeto a porcentagem de células positivas foi de praticamente 100%, por este motivo optou-se por considerar apenas a intensidade de marcação. A quantificação do VEGF variou de animal para animal não sendo observado relação entre o grau histológico e a intensidade da marcação, resultado também observado por AMORIM et al. (2010) e MELO (2013). O grande número de cães com mastocitoma grau II pode ter contribuído para a perda dessa relação. REBUZZI et al. (2007) GIANTIN, M et al. (2012) observaram correlação positiva entre o grau e a marcação IHQ, pacientes com tumores de maior grau apresentaram marcações do VEGF mais fortes, sugerindo que este marcador passa estar relacionado a tumores mais agressivos, podendo ser incluído no perfil de prognóstico do mastocitoma canino.

A alta porcentagem de células positivas para VEGF observadas neste estudo pode ser explicada pelo fato de que mastócitos não neoplásicos podem expressar e liberar VEGF sob determinadas circunstâncias e esta expressão estaria envolvida na regulação da cicatrização de feridas e na angiogênese, (REBUZZI et al., 2007).

A quantificação imunohistoquímica do receptor KIT, juntamente com o grau histológico, ainda é considerada um dos fatores prognósticos mais fortes relacionado a progressão dos mastocitomas. Trabalhos anteriores frequentemente referem que marcações citoplasmáticas do KIT (KIT III) estão fortemente associadas a tumores

de alto grau histológico, índices de proliferação celular mais altos, presença de mutações no gene *c-kit*, aumento recorrência local e diminuição da sobrevida. O padrão imunohistoquímico do KIT foi uniforme entre os dois grupos de tratamento, com predomínio do padrão II em ambos, o que vem de encontro com os achados de literatura. (WEBSTER et al., 2007, WEBSTER et al., 2008; GIANTIN et al., 2012; COSTA CASAGRANDE et al., 2013; SAILASUTA et al., 2014). Embora a associação entre o padrão de marcação do KIT e o grau histológico não tenha sido realizada neste estudo, 77,8% dos pacientes classificados como KIT III apresentavam tumores grau II, baixo grau. O cão classificado como grau III, alto grau apresentou padrão focal do KIT, parecendo não existir uma relação entre a localização da proteína e o grau histológico, corroborando com os achados de literatura. (STREFEZZI et al., 2010; COSTA CASAGRANDE et al., 2013; MELO, 2013).

6.5 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DO GENE C-KIT POR RT-PCR

Poucos estudos foram realizados utilizando a técnica de PCR em tempo real (RT-PCR) para determinação da expressão do gene *c-kit* e do seu ligante. Turin et al. (2006) ao avaliarem a expressão do *c-kit* por RT-PCR nos mastocitomas caninos constataram ser este um método sensível e eficaz na detecção quantitativa da expressão do gene no tecido tumoral, no entanto não foi possível estabelecer uma correlação da expressão com o prognóstico. Em nosso estudo não foi observado diferença na expressão do gene *c-kit* nos dois grupos de estudo, embora os pacientes do grupo MI tenham apresentado valor médio de expressão do gene maior. Costa-Casagrande et al. (2013) detectaram aumento da expressão do *c-kit* no tecido tumoral de pacientes com mastocitoma, mas este aumento, assim como observado por Turin et al. (2006) não foi relacionada ao intervalo livre de doença e chance de óbito. Os grupos VP e o MI também expressaram valores estatisticamente semelhantes do ligante do KIT. Diminuição na expressão do SCF foi associada a maior taxa de recidiva, mas assim como a expressão do *c-kit*, essa diminuição não foi associada ao óbito dos pacientes (COSTA CASAGRANDE et al., 2013).

Giantin et al. (2012) quantificaram o RNAm do gene *c-kit* por RT-PCR no tecido tumoral de mastocitomas de diferentes graus e em pele normal e observaram um aumento da expressão do gene no tecido tumoral, mas este aumento não foi relacionado ao prognóstico destes pacientes mostrando que a expressão do gene *c-kit* não tem valor preditivo do comportamento biológico desta neoplasia, refletindo apenas a taxa de proliferação dos mastócitos, achado que corrobora com os autores acima citados. A expressão do gene não tem sido relacionada aos graus histológico de Patinaik e Kiupel e a localização da proteína KIT por imunohistoquímica, os estudos tem mostrado que os níveis de expressão do RNAm do *c-kit* independem da localização da proteína, do grau de diferenciação tumoral e da progressão da doença (GIANTIN, MERY et al., 2012b; COSTA-CASAGRANDE et al., 2013), no presente estudo também não foi observada diferença significativa na média da expressão do gene *c-kit* e do seu ligante entre os pacientes KIT II e KIT III. Estudos futuros devem ser realizados para melhor caracterização da expressão do *c-kit* e do seu ligante no mastocitoma canino procurando elucidar a real importância dessa expressão na carcinogênese desta neoplasia.

6.6 AVALIAÇÃO DAS MUTAÇÕES NO EXON 11 DO GENE *C-KIT*

O sequenciamento do exon 11 do *c-kit* foi realizado em 86,2% dos animais (25/29), quatro animais não tiveram o sequenciamento realizado porque o DNA extraído do material tumoral apresentava-se degradado. Optou-se pelo sequenciamento somente do exon 11 com base nos achados de literatura, que referem ser este o exon a concentra o maior número de mutações relacionadas a tumores mais agressivos e consequentemente a um pior prognóstico.

Nos cães as mutações no gene *c-kit* estão presentes em 3 - 45% dos mastocitomas, incluem deleções, inserções e duplicações no domínio justamembrana do KIT, que resultam na ativação constitutiva deste receptor na ausência do seu ligante. As duplicações internas em tandem estão associadas a aumento do risco de metástases e recidiva local, maiores índices de proliferação tumoral e localização aberrante do KIT, a incidência desta mutação é descrita como sendo de aproximadamente 30% e a sua presença está associada ao grau

histológico. Tumores grau I apresentam uma baixa incidência desse tipo e mutação, quando comparados com pacientes grau II e III, essa associação também foi observada entre os tumores de alto de Kiupel (LONDON et al., 1999; DOWNING et al., 2002; LETARD et al., 2008; TAKEUCHI et al., 2013; SAILASUTA et al., 2014).

Em nosso estudo 4 animais (16%) apresentaram mutações pontuais na posição 1759 [C→T], esta substituição de base não conduziu a substituição do aminoácido, deste modo a sequência de aminoácidos deduzida apresentou 100% de homologia com a sequência selvagem. Esta mutação já foi reportada por outros autores, que a descreveram como um polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) silencioso, por não trazer alterações a proteína e consequentemente, não influenciar na atividade do receptor (ZEMKE et al., 2002; RIVA et al., 2005; MARCONATO et al., 2013). Riva et al. (2005) referiram a mutação acima descrita como sendo a mais frequente em seu estudo, 22% dos 32 cães com mastocitomas grau I e II apresentaram essa substituição de base sem a interferência na função do receptor. Identificamos ainda substituições de bases nos intron 10 e 11, estas alterações não apresentam significado clínico por estarem localizadas em regiões não codificantes.

Não foram encontradas mutações ativantes como a DIT ou grandes deleções, neste estudo, estes achados podem ser explicados pela alta incidência de tumores grau II e pelo número reduzido de animais incluídos, Riva et al. (2005) ao avaliarem somente animais com mastocitomas grau I e II observaram apenas 3% de mutações ativantes, esta foi constituída por uma deleção e 6 pares de base (pb) que culminou com a eliminação de 2 aminoácidos, este grupo também não identificou mutações do tipo DIT. Não observamos associação entre o grau histológico e a presença das mutações, todos os pacientes que apresentaram substituições de base foram graduados como grau II baixo grau, este tipo de alteração não foi associado ao grau histológico por nenhum dos autores consultados.

Webster et al. (2007) identificaram DITs no domínio justamembrana do proto-oncogene c-kit em 16% dos mastocitomas caninos estudados, estas mutações foram associadas ao aumento dos índices de proliferação ki-67 e AgNOR e a localização citoplasmática da proteína KIT, concluíram que mutações deste tipo associadas a localização aberrante do KIT estão diretamente relacionadas a altas taxas proliferativas e progressão desfavorável da doença, este mesmo grupo associou a presença de mutações do tipo DIT a redução do intervalo livre de doença, aumento da recidiva local e redução da sobrevida em cães tratados

somente com cirurgia, sendo esta alteração considerada um dos fatores centrais na tumorigênese do mastocitomas, (WEBSTER et al. 2006). As mutações observadas neste estudo apresentaram relação com o grau histológico, 3 dos quatro cães com substituição de base foram classificados como grau III, embora o pequeno número de animais não possibilite a associação estatística desta variáveis. Por se tratarem de mutações sinônimas, não interferindo na codificação da proteína, estas não foram relacionadas, por nenhum dos autores que a descreveram, à variáveis prognósticas.

Ohmori et al. (2008) observaram progressão maligna de mastócitos em cultivo celular, estas células foram provenientes de uma mastocitomas grau II sem mutações no domínio justamembrana, concluíram que mecanismos independentes a mutações também regulam a progressão tumoral, o que explicaria a presença de tumores de crescimento progressivo, a despeito do tratamento, e evolução desfavorável observada em pacientes pertencentes a este estudo.

A presença de mutações, com ganho de função, em outros exons do proto-oncogene c-kit também estão envolvidas na progressão dos mastocitomas. Letard et al. (2008) descreveram mutações ativantes nos exons 8 e 9, correspondentes a porção extracelular do receptor, além de mutações no exon 11, observaram também uma mutação no exon 17, que codifica o domínio quinase do KIT, mas esta não levou a ativação do receptor, achados semelhantes foram descritos por Takeuchi et al. (2013) que relataram presença de mutações em 13 de 47 animais, destas 8 foram encontradas no exon 11 e descritas como DIT, embora estas mutações estivessem presentes principalmente em tumores de alto grau, não foi encontrada associação significativa entre o grau histológico e a presença de mutações ativantes e estas também não foram associadas a diminuição da sobrevida, o que mostra que nem todas as mutações ativantes levam a um mesmo grau de ativação do receptor e a progressão desfavorável da neoplasia.

Não foi encontrada nenhuma referência nacional que descreva a incidência de mutações nos mastocitomas caninos. A ausência de mutações ativantes neste estudo, indo contra a incidência descrita na literatura, pode estar relacionada a alterações populacionais. As mutações podem ocorrer através de uma herança familiar ou racial ou serem adquiridas ao longo da vida. Zemke et al. (2002) não observaram relação entre a presença de mutações no c-kit e a raça dos animais com mastocitoma. Fatores ambientais podem funcionar como agentes iniciadores e promotores de uma neoplasia, estes fatores podem variar com a região geográfica

levando a diferenças na incidência dos tumores ao redor do mundo (MODIANO, 2013). Não existe nenhum estudo relacionando fatores ambientais e o desenvolvimento de mastocitomas. ZANINI et al. (2013) sugeriram que a poluição atmosférica, secundária a poluentes liberados pelos escapamentos dos automóveis pode estar envolvida no desenvolvimento dos linfomas caninos, uma vez que pacientes que residiam em casas próximas a grandes avenidas apresentaram aumento da incidência desta neoplasia, este tipo de estudo não foi realizado com os mastocitomas caninos

6.7 PROTOCOLOS DE QUIMIOTERAPIA

O protocolo de quimioterapia com vimblastina e prednisona é considerado o protocolo padrão para o tratamento do mastocitoma canino, sendo usado como um adjuvante a cirurgia, poucos trabalhos avaliaram o uso deste protocolo como modalidade única de tratamento, naqueles pacientes com tumores inoperáveis ou estágio avançado da doença. O uso de doses de vimblastina mais próximas da dose máxima tolerada tem sido propostas como forma de aumentar a eficácia deste protocolo (THAMM; MAULDIN; VAIL, 1999; VICKERY et al., 2008).

Neste estudo os pacientes tratados com vimblastina e prednisona (grupo VP) apresentaram resposta global de 7,7%, apenas um paciente obteve resposta parcial. Esta resposta está aquém da encontrada na literatura. RASSNICK; BAILEY (2008) ao utilizarem a vimblastina (VBL) na dose preconizada de 2mg/m², como modalidade única de tratamento em 25 cães com mastocitoma grau II e III, grupo semelhante ao do presente estudo, obtiveram taxa de resposta total de 12%, com 3 pacientes alcançando remissão parcial após a 1^o sessão de quimioterapia e nenhuma remissão total, a média de duração da resposta foi de 77 dias. A menor proporção de animais com resposta observada em nosso estudo pode refletir o pequeno número de cães tratados, uma vez que o comportamento diante do tratamento foi o mesmo observado pelos autores citados acima, com um único paciente apresentando remissão parcial, esta foi observada após a 2^a sessão de quimioterapia e foi mantida até o termino do protocolo. Nestes estudo não foram

incluídos dados quanto a evolução dos animais após o termino do protocolo, deste modo, não é possível determinar o intervalo livre de doença e a sobrevida destes pacientes.

Os resultado encontrados nesta pesquisa também divergem dos observado por Thamm; Mauldin; Vail (1999), que relataram 50% (7/15) de resposta com média de duração de 154 dias em 15 cães diagnosticados com mastocitomas grau II e III tratados com VBL na dos e de 2 mg/m² associada a prednisona, 5 pacientes tiveram remissão completa e 2 remissão parcial. A resposta foi maior nos animais com mastocitoma grau II e a sobrevida dos animais que responderam ao tratamento foi maior. Diferenças na resposta ao tratamento relacionadas a localização geográfica dos animais deve ser considerada, os pacientes deste estudo podem ter apresentado menor taxa de resposta por apresentarem tumores mais resistentes a VBL e a Prednisona, uma vez que fatores, que sabidamente poderiam contribuir para a não resposta, como localização e presença de metástase em linfonodo regional não foram associados a resposta ao tratamento neste estudos.

A procura pelo aumento da eficiência do protocolo quimioterápico padrão para tratamento do mastocitoma canino tem levado a pesquisa do uso de doses mais altas de VBL, procurando alcançar a dose clinicamente mais eficaz e segura. Rassnick; Bailey (2008) utilizaram a dose de 3,5 mg/m² em 26 cães com mastocitoma mensurável e chegaram a uma resposta de 27%, resposta está, superior a conseguida com a dose de 2mg/m², mostrando que o aumento da dose, com mínimos efeitos colaterais, traz benefícios aos tratamento do mastocitoma. Resultado semelhante foi observado por Vickery et al. (2008) ao utilizar a vimblastina de maneira escalonada nas doses de 2,33 mg/m², 2,66 mg/m² e 3 mg/m² em 13 cães com mastocitoma em estágio avançado ou com tumores inoperáveis, observaram resposta de 30,8% com 23% dos animais alcançando a remissão completa, mostrando mais uma vez que doses mais altas de vimblastina podem promover melhores resultados no tratamento do mastocitoma, embora estes achados não possam ser afirmados, uma vez que estudos fase II e III, comprovando a eficácia de doses mais altas frente a dose padrão não foram realizados.

No grupo tratado com VBL e prednisona a menor medida dos tumores foi observada entre as 4^o e 5^o sessões de quimioterapia (7/11 animais), sendo que um dos pacientes chegou a ter resposta completa da doença, mostrando que o protocolo utilizado é útil como terapia citorrredutora de tumores não operáveis, mas

não como modalidade única de tratamento, uma vez que a taxa de resposta total foi baixa e com curta duração. Thamm et al. (2006) trataram 61 cães com cirurgia seguida de quimioterapia adjuvante e observaram sobrevida de 1 ano em 80% dos cães, 2 anos em 70%, chegando a 3 anos de sobrevida 65% dos animais, pacientes com tumores de alto grau histológico, localizados em regiões relacionadas a tumores mais agressivos, apresentaram intervalo livre de doença e sobrevida menores. A sobrevida encontrada neste estudo é superior a encontrada pelo mesmo grupo (THAMM; MAULDIN; VAIL, 1999) em cães tratados somente com quimioterapia, mostrando que a cirurgia continua sendo o pilar do tratamento do mastocitoma. Este estudo observou, ainda, que cães tratados com a combinação de tratamento apresentaram sobrevida maior, que aqueles tratados somente com cirurgia.

Webster et al. (2008) observaram ganho na sobrevida e no intervalo livre de doença nos pacientes com mastocitomas de alto grau tratados com vimblastina e prednisona de forma adjuvante, associada ou não a radioterapia, quando comparados com os animais tratados somente com cirurgia, variáveis como padrão de marcações do KIT, presença de mutação no exon 11 do gene c-kit e altos índices de ki-67 foram relacionadas a pior prognóstico. Os pacientes com padrão II do KIT tratados com quimioterapia $\pm$ radioterapia apresentaram ganhos significativos no intervalo livre de doença e tempo de sobrevida, o mesmo achado foi encontrado, embora não de forma significativa, nos pacientes portadores de mutações no domínio justamembrana do KIT, mostrando que estes pacientes podem ser beneficiados com o uso da quimioterapia pós operatória com VBL e prednisona. Em nosso estudo não foi possível estabelecer a relação entre o grau histológico, o padrão de marcação do KIT e a presença de mutação no gene a resposta a terapia com VBL e prednisona, isso porque o número de animais com resposta neste grupo foi muito pequeno. O paciente que apresentou resposta parcial foi classificado como grau II baixo grau, apresentou o tipo selvagem do KIT e padrão de marcação citoplasmática difusa deste receptor.

A baixa taxa de resposta observada por nós pode estar relacionado a alteração na expressão do gene de resistência a múltiplas drogas (MRDR1), e de seu produto, a glicoproteína-P (gp-P), sendo este um dos principais mecanismos de resistência a quimioterapia descrito. Essa resistência pode ser intrínseca a célula tumoral ou adquirida após a exposição a agentes quimioterápicos, como os glicocorticoides, que sabidamente induzem a expressão da gp-P em diversos tipos

de tumores, 23% dos mastocitomas expressam a gp-P e foi observado aumento destas expressão após a terapia com prednisolona (MIYOSHI et al., 2002; RASSNICK; BAILEY, 2008; TENG et al., 2012) Este mecanismo podem explicar a baixa resposta ao tratamento com VBL e prednisona observada neste estudo, além disso, a seleção de clones resistentes ou ainda a indução da expressão da gp-P podem estar relacionadas a curta duração da resposta observada em 85,7% (6/7) dos animais que apresentaram redução das medidas tumorais até a 4^o e 5^o semanas, seguidas de progressão da doença. NAKAICHI et al. (2007) observaram a expressão do MDR1 e da gp-P em 2 linhagens celulares de mastocitomas, sugerindo o envolvimento deste mecanismo nos casos de mastocitomas resistentes ao tratamento.

A resposta total dos pacientes tratados com mesilato de imatinibe foi de 28,6%, com 3 pacientes apresentando remissão parcial e 1 remissão total, resultado aquém do observado por Isotani et al.(2008), que relataram taxa de resposta de 48%, este grupo utilizou o mesilato de imatinibe no tratamento de 21 cães com mastocitomas recidivantes ou inoperáveis, observando remissão parcial em 10 deste animais, destes, 5 cães apresentaram mutações do tipo DIT no domínio justamembrana do KIT, mostrando que pacientes com mutações ativantes beneficiam-se do tratamento com fármacos inibidores de tirosina quinase (ITK), no entanto, pacientes com o tipo tipo selvagem do KIT também apresentaram resposta a terapia e esta foi similar a dos pacientes positivos para mutação, sugerindo o envolvimento de outros mecanismos envolvidos na resposta a esta classe de medicamentos. Mutações no receptor tirosina quinase PDGF- α ou - β foram relatadas em pacientes humano com mastocitose que responderam ao tratamento com o mesilato de imatinibe. Em nosso trabalho não foram observadas mutações ativantes no *c-kit* a despeito da presença de resposta ao tratamento, corroborando com os achados dos autores acima citados.

Ohmori et al. (2008) observaram que células negativas para mutação mantiveram sua capacidade de proliferação. Estas células ao serem tratadas com o mesilato de imatinibe não sofreram redução na taxa proliferativa, sendo a presença da mutação fundamental para o sucesso da terapia com esta classe de medicamento, resultados estes confirmados por Takeuchi et al. (2011) que observaram efeito antiproliferativo de diferentes inibidores de tirosina quinase em linhagens celulares de mastocitomas com o KIT mutado, o mesmo efeito não foi

observado na linhagem celular que expressava o KIT selvagem, estes achados mostram que mutações no domínio justamembrana do KIT podem funcionar como alvos terapêuticos no tratamento do mastocitoma canino. A ausência de mutações que levem a ganho de função do receptor, explica a baixa taxa de resposta observada neste estudo.

Mutações em diferentes regiões do gene *c-kit* podem levar a ativação constitutiva do receptor, a substituição de um par de base no exon 9 foi associada a ativação do receptor e resposta a terapia com o mesilato de imatinibe (YAMADA et al., 2011). Mutações no exon 8 observadas em um mastocitoma intestinal, também foram associadas a resposta favorável com o uso desta medicação (KOBAYASHI et al., 2012). Em ambos os casos os pacientes apresentaram resposta parcial com duração média de 50 dias, a curta duração da resposta pode ser associada ao aumento da expressão de proteínas de efluxo de drogas na parede das células, diminuição de bombas de influxo ou ainda a ativação de outras vias de sinalização (KOBAYASHI et al., 2012). Em humanos o principal mecanismo de resistência ao imatinibe é a reativação do receptor após novas mutações no domínio justamembrana com redução da afinidade de ligação desta região a medicação, este mecanismo não foi confirmado por Kobayashi et al. (2012), que não encontraram novas mutações no gene *c-kit* após a recidiva a terapia com mesilato de imatinibe.

Em nosso trabalho avaliamos apenas o exon 11, mutações em outros domínios poderiam explicar a resposta a terapia em 28,6% dos animais, mesmo na ausência de mutações ativantes neste exon. O tipo de resposta encontrada em nossos pacientes, embora em menor número, vai de encontro com as descritas com o uso do mesilato de imatinibe, onde a remissão completa foi observada em um número pequeno de animais, a grande maioria dos pacientes com resposta a apresentaram de forma parcial, resultados que vem de encontro aos observados os observados neste estudo, talvez a baixa resposta seja consequência do pequeno número de animais incluídos nesta pesquisa. Não existem estudos que avaliem o tratamento com mesilato de imatinibe a longo prazo e em uma grande população de cães, provavelmente isso de deva ao alto custo da medicação, deste modo estudos de sobrevida e intervalo livre de doença com este tratamento são raros.

A menor medida observada nos pacientes que responderam ao tratamento com mesilato de imatinibe foi alcança ao termino das 8 semanas de tratamento resultado diferente do observado por Isotani et al. (2008) e Yamada et al. (2011),

estes autores alcançaram a redução máxima das formações no 14º dia de tratamento, mas em ambos os casos estas tiveram curta duração.

O masitinibe é um inibidor da tirosina quinase aprovado para o tratamento de cães com mastocitomas não metastáticos grau II e III, esta medicação tem como alvo os receptores tirosina quinase KIT e PDGF. Hahn et al. (2010) acompanharam por 2 anos 132 cães portadores de mastocitomas grau II e III não operáveis e tratados com masitinibe, esses cães apresentaram aumento do tempo de progressão da doença, quando comparados com os pacientes que receberam placebo, este evento foi independente do *status* mutacional do paciente, embora as melhores respostas tenham sido alcançadas nos cães portadores de mutações, mostrando mais uma vez que a resposta aos inibidores de tirosina quinase não depende somente da presença de mutações no gene. O ganho em sobrevida foi observado também nos pacientes que apresentaram doença estável por 6 meses, esta foi similar a sobrevida dos pacientes com remissão completa e parcial, sugerindo que a estabilização da doença com os inibidores de tirosina quinase também traz benefícios a sobrevida dos pacientes a longo prazo.

No presente estudo foi observado um alto número de pacientes com doença estável, 5 animais dos 10 classificados como não responsivos ao tratamento pertenciam a este grupo, dentro da prática oncológica estes pacientes teriam o protocolo quimioterápico substituído por outro mais efetivo, os resultados supracitados sugerem uma mudança na estratégia de tratamento para este grupo específico de medicamentos, deste modo os pacientes com doença estável poderiam ser incluídos dentro do grupo dos pacientes com resposta a terapia. Esses autores ainda observaram que a resposta obtida após 6 semanas de tratamento não é preditiva da evolução da doença, muitos pacientes alcançaram reduções significativas nas formações cutâneas após esse período. O controle da doença aos 6 meses de tratamento mostrou se preditivo da evolução clínica destes animais, sendo assim a terapia com os ITK deve ser mantida por no mínimo 6 meses naqueles pacientes com RC/ RP e DE, ao contrário do indicado nos tratamentos com drogas citotóxicas, onde o sucesso do protocolo está em conseguir o máximo de resposta em um curto intervalo de tempo, em nosso estudo os pacientes receberam a medicação por 8 semanas, quando a resposta ao tratamento foi determinada e a terapia suspensa, seguindo os critérios de segmento sugerido por Hahn et al. (2010) pacientes que apresentaram DE ou DP poderiam ainda

apresentar redução no volume das suas formações cutâneas. Acompanhamentos por longos períodos de tratamento não foram realizados com outros ITK, deste modo não é possível determinar, se estes achados se estendem a todas as classes de ITK ou se aplicam somente para o masitinibe.

Variáveis como grau histológico, expressão imunohistoquímica do KIT e presença de mutações não foram associadas a resposta ao tratamento nesta pesquisa. A expressão imunohistoquímica do VEGF também não apresentou associação com a resposta a terapia, embora no grupo com resposta 3 pacientes tenham apresentado marcação forte do receptor, não foi possível estabelecer uma associação entre quantificação do VEGF e a resposta ao mesilato de imatinibe, uma vez que o número de animais que se beneficiaram com o uso da medicação é muito pequeno, não possibilitando uma correlação estatística entre a variável e a resposta.

Um dos objetivos do nosso estudo foi quantificar a expressão do *c-kit* e do seu ligante através do RT-PCR e relacionar estes achados com a resposta à terapia com o ITK, foi observado associação significativa na expressão do gene *c-kit* e a resposta a terapia, pacientes que responderam ao tratamento apresentaram expressões maiores, no entanto não foi possível estabelecer uma correlação entre a resposta ao ITK e a expressão do gene por se tratarem de poucos animais. Estes achados sugerem que altas expressões do *c-kit* podem ser preditivas de resposta ao tratamento, principalmente nos casos de terapia-alvo, uma vez que os animais com resposta ao tratamento pertencem basicamente ao grupo M1. Não foi encontrado nenhum estudo que relacione a expressão do mRNA do gene *c-kit* e a resposta aos inibidores de tirosina quinase. Estudos voltados para a determinação do real valor da expressão do gene *c-kit* e do seu ligante no prognóstico e predição da resposta ao tratamento devem ser realizados.

Os efeitos adversos de prednisona e vimblastina nas doses utilizado neste estudo foram aceitáveis, embora a incidência tenha sido de 70%, esta foi representada principalmente por leucopenia e anorexia grau um, efeitos estes comuns a administração da vimblastina, como observado por Thamm; Mauldin; Vail.(1999). Já no grupo tratado com mesilato de imatinibe, apenas 1 cão apresentou vômito grave e teve o tratamento suspenso, os demais apresentaram alterações leves sem comprometimento da qualidade de vida, este resultado vem de encontro com os já observados por outros autores (ISOTANI et al., 2008), embora a

toxicidade hepática tenha sido relatada em humanos (DRUKER; LYDON, 2000), não foi observado anormalidades no perfil hepático destes pacientes.

Não foi observado diferença significativa na resposta de cães com mastocitoma tratados com vimblastina e prednisona em relação aos animais tratados com mesilato de imatinibe, embora a maioria dos pacientes do grupo VP tenha apresentado doença progressiva. A maior taxa de resposta total do grupo MI, indica a superioridade deste protocolo, mesmo na ausência de mutações no gene *c-kit*, resultado que pode ser comparado aos observados por Hahn et al. (2010) ao tratarem cães com mastocitomas utilizando o masitinibe. Os pacientes tratados com o ITK apresentaram chance 4,8 vezes maior de resposta, que os pacientes tratados com o protocolo VP, embora essa relação não tenha sido significativa, provavelmente pelo número de animais incluídos no estudo. Estes resultados apontam para a superioridade da terapia alvo frente ao protocolo padrão com VBL e prednisona, estudos com maior número de animais e utilizando ITK desenvolvidos para uso veterinário devem ser realizados para confirmar esta relação, além disso as medicações alvo são melhor toleradas pelos animais, o que é cada vez mais desejado, ou seja, medicações efetivas com o mínimo de interferência na sobrevida do paciente.

6.8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A realização deste trabalho teve como objetivo principal a comparação entre o protocolo padrão de poliquimioterapia com VBL e prednisona e o uso da terapia alvo com mesilato de imatinibe no tratamento de mastocitomas inoperáveis, procurando associar esta resposta a fatores que sabidamente interferem na progressão destes tumores como a avaliação histopatológica, expressão IHQ do KIT e presença de mutações no gene *c-kit* ou a variáveis ainda pouco estudadas no MCT como a expressão IHQ do VEGF e a expressão do gene *c-kit* e do seu ligante. Os mastocitomas ainda são um desafio na prática oncológica devido a seu comportamento variado, a introdução dos inibidores de tirosina quinase no tratamento desta neoplasia tem mostrados resultados estimulantes, mas a real

superioridade deste protocolo a quimioterapia convencional ainda não foi determinada.

A alta incidência de mastocitomas grau II de Patnaik e baixo grau de Kiupel deste estudo é prevista em literatura, estes achados reforçam a necessidade da utilização de outros marcadores, como o índice mitótico, Ki-67 e PCNA na avaliação e determinação do prognóstico dos pacientes com mastocitoma, principalmente nos tumores de grau intermediários. A classificação de Kiupel, embora separe, de maneira mais eficiente os tumores mais dos menos agressivos, não consegue sozinha prever o real comportamento tumoral.

Alguns fatores podem ter interferido nos resultados dos exames laboratoriais, como o pequeno número de animais incluídos no estudo e a utilização da biópsia para aquisição de amostras tumorais. Embora muitos estudos, trabalhem com a biópsia como metodologia de obtenção de tecido tumoral para realização da gradação histológica e IHQ, algumas limitações devem ser consideradas, como fragmentos de tamanho insuficiente, material de má qualidade e amostras não representativas da totalidade tumoral. Muitos mastocitomas apresentam grandes áreas de necrose e edema, alterações estas utilizadas na gradação tumoral, que no momento da biópsia podem não ser incluídas, ou ainda serem as únicas áreas coletadas influenciando na gradação. Este tipo de coleta também influencia na avaliação dos índices de proliferação, pois podem ser incluídos na biópsia regiões tumorais mais ou menos ativas. Além disso a manipulação gerada pela biópsia leva a desgranulação dos mastócitos e liberação de aminas vasoativas, que explicariam todas as complicações pós biópsia observadas neste estudo.

A avaliação da expressão IHQ do VEGF no tecido tumoral dos pacientes que responderam ao tratamento foi forte em 4 dos 5 animais deste grupo, embora não tenha sido possível estabelecer uma relação entre resposta a esta classe de medicamentos e a quantificação do receptor, podemos cogitar uma possível influência deste na redução do volume tumoral observada, por se tratar este de um receptor do tipo tirosina quinase e por isso podendo funcionar como alvo do ITK. Estudos avaliando a real função do VEGF e do PDGF na progressão do mastocitoma são necessários, estabelecendo o papel prognóstico destes receptores e a possível utilização destes como alvos moleculares.

Não foi possível estabelecer uma relação entre a expressão do RNAm do gene *c-kit* e do SCF com o grau histológico e o padrão de marcação do KIT, achado

já descrito em literatura, no entanto mais estudos são necessários para estabelecer de maneira mais concreta a influência da expressão do gene e do seu ligante no prognóstico destes pacientes. Os pacientes pertencentes ao grupo MI apresentaram maiores expressões do *c-kit* que o grupo VP, este pode ser o motivo da maior expressão observada no grupo que respondeu ao tratamento, uma vez que 80% destes cães foram tratado com o mesilato de imatinibe. Procurava-se encontrar uma relação entre o aumento da expressão do gene e a resposta a esta classe de medicamentos, mas esta não pode ser determinada diante do pequeno número de animais incluídos no estudo e que responderam a terapia. O aumento da expressão do *c-kit* induz a níveis constantemente altos de ativação do receptor KIT, deste modo estes pacientes poderiam responder melhor aos inibidores do receptor, mas para que isso possa ser afirmado estudos funcionais relacionando a expressão do gene a resposta ao tratamento devem ser realizados.

Não existiu diferença entre a resposta ao tratamento nos dois grupos estudados, no entanto o grupo MI apresentou maior número de animais que responderam a medicação, os animais deste grupo apresentaram chance de resposta ao tratamento 4,8 vezes maior, que os cães tratados com VBL e prednisona. A presença de mutações ativantes do gene *c-kit*, na ausência do seu ligante, são tidas como fundamentais para um bom resultado no tratamento com ITK, em nosso estudo essas mutações não foram identificadas, isso poderia explicar a baixa taxa de resposta observada. Por outro lado tivemos pacientes com remissão parcial e um com remissão total, mutações em outras regiões do gene, como os exons 8 e 9, também associadas a ativação constitutiva do KIT poderiam ser responsáveis por esta resposta ou ainda a ação desta medicação em outros receptores tirosina quinase, como o PDGF e o VEGF, estudos tem apontado para o efeito benéfico destas medicações, mesmo na ausência das mutações e o mecanismo com que isso acontece ainda não é claro.

A metodologia de avaliação da resposta ao tratamento pode ter influenciado na baixa porcentagem de animais beneficiados pelo uso do ITK. ,determinar a resposta ao tratamento somente com base nas variações do maior diâmetro tumoral a TC, tem se mostrado insuficientes, principalmente para tumores tratados com terapia alvo, isso porque essas medicações podem trazer alterações no tumor, que vão além da redução do tamanho. A avaliação das mudanças de atenuação da massa tumoral, como proposto na literatura, poderiam ter trazido resultados mais

promissores, infelizmente para a realização desta avaliação são necessários equipamento tomográfico e softwares, que não dispomos em nossa Universidade.

A quimioterapia com VBL e prednisona, continua sendo, junto com a cirurgia um dos pilares do tratamento do mastocitoma. A baixa resposta observada neste estudo, em comparação com a descrita em literatura, pode refletir o pequeno número de animais tratados, ou ainda, um viés de seleção, uma vez que os animais incluídos neste estudo precisavam apresentar tumores inoperáveis, o que pode ter levado a inclusão de cães com fatores que sabidamente influenciam na progressão da doença, como formações com grandes volumes, tumores ulcerados e localização em região genito-perineal ou face, embora não tenha sido estabelecido a relação entre estes fatores e a não resposta ao tratamento. Alguns pacientes pertencentes ao grupo VP apresentaram reduções significativas nas dimensões tumorais, seguidas de novo aumento, muitas vezes ultrapassando o tamanho inicial, sugerindo, que esta terapia possa ser empregada na citorredução tumoral, mas não como única modalidade de tratamento, os melhores resultados conseguidos com a VBL e prednisona são sempre com o seu uso associado a cirurgia, nestes casos este protocolo traz aumento significativo na sobrevida de pacientes com tumores de alto grau. Pesquisas recentes tem mostrados aumento nas taxas de resposta, quando empregadas doses de vimblastina próximas a dose máxima tolerada, o uso do escalonamento da dose deste quimioterápico poderia ter beneficiado nossos pacientes com um aumento da taxa de resposta.

Os dois tratamentos foram bem tolerados pelos pacientes, o que é previsto pela literatura. Os cães do grupo VP apresentaram maior número de efeitos colaterais, mas isto já era esperado, por se tratar de uma droga citotóxica. Os pacientes do grupo MI toleraram muito bem o tratamento e alterações na função hepática e renal, descritas em humanos ou em cães tratados com outros ITK, não foram observadas, mostrando que a droga é segura.

A homogeneidade dos dois grupos estudados no que diz respeito ao grau histológico, índices proliferativos, avaliação IHQ do KIT e do VEGF e variáveis clínicas como localização das formações e estadiamento foi benéfico neste tipo de estudo, onde dois grupos de tratamento são comparados, isso porque todas essas variáveis influenciam no prognóstico dos pacientes, estando relacionadas a natureza biológica do tumor. Neste estudo não seria interessante que um grupo apresentasse

tumores com padrão mais agressivo que o outro, pois isso poderia influenciar nas respostas conseguidas.

Por fim a ausência de mutações em nossos pacientes pode ser consequência de uma variação populacional, não é de conhecimento do autor a existência de estudos que apontem para a incidência de mutações nos mastocitomas brasileiros, por isso nos baseamos somente em dados estrangeiros, sabe-se que fatores ambientais e relacionados ao modo de vida podem influenciar na presença ou não desta alteração. São necessários estudos nacionais com grande número de cães, que façam a pesquisa de mutações em todos os domínios do KIT, para determinarmos a incidência destas mutações em nossos cães e com isso sabermos se estes também podem se beneficiar com o uso do ITK como descrito em literatura.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos podemos concluir que:

- O mesilato de imatinibe não apresentou superioridade terapêutica quando comparado a vimblastina com prednisona no tratamento do mastocitoma canino. O número de animais tratados com essa medicação pode ter influenciado neste resultado
- O tratamento com mesilato de imatinibe foi bem tolerado pelos animais incluídos no estudo, que apresentaram menor número de efeitos colaterais quando comparados com o grupo VP.
- A ausência de mutações ativantes no gene *c-kit* explica a baixa taxa de resposta a terapia com o mesilato de imatinibe.
- Os animais que responderam ao tratamento apresentaram maiores expressões do gene *c-kit*, mas não foi possível estabelecer associação entre esta expressão e a resposta ao tratamento quimioterápico.
- A quantificação do KIT por imunohistoquímica não mostrou associação com a expressão do gene *c-kit* nem com a resposta ao tratamento.
- A quantificação do VEGF não foi associada ao grau histológico e resposta ao tratamento

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- AMAGAI, Y.; TANAKA, A.; MATSUDA, A.; JUNG, K.; OHMORI, K.; MATSUDA, H. Heterogeneity of internal tandem duplications in the c-kit of dogs with multiple mast cell tumours. **The Journal of small animal practice**, v. 54, n. 7, p. 377–80, 2013.
- AMORIM, R. L.; PINCZOWSKI, P.; NETO, R. T.; RAHAL, S. C. Immunohistochemical evaluation of prostaglandin E2 and vascular endothelial growth factor in canine cutaneous mast cell tumours. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 8, n. 1, p. 23–7, 2010.
- AUBRY, O. A.; SPANGLER, E. A.; SCHLEIS, S. E.; SMITH, A. N. Evaluation of bone marrow aspirates from multiple sites for staging of canine lymphoma and mast cell tumours. **Veterinary and comparative oncology**, v. 12, n. 1, p. 58–66, 2014.
- BAILEY, D. B.; RASSNICK, K. M.; KRISTAL, O.; CHRETIN, J. D.; BALKMAN, C. E. Phase I Dose Escalation of Single-Agent Vinblastine in Dogs. **Journal Veterinary Internal Medicine**, v. 22, n. 6, p. 1397–1402, 2008.
- BALDI, A.; COLLOCA, E.; SPUGNINI, E. P. Lomustine for the treatment of gastrointestinal mast cell tumour in a dog. **The Journal of Small Animal Practice**, v. 47, n. 8, p. 465–7, 2006.
- BAVCAR, S.; ARGYLE, D. J. Receptor tyrosine kinase inhibitors: molecularly targeted drugs for veterinary cancer therapy. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 10, n. 3, p. 163–73, 2012.
- 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. European consensus document on mast cell tumours in dogs and cats. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 10, n. 3, p. e1–e29, 2012.
- BOOKBINDER, P. F.; BUTT, M. T.; HARVEY, H. J. Determination of the number of mast cells in lymph node, bone marrow, and buffy coat cytologic specimens from dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 200, n. 11, p. 1648–1650, 1992.
- BOWLES, C. A.; KERBER, W. T.; RANGAN, S. R. S.; KWAPIEN, R.; WOODS, W. JENSEN, E. M. Characterization of a transplantable, canine, immature mast cell tumor. **Cancer Research**, v. 32, n. 7, p. 1434–1441, 1972.
- CAHALANE, A. K.; PAYNE, S.; BARBER, L. G.; DUDA, L. E.; HENRY, J. C.; MAULDIN, G. E.; FRIMBERGER, A. E.; COTTER, S. M.; MOORE, A. S. Prognostic factors for survival of dogs with inguinal and perineal mast cell tumors treated

surgically with or without adjunctive treatment: 68 cases (1994-2002). **Journal American Veterinary Medical Association**, v. 225, n. 3, p. 401–408, 2004.

CAPP, C.; ZENNIG, N.; WAJNER, S.; MAIA, A. L. Papel do fator de crescimento endotelial vascular nos carcinomas de tireóide. **Revista do Hospital de Clinicas de Porto Alegre**, v. 29, n. 1, p. 51–59, 2009.

CHOI, H.; CHARNSANGAVEJ, C.; FARIA, S. C.; MACAPINLAC, H. A.; BURGESS, M. A.; PATEL, S. R.; CHEN, L. L.; PODOLOFF, D. A.; BENJAMIN, R. S. Correlation of computed tomography and positron emission tomography in patients with metastatic gastrointestinal stromal tumor treated at a single institution with imatinib mesylate: proposal of new computed tomography response criteria. **Journal of Clinical Oncology**, v. 25, n. 13, p. 1753–1759, 2007.

COSTA CASAGRANDE, T. A.; OLIVEIRA BARROS, 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**, p. 1–10, 2013.

COSTA-CASAGRANDE, T. A.; ELIAS, D. S.; MELO, S. R.; MATERA, J. M. Estudo retrospectivo do mastocitoma canino no serviço de cirurgia de pequenos animais - hospital veterinário da faculdade de medicina veterinária e zootecnia da universidade de São Paulo. **Archives of Veterinary Science**, v. 13, n. 3, p. 176–183, 2008.

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 of the American Animal Hospital Association**, v. 40, n. 2, p. 124–30, 2004.

DAVIS, B. J.; PAGE, R.; SANNES, P. L.; MEUTEN, D. J. Cutaneous mastocytosis in a dog. **Veterinary Pathology**, v. 29, n. 4, p. 363–365, 1992.

DESAI, J. Response assessment in gastrointestinal stromal tumor. **International Journal of Cancer**, v. 128, n. 6, p. 1251–8, 2011

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, n. 8, p. 424–31, 2007.

DOWNING, S.; CHIEN, M. B.; KASS, PHILIP H; MOORE, P. E.; LONDON, CHERYL A. Prevalence and importance of internal tandem duplications in exons 11 and 12 of c-kit in mast cell tumors of dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 63, n. 12, p. 1718–23, 2002.

DUBREUIL, P.; LETARD, S.; CIUFOLINI, M.; GROS, L.; HUMBERT, M.; CASTÉLAN, N.; BERGE, L.; HAJEM, B.; LERMET, A.; SIPPL, W.; VOISSET, E.; AROCK, M.; AUCLAIR, C.; LEVENTHAL, P.; MANSFIELD, C. D.; MOUSSY, A.;

HERMINE, O. Masitinib (AB1010), a potent and selective tyrosine kinase inhibitor targeting KIT. **PloS one**, v. 4, n. 9, p. e7258, 2009.

EISENHAUER, E A.; THERASSE, P.; BOGAERTS, J.; SCHWARTZ, L H.; SARGENT, D.; FORD, R.; DANCEY, J.; ARBUCK, S.; GWYTHYER, S.; MOONEY, M.; RUBINSTEIN, L.; SHANKAR, L.; DODD, L.; KAPLAN, R.; LACOMBE, D.; VERWEIJ. New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). **European Journal of Cancer** v. 45, n. 2, p. 228–47, 2009.

ELSTON, L.; SUEIRO, F. A.; CAVALCANTI, J.; METZE, K. The importance of the mitotic index as a prognostic factor for canine cutaneous mast cell tumors - a validation study. **Veterinary Pathology**, v. 46, n. 2, p. 362–364, 2009.

FERRARA, N.; GERBER, H.-P.; LECOUTER, J. The biology of VEGF and its receptors. **Nature Medicine**, v. 9, n. 6, p. 669–76, 2003.

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

FOX, E. L. Mast Cell Tumors. In: MORRISON, B. W. **Cancer in dog and cats medical surgical management**. Philadelphia: Williams & Wilkins, 1998. p.479-488.

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

GIANTIN, M.; VASCELLARI, M.; MORELLO, E. M.; CAPELLO, K.; VERCELLI, A.; GRANATO, A.; LOPPARELLI, R. M.; NASSUATO, C.; CARMINATO, A.; MARTANO, M.; MUTINELLI, F.; DACASTO, M. c-KIT messenger RNA and protein expression and mutations in canine cutaneous mast cell tumors: correlations with post-surgical prognosis. **Journal Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 24, n. 1, p. 116–26, 2012

GIEGER, T.L.; THÉON, A. P.; WERNER, J.A.; MCENTEE, M. C.; RASSNICK, K. M.; DECOCK, H. E. V. Biologic behavior and prognostic factors for mast cell tumors of the canine muzzle: 24 cases (1990-2001). **Journal Of Veterinary Internal Medicine**, v. 17, n. 5, p. 687–92, 2003.

GIEGER, T.; NORTHRUP, N.; WALL, M. Clinical management of mast cell tumors in dogs. **Compendium on Continuing Education of the Paracticing Veterinarian**, v. 27, n. 1, p. 56–69, 2005.

GIL DA COSTA, R. M.;MATOS, E.; REMA, A.; LOPES, C.; PIRES, M. A.; GÄRTNER, F. CD117 immunoexpression in canine mast cell tumours: correlations

with pathological variables and proliferation markers. **BMC Veterinary Research**, v. 3, p. 19, 2007.

GRANT, I A.; RODRIGUEZ, C O.; KENT, M S.; SFILGOI, 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 Veterinary Internal Medicine**, v. 22, n. 2, p. 388–393, 2008.

GOLDSCHMIDT, M. H.; HENDRICK, M. J. Tumors of the Skin and Soft Tissues. In: MEUTEN, D.J. **Tumors in Domestic Animals**. 4 ed. Iowa. Iowa State Press. 2002. p. 105-107.

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.M.; 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, n. 11, p. 1354–61, 2010.

HAHN, K. A.; OGLIVIE, G.; RUSK, T.; K.; DEVAUCHELLE, P.; LEBLANC, A.; LEGENDRE, A.; POWERS, B.; LEVENTHAL, P. S.; KINET, J.; PALMERINI, F.; DUBREUIL, P.; MOUSSY, A., HERMINE, O. Masitinib is safe and effective for the treatment of canine mast cell tumors. **Journal Veterinary Internal Medicine**, v. 22, n. 6, p. 1301–1309, 2008.

HOSMER, D. W. e LEMESHOW, S. **Applied Logistic Regression**. 2. ed. New York: Wiley, 2000, 320p

ISHIGURO, T.; KADOSAWA, T.; TAKAGI, S.; K.; KIM, G.; OHSAKI, T.; BOSNAKOVSKI, D.; OKUMURA, M.; FUJINAGA, T. Relationship of disease progression and plasma histamine concentrations in 11 dogs with mast cell tumors. **Journal of veterinary internal medicine**, v. 17, n. 2, p. 194–8, 2003.

ISOTANI, M; ISHIDA, N.; TOMINAGA, M.; TAMURA, K.; YAGIHARA, H.; OCHI, S.; KATO, R.; KOBAYASHI, T.; FUJITA, M.; FUJINO, Y.; SETOGUCHI, A.; ONO, K.; WASHIZU, T., BONKOBARA, M. Effect of tyrosine kinase inhibition by imatinib mesylate on mast cell tumors in dogs. **Journal Veterinary Internal Medicine**, v. 22, n. 4, p. 985–988, 2008.

KIRKWOOD, B. R. and STERNE, J. A. C **Essential medical statistics**. 2nd ed. Massachusetts: Blackwell Science, 2006. p.502.

KIUPEL, M; WEBSTER, J D; KANEENE, J B; MILLER, R; YUZBASİYAN-GURKAN, V. The use of KIT and tryptase expression patterns as prognostic tools for canine cutaneous mast cell tumors. **Veterinary pathology**, v. 41, n. 4, p. 371–7, 2004.

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

- KIUPEL, M.; WEBSTER, J.D.; BAILEY, K.L.; BEST, S.; DELAY, J.; DETRISAC, C.J.; FITZGERALD, S.D.; GAMBLE, D.; GINN, P.E.; GOLDSCHMIDT, M.H.; HENDRICK, M.J.; HOWERTH, E.W.; JANOVITZ, E.B.; LANGOHR, I.; LENZ, S.D.; LIPSCOMB, D.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 WEISBRODE, K.; YAGER, J.; HELLER, J.; MILLER, R.; 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.
- KOBAYASHI, M.; SUGISAKI, O.; ISHII, N.; YAMADA, O.; ITO, K.; KUROKI, S.; SASAKI, Y.; ONO, K.; WASHIZU, T.; BONKOBARA, M. Canine intestinal mast cell tumor with c-kit exon 8 mutation responsive to imatinib therapy. **The Veterinary Journal**, v. 193, n. 1, p. 264–7, 2012.
- KOBIE, K.; KAWABATA, M.; HIOKI, K.; TANAKA, A.; MATSUDA, H.; MORI, T.; MARUO, K. The tyrosine kinase inhibitor imatinib [STI571] induces regression of xenografted canine mast cell tumors in SCID mice. **Research in Veterinary Science**, v. 82, n. 2, p. 239–41, 2007.
- KRICK, E. L.; BILLINGS, A P.; SHOFER, F. S.; WATANABE, S.; SORENMO, K. U. Cytological lymph node evaluation in dogs with mast cell tumours: association with grade and survival. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 7, n. 2, p. 130–8, 2009.
- KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. **Robbins e Cotran – Patologia – bases patológicas das doenças**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. 1592p
- LARKIN MA, BLACKSHIELDS G, BROWN NP, CHENNA R, MCGETTIGAN PA, MCWILLIAM H, VALENTIN F, WALLACE IM, WILM A, LOPEZ R, THOMPSON JD, GIBSON TJ, HIGGINS DG. **Clustal W and Clustal X version 2.0. Bioinformatics**, 23; p. 2947-2948. 2007.
- LAVALLE, G. E.; CARNEIRO, R. A.; HORIZONTE, B. Punção aspirativa por agulha fina para diagnóstico de mastocitoma em cães **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 55, n. 4, p. 500-502, 2003.
- LETARD, S.; YANG, Y.; HANSSSENS, K.; PALMÉRINI, F.; LEVENTHAL, P.; GUÉRY, S.; MOUSSY, A.; KINET, J.; HERMINE, O.; DUBREUIL, P. Gain-of-function mutations in the extracellular domain of KIT are common in canine mast cell tumors. **Molecular Cancer Research**, v. 6, n. 7, p. 1137–45, 2008.
- LIPTAK, J. M.; PAGE, E. The Principles of Surgical Oncology : Surgery and Multimodality Therapy. **Compendium on Continuing Education for Veterinarians**, v. 3, n. 9, p. 1–14, 2009.

- 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, n. 4, p. 399–414, 1996.
- LONDON, C. A.; GALLI, S. J.; YUUKI, T.; HU, Z. Q.; HELFAND, S. C.; GEISLER, E. N. Spontaneous canine mast cell tumors express tandem duplications in the proto-oncogene c-kit. **Experimental Hematology**, v. 27, n. 4, p. 689–97, 1999.
- 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.
- LONDON, C. A. Kinase inhibitors in cancer therapy. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 2, n. 4, p. 177–93, 2004.
- LONDON, C. A. Tyrosine kinase inhibitors in veterinary medicine. **Topics in Companion Animal Medicine**, v. 24, n. 3, p. 106–12, 2009.
- LONDON, C. A.; MALPAS, P. B.; WOOD-FOLLIS, S. L.; BOUCHER, J. F.; RUSK, A. W.; ROSENBERG, M. P.; HENRY, C. J.; MITCHENER, K. L.; KLEIN, M. K.; HINTERMEISTER, J. G.; BERGMAN, P. J.; COUTO, G. C.; MAULDIN, G. N.; MICHELS, G. M. 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. 3856–65, 2009.
- LONDON, C. A. Signal Transduction and cancer. In: WITHROW, S.J.; MACEVEN, E. G. **Small animal clinical oncology**. 5 ed. Missouri: Elsevier, 2013. P 221 – 229
- LONDON, C.A.; THAMM, H. D. Mast Cell Tumors. In: WITHROW, S.J.; MACEVEN, E.G. **Small Animal Clinical Oncology**. 5 ed. Missouri: Elsevier, 2013. P 335 - 355.
- LORIGADOS, C. A. B.; MATERA, J. M.; MACEDO, T. R.; PINTO, C. B. C. F. Avaliação por tomografia computadorizada dos mastocitomas. **Veterinária e Zootecnia**, v. 19, n. 3, p. 10–12, 2012.
- LORIGADOS, C. A. B.; MATERA, J. M.; COPPI, A. A.; MACEDO, T. R.; LADD, F. V. L.; SOUZA, V. A. F. Tomografia computadorizada de mastocitomas em cães : avaliação pré e pós-tratamento quimioterápico. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 11, p. 1349–1356, 2013.
- MAGLENNON, G A.; MURPHY, S.; ADAMS, V.; MILLER, J.; SMITH, K.; BLUNDEN, A.; SCASE, T J. Association of Ki67 index with prognosis for intermediate-grade canine cutaneous mast cell tumours. **Veterinary and comparative oncology**, v. 6, n. 4, p. 268–74, 2008.
- MARCONATO, L.; BETTINI, G.; GIACOBONI, C.; ROMANELLI, G.; CESARI, A.; ZATELLI, A.; ZINI, E. Clinicopathological Features and Outcome for Dogs with Mast Cell Tumors and Bone Marrow Involvement. **Journal Veterinary Internal Medicine**, v. 22, n. 4, p. 1001–1007, 2008.

MARCONATO, L.; ZORZAN, E.; GIANTIN, M.; DI PALMA, S.; CANCEDDA, S.; DACASTO, M.; Concordance of c-kit mutational status in matched primary and metastatic cutaneous canine mast cell tumors at baseline. **Journal Of Veterinary Internal Medicine** v.28, n.2, p. 547-553, 2013.

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

MEDERLE, O.; MEDERLE, N.; BOCAN, E. V.; CEAUȘU, R.; RAICA, M. VEGF expression in dog mastocytoma. **Revista medico-chirurgicală a Societății de Medici și Naturaliști din Iași**, v. 114, n. 1, p. 185–8, 2010.

MELO, S. R.; COSTA-CASAGRANDE, T. A.; MATERA, J. M. Evaluation of Collection and Distribution of Samples for Histological , Stereological Analysis and Cell Culture of. Canine mast cell tumor. **Open Journal of Veterinary Medicine**, v. 2012, n. December, p. 216–224, 2012.

MELO, S. R. **Fatores prognósticos em mastocitoma canino : correlação entre parâmetros clínicos, histológicos, marcadores de proliferação e análise termográfica** . 2013. 95 f. Dissertação (Mestrado em Clínica Cirúrgica) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

MISDORP, W. Mast cell and canine mast cell tumours: a review. **The Veterinay Quartely**, v. 26, n. 4, p. 156-169, 2004.

MIYOSHI, N.; TOJO, E.; OISHI, A.; FUJIKI, M.; MISUMI, K.; SAKAMOTO, H.; KAMEYAMA, K.; SHIMIZU, T.; YASUDA, N. Immunohistochemical detection of P-glycoprotein (PGP) and multidrug resistance-associated protein (MRP) in canine cutaneous mast cell tumors. **The Journal Of Veterinary Medical**, v. 64, n. 6, p. 531–3, 2002.

MODIANO, J. F.; The Etiology of Cancer. In: WITHROW, S.J.; MACEVEN, E.G. **Small Animal Clinical Oncology**. 5 ed. Missouri: Elsevier, 2013. p 1 - 14.

MULLINS, M. N.; DERNELL, WILLIAM S; WITHROW, STEPHEN 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 with and without adjuvant treatment: 54 cases (1998-2004). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 228, n. 1, p. 91–5, 2006.

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, n. 9, p. 287–291, 2006.

NAKAICHI, M.; TAKESHITA, Y.; OKUDA, M.; NAKAMOTO, Y.; ITAMOTO, K.; UNE, S.; SASAKI, N.; KADOSAWA, T.; TAKAHASHI, T.; TAURA, Y. Expression of the MDR1 gene and P-glycoprotein in canine mast cell tumor cell lines. **The Journal Of Veterinary Medical Science**, v. 69, n. 2, p. 111–5, 2007.

NORTHRUP, N. C.; HARMON, B. G.; GIEGER, T. L.; BROWN, C.A.; CARMICHAEL, K. P.; GARCIA, A.; LATIMER, K. S.; MUNDAY, J. S.; RAKICH, P. M.; RICHEY, L. J.; STEDMAN, N. L.; CHENG, A.L.; HOWERTH, E. W. Variation among pathologists in histologic grading of canine cutaneous mast cell tumors. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 17, n. 3, p. 245–248, 2005.

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

OHMORI, K.; KAWARAI, S.; YASUDA, N.; TANAKA, A.; MATSUDA, H.; NISHIMURA, R.; SASAKI, N.; TSUJIMOTO, H.; MASUDA, K. Identification of c-kit mutations-independent neoplastic cell proliferation of canine mast cells. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 126, n. 1-2, p. 43–53, 2008b.

OGILVIE, G.K.; MOORE, A.S. Mast Cell Tumors. In: OGILVIE, G. K.; MOORE, A. S. **Managing the Veterinary Cancer Patient: a practice manual**. New Jersey: Veterinary Learning Systems 1995. p. 503-510.

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. **The Journal of Veterinary medical science** / the Japanese Society of Veterinary Science, v. 69, n. 11, p. 1117–21, 2007.

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

PATRUNO, R.; ARPAIA, N.; GADALETA, C D.; PASSANTINO, L.; ZIZZO, N.; MISINO, A.; LUCARELLI, N M.; CATINO, A.; VALERIO, P.; RIBATTI, D.; RANIERI, G. VEGF concentration from plasma-activated platelets rich correlates with microvascular density and grading in canine mast cell tumour spontaneous model. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 13, n. 3, p. 555–61, 2009

PREZIOSI, R.; MORINI, M.; SARLI, G. Expression of the kit protein (cd117) in primary cutaneous mast cell tumors of the dog. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 16, n. 6, p. 554–561, 2004.

RADIN, J. M.; WELLMAN, M.L. Granulopoiesis. In: WEISS, D. J.; WARDROP, K. J. **Schalm's Veterinary Hematology**. 6 ed. Iowa: Wiley- Blackwell , 2010. p. 43-49.

RASSNICK, K.; BAILEY, D. Efficacy of vinblastine for treatment of canine mast cell tumors. **Journal Veterinary Internal Medicine**, v. 22, n. 6, p. 1390–1396, 2008.

REBUZZI, L.; WILLMANN, M.; SONNECK, K.; GLEIXNER, K. V.; FLORIAN, S.; KONDO, R.; MAYERHOFER, M.; VALES, A.; GRUZE, A.; PICKL, W. F.; THALHAMMER, J. G.; VALENT, P. Detection of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptors Flt-1 and KDR in canine mastocytoma cells. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 115, n. 3-4, p. 320–33, 2007.

RECH, R. R.; GRAÇA, D. L.; KOMMER, G. D.; SALLIS, E.S.V.; RAFFI, M. B.; GARMATZ, S. L. Mastocitoma cutâneo canino. Estudo de 45 casos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.**, v. 56, n. 4, p. 441–448, 2004.

RIVA, F.; BRIZZOLA, S.; STEFANELLO, D.; CREMA, S.; TURIN, L. A study of mutations in the c-kit gene of 32 dogs with mastocytoma. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 17, n. 4, p. 385–388, 2005.

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

ROMANSIK, E. M.; REILLY, C. M.; KASS, P H; MOORE, P. F.; LONDON, C A. Mitotic index is predictive for survival for canine cutaneous mast cell tumors. **Veterinary Pathology**, v. 44, n. 3, p. 335–41, 2007.

ROSKOSKI, R. Structure and regulation of Kit protein-tyrosine kinase--the stem cell factor receptor. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 338, n. 3, p. 1307–15, 2005.

SAILASUTA, A.; KETPUN, D.;PIYAVIRIYAKUL, P.; THEERAWATANASIRIKUL, S.; THEEWASUTRAKUL, P.; RUNGSIIPAT, A. The Relevance of CD117-Immunocytochemistry Staining Patterns to Mutational Exon-11 in c-kit Detected by PCR from Fine-Needle Aspirated Canine Mast Cell Tumor Cells. **Veterinary Medicine International**, v. 2014, p. 1-8, 2014.

SCARPA, F.; SABATTINI, S.; MARCONATO, L.; CAPITANI, O.; MORINI, M.; BETTINI, G. Use of histologic margin evaluation to predict recurrence of cutaneous malignant tumors in dogs and cats after surgical excision. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 240, n. 10, p. 1181–7, 2012.

SCASE, T. J.; EDWARDS, D.; MILLER, J.; HENLEY, W.; SMITH, K.; BLUNDEN, A. Murphy, S. Canine mast cell tumors: correlation of apoptosis and proliferation markers with prognosis. **Journal of Veterinary Internal medicine**, v. 20, n. 1, p. 151–8, 2006

SÉGUIN, B.; LEIBMAN, N. F.; BREGAZZI, V. S. OGILVIE, G. K.; POWERS, B. E.; DERNELL, W. S.; FETTMAN, M. J.; WITHROW, S. J. Clinical outcome of dogs with grade-II mast cell tumors treated with surgery alone: 55 cases (1996-1999). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 218, n. 7, p. 1120–3, 2001.

SÉGUIN, B.; BESANCON, M .F.; MCCALLAN, J. L.; DEWE, L. L.; TENWOLDE, M C.; WONG, E K.; KENT, M S Recurrence rate, clinical outcome, and cellular proliferation indices as prognostic indicators after incomplete surgical excision of cutaneous grade II mast cell tumors: 28 dogs (1994-2002). **Journal of Veterinary Internal Medicine** v. 20, n. 4, p. 933–40, 2006.

SCHULTHEISS, P. C.; GARDINER, D. W.; RAO, S.; OLEA-POPELKA, F.; TUOHY, J. L. Association of histologic tumor characteristics and size of surgical margins with clinical outcome after surgical removal of cutaneous mast cell tumors in dogs.

Journal of the American Veterinary Medical Association, v. 238, n. 11, p. 1464–9, 2011.

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

SIMOES, J. P.; SCHONING, P.; BUTINE, M. Prognosis of canine mast cell tumors: a comparison of three methods. **Veterinary Pathology**, v. 31, n. 6, p. 637–47, 1994.

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

SOHAIB, S. A.; TURNER, B.; HANSON, J. A.; FARQUHARSON, M.; OLIVER, R. T.; REZNEK, R. H. CT assessment of tumour response to treatment: comparison of linear, cross-sectional and volumetric measures of tumour size. **The British journal of radiology**, v. 73, n. 875, p. 1178–84, 2000.

STACCHIOTTI, S.; COLLINI, P.; MESSINA, A.; MOROSI, C.; BARISELLA, M.; GRONCHI, A high-grade soft-tissue sarcomas: tumor response assessment—pilot study to assess the correlation between radiologic and pathologic response by using recist and choi criteria. **Radiology**, v. 251, n. 2, p. 447–456, 2009.

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

STREFEZZI, R. D. F.; XAVIER, J. G.; CATÃO-DIAS, J. L. Morphometry of canine cutaneous mast cell tumors. **Veterinary Pathology**, v. 40, n. 3, p. 268–75, 2003.

STREFEZZI, R. F. DE; 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, 2009.

STREFEZZI, R. F.; KLEEB, S. R.; XAVIER, J. G.; DIAS, J. L. C. Avaliação da proliferação celular como indicador prognóstico para mastocitomas cutâneos caninos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 7, p. 559–565, 2010.

SUEIRO, F. A. R.; DALECK, C. R.; ALESSI, A. C. Ultra-estrutura dos mastócitos de diferentes tipos histológicos de mastocitoma em cães. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 54, n.3, p.255-258. Jun. 2002 .

TAKEUCHI, Y.; FUJINO, Y.; FUKUSHIMA, K.; WATANABE, M.; NAKAGAWA, T.; OHNO, K.; SASAKI, N.; SUGANO, S.; TSUJIMOTO, H.; FUJINO, Y. Biological effect of tyrosine kinase inhibitors on three canine mast cell tumor cell lines with various KIT

statuses. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 35, n. 1, p. 97–104, 2011.

TAKEUCHI, Y.; FUJINO, Y.; WATANABE, M.; TAKAHASHI, M.; NAKAGAWA, T.; TAKEUCHI, A.; BONKOBARA, M.; KOBAYASHI, T.; OHNO, K.; UCHIDA, K.; ASANO, K.; NISHIMURA, R.; NAKAYAMA, H.; SUGANO, S.; OHASHI, Y.; TSUJIMOTO, H.. Validation of the prognostic value of histopathological grading or c-kit mutation in canine cutaneous mast cell tumours: a retrospective cohort study. **Veterinary Journal**, v. 196, n. 3, p. 492–8, 2013.

TENG, S.P.; HSU, W.-L.; CHIU, C.Y.; WONG, M.L.; CHANG, S.C. Overexpression of P-glycoprotein, STAT3, phospho-STAT3 and KIT in spontaneous canine cutaneous mast cell tumours before and after prednisolone treatment. **The Veterinary Journal**, v. 193, n. 1, p. 551–556, 2012

THAMM, D H; MAULDIN, E. A; VAIL, D. M. Prednisone and vinblastine chemotherapy for canine mast cell tumor--41 cases (1992-1997). **Journal Veterinary Internal Medicine**, v. 13, n. 5, p. 491–7, 1999.

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. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 68, n. 6, p. 581–7, 2006.

THOMPSON, J J.; YAGER, J A.; BEST, S J.; PEARL, D L.; COOMBER, B L.; TORRES, R N.; KIUPEL, M.; FOSTER, R A. Canine subcutaneous mast cell tumors: cellular proliferation and KIT expression as prognostic indices. **Veterinary Pathology**, v. 48, n. 1, p. 169–81, 2011.

TURIN, L.; ACOCELLA, F.; STEFANELLO, D.; OSELIERO, A.; FONDRINI, D.; BRIZZOLA, S.; RIVA, F. Expression of c-kit proto-oncogene in canine mastocytoma: a kinetic study using real-time polymerase chain reaction. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 18, n. 4, p. 343–349, 2006.

(VCOG), V. C. O. G. Veterinary cooperative oncology group - common terminology criteria for adverse events (VCOG-CTCAE) following chemotherapy or biological antineoplastic therapy in dogs and cats v1.1. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 5, p. 1–30, 2011.

VICKERY, K. R.; WILSON, H.; VAIL, D. M.; THAMM, D. H. Dose-escalating vinblastine for the treatment of canine mast cell tumour. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 6, n. 2, p. 111–9, 2008.

XIA, X.; Z. XIE. DAMBE: software package for data analysis in molecular biology and evolution." *J Hered*92(4): 371-373, 2001.

WALKER, A. R.; KOMROKJI, R. S.; IFTHIKHARUDDIN, J.; MESSINA, P.; MULFORD, D.; BECKER, M.; FRIEDBERG, J.; OLIVA, J.; PHILLIPS, G.; LIESVELD, J. L.; ABOUD, C. Phase I study of cladribine, cytarabine (Ara-C), granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) (CLAG Regimen) and simultaneous escalating

doses of imatinib mesylate (Gleevec) in relapsed/refractory AML. **Leukemia Research**, v. 32, n. 12, p. 1830–6, 2008.

WARLAND, J.; DOBSON, J. Breed predispositions in canine mast cell tumour: a single centre experience in the United Kingdom. **Veterinary Journal**, v. 197, n. 2, p. 496–8, 2013.

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 tumors. **Veterinary Pathology**, v. 41, n. 4, p. 371–7, 2004.

WEBSTER, J. D.; KIUPEL, M.; YUZBASIYAN-GURKAN, V. Evaluation of the kinase domain of c-KIT in canine cutaneous mast cell tumors. **BMC Cancer**, v. 6, n. 85, p. 1–8, 2006.

WEBSTER, J. D.; YUZBASIYAN-GURKAN, V.; KANEENE, J. B.; MILLER, R.; RESAU, J. H.; KIUPEL, M. The role of c-KIT in tumorigenesis: evaluation in canine cutaneous mast cell tumors. **Neoplasia**, v. 8, n. 2, p. 104–11, 2006.

WEBSTER, J. D.; YUZBASIYAN-GURKAN, V.; MILLER, R. A.; KANEENE, J. B.; KIUPEL, M. Cellular proliferation in canine cutaneous mast cell tumors: associations with c-KIT and its role in prognostication. **Veterinary Pathology**, v. 44, n. 3, p. 298–308, 2007

WEBSTER, J. D.; YUZBASIYAN-GURKAN, V.; THAMM, D. H.; HAMILTON, E.; KIUPEL, M. Evaluation of prognostic markers for canine mast cell tumors treated with vinblastine and prednisone. **BMC Veterinary Research**, v. 4, n. 32, p. 1–8, 2008.

WELLE, M. M.; BLEY, C. R.; HOWARD, J.; RÜFENACHT, S. Canine mast cell tumours: a review of the pathogenesis, clinical features, pathology and treatment. **Veterinary Dermatology**, v. 19, n. 6, p. 321–39, 2008.

YAMADA, O.; KOBAYASHI, M.; SUGISAKI, O.; ISHII, N.; ITO, K.; KUROKI, S.; SASAKI, Y.; ISOTANI, M.; ONO, K.; WASHIZU, T.; BONKOBARA, M. Imatinib elicited a favorable response in a dog with a mast cell tumor carrying a c-kit c.1523A>T mutation via suppression of constitutive KIT activation. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 142, n. 1-2, p. 101–6, 2011.

YANCEY, F.M.; ; MERRITT, D.A.; LESMAN, S.P.; BOUCHER, J.F.; MICHELS, G.M. Pharmacokinetic properties of toceranib phosphate (Palladia, SU11654), a novel tyrosine kinase inhibitor, in laboratory dogs and dogs with mast cell tumors. **Journal Veterinary. Pharmacol and Therapeutics**. v. 33, p.162–171, 2010.

ZANINI, A.; CRISTINA, K.; NISHIYA, T. UBUKATA, U.; LEANDRO, R. M.; BRITO, G. P.; TROMBETTI, M.; LAGOA, C.; MACEDO, T. M.; RODRIGUES, L. C. S.; ROSENDO, J. A. S.; ARNDTI, H.L.; DIAS, R. A.; DAGLI, M. L. Z. Environmental risk factors related to the development of canine non-Hodgkin's lymphoma. **Ciência Rural**, v. 43, n. 7, p.1302 – 1308, 2013

ZAVODOVSKAYA, R.; CHIEN, M. B.; LONDON, C. A. Use of kit internal tandem duplications to establish mast cell tumor clonality in 2 dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 18, n. 6, p. 915–7, 2004.

ZEMKE, D.; YAMINI, B.; YUZBASIYAN-GURKAN, V. Mutations in the Juxtamembrane Domain of c-KIT Are Associated with Higher Grade Mast Cell **Veterinary Pathology**, v. 39, n. 5, p. 529-535, 2002.