

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<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. 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 Virgínie 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: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Julia Maria Matera.

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

## 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 imunohistoquímica 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 imunomarcação 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.

## ***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, buscam-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.

***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 preenchem 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 hipotenuantes, 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 diagnóstico 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 tendência 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 sobrevivência dividindo os animais em 3 grupos: IM =0, IM entre 1 e 7 e IM > 7 e observaram que os animais com IM maior que 7 apresentavam prognóstico 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 homogênea 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 IMUNOHISTOQUÍMICA: 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 prever 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 conseqüentemente 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 conseqüentemente, 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/m<sup>2</sup>, 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<sup>o</sup> 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<sup>a</sup> sessão de quimioterapia e foi mantida até o termino do protocolo. Nestes estudo não foram



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

Os resultados encontrados nesta pesquisa também divergem dos observados 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 dose de 2 mg/m<sup>2</sup> 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 estudo.

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/m<sup>2</sup> em 26 cães com mastocitoma mensurável e chegaram a uma resposta de 27%, resposta está, superior a conseguida com a dose de 2mg/m<sup>2</sup>, mostrando que o aumento da dose, com mínimos efeitos colaterais, traz benefícios aos tratamentos do mastocitoma. Resultado semelhante foi observado por Vickery et al. (2008) ao utilizar a vimblastina de maneira escalonada nas doses de 2,33 mg/m<sup>2</sup>, 2,66 mg/m<sup>2</sup> e 3 mg/m<sup>2</sup> 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<sup>o</sup> e 5<sup>o</sup> 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 ± 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 desta 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<sup>o</sup> e 5<sup>o</sup> 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- $\alpha$  ou - $\beta$  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 MI. 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 influenciados 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 está 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 clinicas 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 destas alterações. 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 Clínicas 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.; BORGE, 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 Paracting 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.

- KIUEP, 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 Veterinay 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.; RUNGSIPIPAT, 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.