THAÍS ANDRADE COSTA CASAGRANDE

**Avaliação de indicadores de prognóstico para mastocitoma canino:
estudo clínico-cirúrgico, histológico, imunoistoquímico,
estereológico e de expressão gênica**

**São Paulo
2010**

THAÍS ANDRADE COSTA CASAGRANDE

**Avaliação de indicadores de prognóstico para mastocitoma canino:
estudo clínico-cirúrgico, histológico, imunoistoquímico, estereológico e
de expressão gênica**

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 Ciências.

Departamento:

Cirurgia

Área de concentração:

Clínica Cirúrgica Veterinária

Orientador:

Prof^a Dr^a. Julia Maria Matera

São Paulo

2010

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

BIBLIOTECA VIRGINIE BUFF D'ÁPICE
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA DA USP
21/5/10

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.2280
FMVZ

Costa-Casagrande, Thaís Andrade

Avaliação de indicadores de prognóstico para mastocitoma canino: estudo clínico-cirúrgico, histológico, imunoistoquímico, estereológico e de expressão gênica / Thaís Andrade Costa Casagrande. -- 2010.
179 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2010.

Programa de Pós-Graduação: Clínica Cirúrgica Veterinária.

Área de concentração: Clínica Cirúrgica Veterinária.

Orientador: Profa. Dra. Julia Maria Matera.

1. Tumor de mastócitos. 2. Graduação histopatológica. 3. C-kit. 4. Ki-67. 5. PCR em tempo real. I. Título.

ERRATA

Folha
Resumo

Parágrafo
1

Linha
2

Onde se lê
histopatológico

Leia-se
histológico

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Estudo clínico-cirúrgico, histopatológico, histoquímico, imunohistoquímico e molecular do mastocitoma canino", protocolado sob o nº1014/2006, utilizando animais atendidos na rotina do Hospital Veterinário da FMVZ/USP, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Júlia Maria Matera, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 12/12/06".

(We certify that the Research "Clinical-surgical, histologic, histochemical, immunohistochemical and molecular study of canine mast cell tumor", protocol number 1014/2006, under the responsibility of Profa. Dra. Júlia Maria Matera, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved in the meeting of the day 12/12/2006).

São Paulo, 13 de dezembro de 2006

Prof. Dr. José Luis Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: COSTA-CASAGRANDE, Thaís Andrade

Título: Avaliação de indicadores de prognóstico para mastocitoma canino: estudo clínico-cirúrgico, histológico, imunoistoquímico, estereológico e de expressão gênica

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

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Dedicatória

Dedico este trabalho ao meu amado esposo e companheiro
Ronaldo Vinicius Casagrande por sua enorme
paciência e apoio em todo este período que estivemos afastados.

Aos meus queridos pais Pedro Henrique Carpinetti Costa e
Iara Andrade Costa por ter dado oportunidade para que isso acontecesse,
Pelas vibrações com as conquistas e pelo e amor incondicional.

Aos meus tios queridos Francisco Luiz Telles de Castro e
Maria Eunice Costa Telles de Castro pelo abrigo, conforto,
conselhos, dedicação e carinho.

Às minhas amadas avós Maurina Ouriques Andrade e Elazir Carpinetti Costa (*in
memoriam*) por se orgulhar tanto de seus netos e por estarem sempre presentes,
mesmo que distante. Obrigada pela dedicação.

Sem vocês isso tudo não aconteceria. Amo muito todos vocês!

Agradecimentos

À minha querida orientadora e amiga Prof^a. Julia Maria Matera, pelo acompanhamento durante toda a pós-graduação, pela confiança, amizade, conselhos, cumplicidade e companheirismo. Por ter me aceito sem que me conhecesse direito. Muito obrigada pelo apoio e carinho.

Ao meu eterno preceptor Prof. Antônio Felipe Paulino de Figueiredo Wouk por ter me apresentado à Prof^a. Julia e por ter confiado em mim e em meu trabalho. Obrigada pela amizade e por esta enorme confiança.

Aos meus queridos amigos Luiz Felipe de Moraes Barros e Leda Marques de Oliveira Barros por sua amizade e abrigo. Vocês foram mais que amigos neste período. Obrigada por terem ficado ao meu lado em todos os momentos e por terem me acolhido desde o primeiro momento que cheguei a São Paulo. Leda, também agradeço por ter me escolhido para fazermos uma dupla dinâmica e sair nos aventurando em todas as áreas, do hospital aos laboratórios.

À minha amiga para todas as horas Thais Rodrigues Macedo por estar sempre comigo, inclusive nos momentos mais inusitados. Nossa amizade já vem de longa data e estes laços cada vez mais fortes. Obrigada por estar sempre comigo.

À Prof^a. Maria Lúcia Zaidan Dagli pelos conselhos e por ter cedido seu tempo e o espaço do Laboratório de Oncologia Comparada para o desenvolvimento deste trabalho. Obrigada pela confiança e apoio.

Ao Prof. Antônio Augusto Coppi Maciel Ribeiro pela oportunidade de processamento da estereologia no Laboratório de Estereologia, Estocástica e Anatomia Química (LSSA) e por ter cedido seus pós-graduandos para o desenvolvimento de parte desta pesquisa.

Aos amigos Olícius da Cunha e Diogo Gorayeb de Castro por sua amizade e carinho de todas as horas.

Aos amigos da pós-graduação Carolina Scarpa Carneiro, Ayne Hayashi Murata, Sam Goldy Shoyama Oda, Renata Domenico, Genilson Queiroz, Marcos Della Nina, Kelly Cristina Ito, Ewaldo Mattos Junior, Olicies da Cunha, Vanessa Couto, Tatiana Mariani, Daniela Izquierdo, Fernanda Auler pelo companheirismo, risadas e amizade em todas as horas.

Às amigas e médicas veterinárias do Serviço de Cirurgia de Pequenos Animais Tatiana Soares da Silva, Patrícia Ferreira Castro, Andressa Gianotti Campos Nitrini (e bebê), Viviane Galeazzi, Sandra Rosner pela confiança, pelos momentos de descontração e pela ajuda com os casos clínicos. Obrigada pela amizade.

Aos enfermeiros do Serviço de Cirurgia Cledson Lélis dos Santos, Jesus dos Anjos e Otávio Rodrigues dos Santos por sempre me acudirem em vários momentos e ajuda nas coletas de material.

Aos amigos do Laboratório de Oncologia Comparada, em especial ao Heidge Fukumasu, Lucas Chaible e Bruno Cogliati por toda a ajuda no desenvolvimento deste trabalho, pelas muitas horas de discussão sobre a pesquisa e assuntos mil. Também um agradecimento especial à Mirela Aline Real-Lima pelo companheirismo desde o início.

Aos amigos do Laboratório de Estereologia, Estocástica e Anatomia Química (LSSA), Aline, Andréia, Luciana, Silvio, Demilto, Eliane, Felipe, Tais, em especial ao Fernando Wagner Lobo Ladd, pela amizade e por ter enfrentado comigo todas as dificuldades e ajudado a superá-las.

À amiga Marguite Isaura de Sousa Silva por ter me ajudado muito com o processamento do material de imunoistoquímica em um período de grande sufoco.

Aos amigos de longa data Carolina Zaghi Cavalcante, Marciano Endges, e agora Olivia e Laura Endges pelo apoio de todas as horas e fraterna amizade.

Aos amigos da Abrovet Carolina Scarpa Carneiro, Maria Lúcia Zaidan Dagli, Tarso Felipe, Heidge Fukumasu, Andréia Latorre, Adriana Nishya, Kátia Kimura, Rodrigo Ubukata, Lucas Campos, Juliana Guerra, Marcelo Monte Mor por todo apoio e amizade.

À funcionária e às residentes do Serviço de Patologia do HOVET/USP, Luciana, Carolina, Carolina, Marina, Natália e Juliana por sempre estarem prontas para discussão dos casos e pelos diagnósticos histopatológicos.

Aos meus queridos irmãos Tatiana Andrade Costa e Thiago Andrade Costa por estarem sempre comigo e não pouparem esforços para ajudar a resolver minhas dificuldades em todos os momentos.

Aos meus amigos e cunhados Rosemar Casagrande Faust, Gláucio Faust, Renato Casagrande, Rodrigo Smeha de Oliveira e aos sobrinhos Ricardo e Rodrigo Casagrande Faust por ter entendido os momentos de ausência e pelas vibrações pelas conquistas.

À minha querida sogrinha Amélia Colombo Casagrande por estar sempre rezando para que tudo terminasse bem.

Às minhas primas Mariana e Juliana Telles de Castro por terem dividido seu espaço e a atenção de seus pais. Obrigada por ter cedido tudo isso com tanto carinho. Obrigada também ao Everton Motta e à Lyara Motta por tantos momentos de descontração. À Manuela Telles de Castro Motta por estar ingressando nesta linda família.

Aos amigos que fiz em São Paulo Samanta, João, Angélica, Flôr, Luciane, Paula, Kadhine, Bruna, Denise, Patrícia, Tatiana, e a todos os outros que não estão citados aqui, mas que fizeram parte de momentos muito importantes de minha vida.

Aos residentes do Hovet – USP Samanta, Renato, Cauê, Cleber, Fernanda, Ana Letícia, Laura, Fábio (Tesouro), Martha, Arine, Alexandre, Erick, e todos os outros que não estão citados pelas conversas e ajudas mil.

Aos demais professores da pós-graduação pela dedicação e por dado apoio em muitos momentos.

Aos secretários da pós-graduação Belarmino Ney Pereira e Alessandra Sousa por estarem sempre chamando atenção para as coisas importantes da pós-graduação, incluindo prazos. Obrigada pelas inúmeras vezes que me ajudaram durante todos estes anos.

Aos meus queridos pacientes e seus proprietários dedicados. Muito obrigada por fazerem parte desta trajetória e por me fornecer tantos ensinamentos. Sem vocês este trabalho não aconteceria.

Aos meus animais de estimação Isaac, Frida, Raiska, Meg e em especial à Duda, que inspirou o desenvolvimento desta tese. Obrigada por estarem sempre presentes e felizes.

Aos funcionários da biblioteca da FMVZ-USP, pela cordialidade rapidez no atendimento durante a realização deste trabalho.

À Fapesp por ter concedido bolsa no início do trabalho, projeto FAPESP nº 06/58610-5.

À CAPES pelo apoio financeiro com bolsa do meio para o final deste período.

"É melhor tentar e falhar, que preocupar-se e ver a vida passar.
É melhor tentar, ainda que em vão que sentar-se, fazendo nada até o final.
Eu prefiro na chuva caminhar, que em dias frios em casa me esconder.
Prefiro ser feliz embora louco, que em conformidade viver"
(Martin Luther King)

RESUMO

COSTA-CASAGRANDE, T. A. **Avaliação de indicadores de prognóstico do mastocitoma canino: estudo clínico-cirúrgico, histopatológico, estereológico, imunoistoquímico e de expressão gênica.** [Evaluation of prognostic factors of canine mast cell tumors: clinical-surgical, histopathological, stereological, immunohistochemical and genical expression study.]. 2010. 179 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

O objetivo deste trabalho foi avaliar os indicadores de prognóstico para o mastocitoma canino, na tentativa de melhorar o tratamento oferecido aos animais acometidos por esta neoplasia. Foram analisados os parâmetros clínicos dos animais e do mastocitoma, parâmetros de evolução da doença e parâmetros histológicos, imunoistoquímicos, estereológicos e de expressão gênica. Para isso, 81 cães portadores de mastocitoma cutâneo foram submetidos à intervenção cirúrgica para excisão dos tumores. Após a operação os cães foram acompanhados e avaliados por um período mínimo de 12 meses para a colheita de dados sobre a evolução. Os tumores foram graduados por histopatologia, tiveram seus bordos investigados quando a eficiência da cirurgia e foram submetidos à imunomarcagem com ki-67, *c-kit*. Destes, 20 casos passaram por avaliação estereológica, nos parâmetros volume total do tumor, densidade numérica, número total de mastócitos, volume de célula e de núcleo e a relação núcleo/célula. Além disso, 22 casos tiveram seus tumores quantificados quanto a expressão gênica de *c-kit* e do seu ligante. Os parâmetros clínicos avaliados foram: idade, sexo, raça, localização, tempo de evolução, tamanho do tumor, velocidade de crescimento, presença de ulceração, sangramento, eritema, temperatura, hiperpigmentação, consistência tumoral, base de inserção, abrangência de tecido, aderência a planos profundos, formato, superfície, presença de alopecia, número de tumores, além de investigar a presença de alteração em linfonodos, sinais clínicos e metástases e calcular a taxa de crescimento tumoral. Foram associados a piora do prognóstico os pacientes que apresentaram os parâmetros: animais idosos, presença de eritema, ulceração, aumento de temperatura, presença de aderência, superfície irregular, tumores firmes, crescimento rápido, presença de sinais clínicos e metástases. O diâmetro foi associado a maior taxa de óbito. As demais variáveis clínicas não foram associadas ao prognóstico. O grau histopatológico, a presença de sinais clínicos e metástase

foram considerados marcadores preditivos independentes de recidiva e óbito, pela análise multivariada. Na avaliação por estereologia, as variáveis: volume do tumor e número total de mastócitos neoplásicos também foram associados à redução de sobrevida livre de recidiva, assim como uma maior porcentagem de núcleos imunomarcados com ki-67. A diminuição da expressão do ligante de c-kit, também conhecido como fator de crescimento do c-kit também foi associado aos eventos combinados óbito e recidiva. Os resultados demonstraram que mesmo parâmetros clínicos, de fácil investigação fornecem dados para a interpretação dos mastocitomas de grau intermediário, podendo oferecer melhor tratamento aos animais acometidos. Os parâmetros laboratoriais como imunomarcção com ki-67, parâmetros estereológicos podem ajudar a estabelecer uma nova classificação destes tumores que ficam à margem de classificação. Porém, mais uma vez a graduação preconizada por Patnaik e al. (1984) se mostrou de grande eficiência na previsão da evolução dos mastocitomas. As expressões gênicas de c-kit e seu ligante e a expressão por imunomarcção de c-kit devem ser melhores avaliadas e comparadas a análises de mutação destes genes.

Palavras-chave: Tumor de mastócitos. Graduação histopatológica. Estereologia. C-kit. Ki-67. PCR em tempo real.

ABSTRACT

COSTA-CASAGRANDE, T. A. **Evaluation of prognostic factors of canine mast cell tumors: clinical-surgical, histopathological, stereological, immunohistochemical and genical expression study.** [Avaliação de indicadores de prognóstico do mastocitoma canino: estudo clínico-cirúrgico, histopatológico, estereológico, imunoistoquímico e de expressão gênica]. 2010. 179 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

The aim of this study was to evaluate prognostic markers for canine mast cell tumors to improve treatment options offered to animals affected by this cancer. We evaluated animals and clinical parameters of the tumors, parameters from clinical outcomes, and histological, immunohistochemical, stereological, and gene expression parameters. To this end, 81 dogs with cutaneous mast cell tumors underwent surgical excision of tumors. After surgery, the dogs were monitored and evaluated for a minimum of 12 months for the collection of outcome data. The tumors were graded histologically, had their surgical margins investigated regarding the efficacy of surgery, and were immunostained with Ki-67 and c-kit. Of these specimens, 20 cases underwent stereological assessment: total tumor volume, numerical density, total number of mast cells, cell and nucleus volume, and the nucleus/cell relationship were investigated. In addition, gene expression of c-kit and its ligand was measured in tumors from 22 cases. Examined clinical parameters included age, sex, breed, location, duration of evolution, tumor size, growth rate, presence of ulceration, bleeding, erythema, temperature, hyperpigmentation, tumor consistency, insertion base, range of tissues, adherence to deep levels, shape, surface, presence of alopecia, and number of tumors. We also investigated the presence of changes in lymph nodes, metastases, clinical signs and metastases. We observed that tumors with erythema, ulceration, increased temperature, adherence, irregular surface, solidity, rapid growth, presence of metastases and clinical signs were associated with worse prognostic. A larger tumor diameter was associated with a higher death rate. The other clinical variables were not associated with the prognosis. A multivariate analysis revealed that the histopathological grade and the presence of clinical signs and metastasis were independent predictive markers of the progression-free survival time. The stereological analysis indicated that a larger tumor volume, a larger total number of neoplastic mast cells, and a higher

percentage of nuclei immunostained for Ki-67 were also associated with a reduced survival time and a higher recurrence rate. The reduction of c-kit ligand expression, also called the growth factor c-kit, was also associated with the death and recurrence rates. Our results demonstrate that clinical parameters that are easy to determine can provide useful data for assessing intermediate-grade mast-cell tumors and thereby be useful in determining better treatments for affected animals. Stereological parameters and laboratory parameters such as immunostaining for Ki-67 could help to establish a new classification of those tumors that are at the margin of existing classifications. However, the histopathological classification established by Patnaik et al. (1984) proved very efficient in predicting the evolution of mast-cell tumors. The gene expressions of c-kit and its ligand, and the KIT immunostaining should be further evaluated and compared in order to analyze mutations in these genes.

Keywords: Mast-cell tumor, Histopathological grade, Stereology, C-kit, Ki-67, Real-time PCR.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Distribuição das taxas de mortalidade, relacionadas ou não aos mastocitomas, em função da graduação histopatológica proposta por Patnaik; Ehler; MacEwen. (1984). Porcentagens em relação aos totais de casos para cada grau histopatológico. FMVZ/USP–São Paulo-2006-2010.....	103
Tabela 2-	Valores dos parâmetros estereológicos avaliados em mastocitomas com diferentes graus histopatológicos - FMVZ/USP-São Paulo-2006-2010.....	105
Tabela 3-	Distribuição frequências de volume total do tumor em função de cada grau do histopatológico e distribuição das medianas e valores mínimo e máximo dos volumes totais dos mastocitomas para cada grau do histopatológico,segundo a classificação de Patnaik, Ehler e MacEwen (1984) – FMVZ/USP - São Paulo – 2006-2010.....	107
Tabela 4-	Distribuição frequências de densidade numérica em função de cada grau do histopatológico e distribuição das medianas e valores mínimo e máximo de densidade numérica para cada grau do histopatológico,segundo a classificação de Patnaik, Ehler; MacEwen (1984) – FMVZ/USP - São Paulo – 2006-2010.....	108
Tabela 5-	Distribuição frequências de número total de mastócitos em função de cada grau do histopatológico e distribuição das medianas e valores mínimo e máximo de número total de mastócitos para cada grau do histopatológico,segundo a classificação de Patnaik, Ehler; MacEwen (1984) – FMVZ/USP - São Paulo – 2006-2010.....	111
Tabela 6-	Distribuição frequências do volume médio dos mastócitos em função de cada grau do histopatológico e distribuição das médias e desvio padrão de dos volumes médios dos mastócitos para cada grau do histopatológico,segundo a classificação de Patnaik, Ehler; MacEwen (1984) – FMVZ/USP - São Paulo – 2006-2010.....	113
Tabela 7-	Distribuição frequências dos volume médios dos núcleos dos mastócitos em função de cada grau do histopatológico e distribuição das médias e desvio padrão dos volumes médios de núcleos dos mastóctios para cada grau do histopatológico,segundo a classificação de Patnaik, Ehler; MacEwen (1984) – FMVZ/USP - São Paulo – 2006-2010.....	114
Tabela 8-	Distribuição frequências dos volume médios dos núcleos dos mastócitos pelo método do PSI em função de cada grau do histopatológico e distribuição das médias e desvio padrão dos volumes médios de núcleos dos mastóctios pelo método do PSI para cada grau do histopatológico,segundo a classificação de Patnaik, Ehler; MacEwen (1984) – FMVZ/USP - São Paulo – 2006-2010.....	115

LISTA DE QUADROS

Tabela 9-	Distribuição frequências da relação do volume médios dos núcleos dos mastócitos pelo volume médio das células em função de cada grau do histopatológico e distribuição das médias e desvio padrão da relação dos volumes médios de núcleos dos mastócitos pelo volume médio das células para cada grau do histopatológico, segundo a classificação de Patnaik, Ehler; MacEwen (1984) – FMVZ/USP - São Paulo – 2006-2010.....	117
Tabela10-	Distribuição das taxas de mortalidade, relacionadas ou não aos mastocitomas, em função dos escores de ki-67 para a totalidade de animais acometidos por mastocitoma. Porcentagens em relação ao total de casos de cada marcação. FMVZ/USP - São Paulo – 2006-2010.....	119
Tabela11-	Distribuição das taxas de mortalidade, relacionadas ou não aos mastocitomas, em função dos padrões de marcação imunoistoquímica para KIT (segundo KIUPEL et al., 2004). Porcentagens em relação aos totais de casos para cada padrão de marcação. FMVZ/USP - São Paulo – 2006-2010.....	123
Tabela12-	Distribuição dos animais de acordo com registro no Laboratório de Oncologia Comparada (LOC - VPT) e de acordo com a expressão gênica do <i>c-kit</i> e do Ligante de <i>c-kit</i> . FMVZ/USP - São Paulo – 2006-2010.....	125
Tabela13-	Expressão gênica média de <i>c-kit</i> e do seu ligante de acordo com a classificação por padrão de marcação do KIT em imunoistoquímica. FMVZ/USP - São Paulo – 2006-2010.....	128
Tabela14-	Distribuição dos casos de mastocitoma em função da raça, idade, sexo, localização e número de formações, atendidos no Serviço de Cirurgia de Pequenos Animais – HOVET - FMVZ/USP - São Paulo, 2006-2010.....	176
Tabela15-	Distribuição dos casos de mastocitoma em função dos linfonodos acometidos observados durante o exame clínico, tempo de evolução, intervalo para recidiva, óbito, e tempo de sobrevivência, atendidos no Serviço de Cirurgia de Pequenos Animais – HOVET - FMVZ/USP - São Paulo, 2006-2010.....	178

LISTA DE QUADROS

Quadro 1-	Estadiamento clínico dos mastocitomas, segundo a Organização Mundial de Saúde.....	53
Quadro 2-	Classificação Histomorfológica de Patnaik, Ehler e MacEwen (1984)	55

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Fotomicrografia representando a seqüência de amostragem do tumor no qual se pode observar: O tumor já sem a pele e cápsula (A), preparando o tumor para o corte em fatias com o aparelho anti-tético <i>tissue slider</i> (2mm) (B), fatias do tumor em seqüência (C), fração das fatias amostradas (fatias 2, 5 e 8) (flecha branca) (D), cada fatia foi cortada em barras também com o <i>tissue slider</i> (2mm) (E), fração das barras amostradas (barra 2) (flecha branca) (F).....	76
Figura 2 -	Fotomicrografia representativa do método do <i>disector</i> óptico utilizado para contagem de células tumorais, onde se observa diferentes planos focais (A – E). Pode-se notar o aparecimento de mastócitos marcados com a letra “A”. Coloração Azul de Toluidina, escala de barra 10 µm.....	78
Figura 3 -	Fotomicrografia representativa do método do rotator planar vertical (seis linhas), sendo aplicado na célula (A) e no núcleo (B). Coloração de Azul de Toluidina, Escala de barra de 10µm.....	80
Figura 4 -	Fotomicrografia representativa do método do <i>Point Sample Intersection</i> (PSI), aplicado no núcleo do mastócito neoplásico. Coloração de Azul de Toluidina, escala de barra de 10µm.....	81
Figura 5 -	Curva de Kaplan-Meier de análise de sobrevida livre e recidiva dos casos estudados em função da faixa etária de forma dicotomizada, de 3 a 6 anos, de 6 a 9 anos e acima de 10 anos ($p=0,006$, teste de log rank), pontos=cesura à direita.....	91
Figura 6 -	Curva de Kaplan-Meier de análise de sobrevida livre de recidiva dos casos estudados em função do estadiamento clínico da neoplasia, sendo classificados de 0 a 4, de acordo com as normas da OMS ($p=0,002$, teste de log rank).....	93
Figura 7-	Curva de Kaplan-Meier de análise óbito dos casos estudados em função de ter ou não a presença de alterações nos linfonodos ($p=0,01$, teste de log rank), pontos=cesura à direita.....	93
Figura 8-	Curva de Kaplan-Meier de análise de sobrevida livre e recidiva dos casos estudados em função da presença de metástase: sim ou não ($p=0,006$, teste de log rank), pontos=cesura à direita.....	95
Figura 9-	Curva de Kaplan-Meier de análise de sobrevida livre e recidiva dos casos estudados em função da presença sinais clínicos sistêmicos: sim ou não ($p=0,033$, teste log rank). Pontos=censura à direita.....	95
Figura 10-	Curva de Kaplan-Meier da análise de sobrevida livre e recidiva	

	dos casos estudados em função da presença de sangramento: sim ou não ($p=0,031$, teste log-rank). Pontos= censura à direita.....	98
Figura 11-	Curva de Kaplan-Meier da análise de sobrevida livre e recidiva dos casos estudados em função da consistência da neoplasia: macia ou firme ($p=0,018$, teste log-rank). Pontos= censura à direita.....	98
Figura 12-	Curva de Kaplan-Meier da análise de sobrevida livre e recidiva dos casos estudados em função do tipo de superfície da neoplasia: lisa ou irregular ($p=0,029$, teste log-rank). Pontos= censura à direita.....	99
Figura 13-	Curva de Kaplan-Meier da análise de sobrevida livre e recidiva dos casos estudados em função da velocidade de crescimento: rápido, lento ou estável ($p=0,028$, teste log-rank). Pontos= censura à direita.....	99
Figura 14-	Curva de Kaplan-Meier de análise de sobrevida livre de recidiva dos casos estudados em função do tipo de aderência a planos profundos, sendo considerada: aderida, parcialmente aderida ou não aderida ($p=0,001$, teste log-rank). Pontos= censura à direita.....	100
Figura 15-	Curva de Kaplan-Meier de análise de sobrevida livre de recidiva dos casos estudados em função da presença de eritema: sim ou não ($p=0,035$ teste log-rank). Pontos=censura à direita.....	100
Figura 16-	Curva de Kaplan-Meier de análise de sobrevida livre de recidiva dos casos estudados em função da presença de ulceração: sim ou não ($p=0,011$, teste log-rank). Pontos=censura à direita.....	101
Figura 17-	Curva de Kaplan-Meier de análise de sobrevida livre de recidiva dos casos estudados em função da temperatura tumoral: aumentada ou normal ($p=0,000$, teste log-rank). Pontos= censura à direita.....	101
Figura 18-	Curva de Kaplan-Meier de análise do óbito dos casos estudados em função da dimensão da formação, sendo divididos em dois grupos: menor de três centímetros de diâmetro (<3 cm) ou maior de três centímetros de diâmetro (>3 cm) ($p=0,009$, teste log-rank). Pontos= censura à direita.....	102
Figura 19-	Curva de Kaplan-Meier de análise de sobrevida livre de recidiva dos casos estudados em função da classificação histopatológica (Patnaik et al. 1984), que divide em três graus I, II e III ($p=0,002$, teste de log rank). Pontos=censura à direita.....	104
Figura 20-	Curva de Kaplan-Meier de análise de sobrevida livre de recidiva dos casos estudados em função do volume total do tumor,	

	dicotomizado: 1000 mm ³ ; de 1000 a 10000 mm ³ e maior de 10000 mm ³ (p=0,025, teste de log rank). Pontos=censura à direita.....	106
Figura 21-	Distribuição da frequência dos diferentes volumes totais do tumor de acordo com os graus histopatológicos, sendo estes volumes distribuídos em três grupos: 0-1000mm ³ ; 1000-10000mm ³ e acima de 10000mm ³ (p=0,014; p<0,05; razão de verossimilhança) – FMVZ/USP-São Paulo–2006-2010.....	107
Figura22-	Distribuição dos diferentes densidade numérica de células de acordo com os graus histopatológicos, sendo estas densidades distribuídos em três grupos: 0-50000 mm ⁻³ ; 50000-150000 mm ⁻³ e acima de 150000 mm ⁻³ (p=0,895; p<0,05; razão de verossimilhança) – FMVZ/USP-São Paulo–2006-2010.....	109
Figura 23-	Curva de Kaplan-Meier de análise de sobrevida livre de recidiva dos casos estudados em função do número total de mastócitos do tumor, dicotomizado: até 1000000000 (10 ⁸); de 1000000000 a 100000000000 (10 ⁸ -10 ¹⁰) e maior de 100000000000 (10 ¹⁰) (p=0,029, teste de log rank). Pontos=censura à direita.....	110
Figura 24-	Distribuição do número total de mastócitos neoplásicos de acordo com os graus histopatológicos, sendo estes volumes distribuídos em três grupos: 0-100 (x10 ⁷); 100-1000 (x10 ⁷) e acima de 1000 (x10 ⁷) (p=0,001; p<0,05; razão de verossimilhança) – FMVZ/USP-São Paulo–2006-2010.....	111
Figura 25-	Distribuição do volume médio dos mastócitos neoplásicos de acordo com os graus histopatológicos, sendo estes volumes distribuídos em três grupos: 1-500µm ³ ; 500-700µm ³ e acima de 700µm ³ (p=0,897; p>0,05; razão de verossimilhança) – FMVZ/USP-São Paulo–2006-2010.....	113
Figura 26-	Distribuição do volume médio dos núcleos dos mastócitos neoplásicos de acordo com os graus histopatológicos, sendo estes volumes distribuídos em três grupos: 1-70µm ³ ; 70-100µm ³ e acima de 100µm ³ (p=0,003; p<0,05; razão de verossimilhança) – FMVZ/USP-São Paulo–2006-2010.....	114
Figura 27-	Distribuição do volume médio dos núcleos dos mastócitos neoplásicos pelo método do PSI de acordo com os graus histopatológicos, sendo estes volumes distribuídos em três grupos: 1-70µm ³ ; 70-100µm ³ e acima de 100µm ³ (p=0,101; p<0,05; razão de verossimilhança) – FMVZ/USP-São Paulo–2006-2010.....	116
Figura 28-	Distribuição da relação do volume médio do mastócito neoplásico pelo volume médio dos seus núcleos pelo método do Rotator de acordo com os graus histopatológicos, sendo estes volumes	

	distribuídos em três grupos: 0-0,15; 0,15-0,17 e acima de 0,17 (p=0,866; p>0,05; análise de variância) – FMVZ/USP-São Paulo–2006-2010.....	117
Figura 29-	Curva de Kaplan-Meier de análise de sobrevida livre de recidiva dos casos estudados em função da marcação por Ki-67, padrão ki-67<6,0% e Ki-67≥6,0% (p=0,002, teste de log-rank), pontos=censura à direita.....	119
Figura 30-	Distribuição dos grupos de ki-67 de acordo com os graus histopatológicos, sendo estes grupos divididos de acordo com a porcentagem de núcleos marcados com ki-67; ki-67<6,0%, ki-67≥6,0% (p=0,005; p<0,05; método de qui-quadrado) – FMVZ/USP-São Paulo–2006-2010.....	120
Figura 31-	Fotomicrografias da marcação imunoistoquímica com Ki-67, com contra-coloração por hematoxilina, sendo (A) com núcleos marcados em menos de 6,0% das células, e (B) as com mais de 6,0% dos núcleos marcados. As flechas indicam os núcleos positivos para Ki-67. Objetiva de 40x.....	121
Figura 32-	Distribuição dos grupos por padrão de marcação do KIT de acordo com os graus histopatológicos, sendo estes grupos divididos em KIT I; KIT II e KIT III de acordo com a distribuição da marcação (p=0,208; p>0,05; razão da verossimilhança) – FMVZ/USP-São Paulo–2006-2010.....	123
Figura 33-	Fotomicrografias dos padrões de marcação imunoistoquímica do KIT, com contracoloração com hematoxilina. (A), Padrão KIT I; (B), Padrão KIT II; (C), Padrão KIT III; objetiva de 40x.....	124
Figura 34-	Distribuição das expressões gênicas de <i>c-kit</i> em função da expressão do animal 53.....	126
Figura 35-	Distribuição das expressões gênicas do Ligante de <i>c-kit</i> em função da expressão do animal 53.....	126
Figura 36-	Curva de Kaplan-Meier de análise de sobrevida livre de recidiva dos casos estudados em função da expressão gênica do <i>c-kit</i> Ligante, sendo dicotomizado em função da média de expressão dos animais estudados, maior que 18 e menor que 18 (p=0,010, teste de log-rank), pontos=censura à direita.....	127

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Área de teste bidimensional imparcial usada para amostragem das partículas a serem contadas
AgNOR	Região Organizadora Nucleolar com afinidade pela prata
AL	Abdome lateral
B	Bolsa escrotal
C	Cabeça/pescoço
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CDK	Quinase ciclina-dependente
D	Densidade
Di	Dígito
DAB	Diaminobenzina
DEPC	Dietil Pirocarbonato
Dis	<i>Disector</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desorribonucleotídeo trifosfatado
DPX	Resina sintética
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ácido etilenodiaminotetraacético
F	Flanco
FMVZ/USP	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo
FcεRI	Receptores Fcε de alta afinidade
G1	Fase de crescimento 1
G2	Fase de crescimento 2
GIST	Tumor estromal gastrointestinal
Go	Fase de quiescência
H	Altura de cada <i>disector</i>
HE	Hematoxilina e Eosina
HOVET	Hospital Veterinário
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>
I/P	Inguinal/perineal

IgE	Imunoglobulina E
IV	Intravenoso
L	Lombar
LIG	Ligante do <i>c-kit</i>
l_n	Distância medida a partir de um ponto fixo da célula ou fora dela, até a borda arbitrariamente escolhida na mesma
l_o^3	Comprimento intersectado no núcleo elevado ao cubo
LSAB	<i>Labeled Streptavidin Biotin</i>
LSSCA	Laboratório de Estereologia Estocástica e Anatomia Química
M	Fase de mitose
Mb	Membros
N	Número total de mastócitos neoplásicos
N_p	Número de partículas contadas
NR	Óbito não relacionado ao tumor
N_v	Densidade numérica de mastócitos
OMS	Organização Mundial de Saúde
P	Peso
PBS	Fosfato-salino
PCNA	Antígeno Nuclear de Proliferação Celular
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PSI	<i>Point Sample Intersection</i>
Q^-	Número de partículas contadas em cada <i>disector</i>
R	Óbito relacionado ao tumor
RNA	Ácido ribonucleico
RNAse	Ribonuclease Recombinante
RNAse OUT	Inibidor de Ribonuclease Recombinante
Rpm	Rotações por minuto
S	Fase de síntese
SURS	<i>Systematic Uniform Random Sampling</i>
SCF	<i>Stem Cell Factor</i>
SCFR	Receptor de <i>Stem Cell Factor</i>
SID	Uma vez ao dia
SRD	Sem Raça Definida

T	Torácica
TNF – α	Fator de necrose tumoral alfa
$\bar{v}_N$ cel	Volume médio dos mastócitos
$\bar{v}_N$ núcleo	Volume médio do núcleo
VO	Via Oral
VPT	Departamento de Patologia Animal
Vref	Volume Referência

LISTA DE SÍMBOLOS

Cm	Centímetro
MG	Miligramma
G	Grama
Kg	Quilograma
MI	Mililitro
μl	Microlitro
m ²	Milímetro quadrado
Mm	Milímetro
mm ³	Milímetro cúbico
μm	Micrometro
μm ²	Micrometro quadrado
μm ³	Micrometro cúbico
mM	miliMol
%	Porcentagem
=	Igual
>	Maior
<	Menor
≥	Maior igual
≤	Menor igual
+	Positivo e/ou mais
-	Negativo e/ou menos
p (valor)	Valor da estatística p ou p – valor
Π	Pi
®	Marca registrada
Σ	Somatório
pH	Indicador ácido-básico
°C	Graus Celsius

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	27
2 OBJETIVOS	30
2.1 OBJETIVO GERAL	30
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
3 REVISÃO DE LITERATURA	32
3.1 MASTÓCITO	32
3.2 MASTOCITOMA.....	34
3.2.1 Incidência e Etiopatogenia	34
3.2.2 Comportamento Biológico e Metástases.....	38
3.2.3 Diagnóstico	40
3.2.4 Tratamento	43
3.2.5 Prognóstico.....	50
4 MATERIAIS E MÉTODOS	71
4.1 SELEÇÃO DOS ANIMAIS	71
4.2 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO	71
4.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	72
4.3.1 Procedimentos Clínicos Cirúrgicos Estabelecidos	72
4.3.2 Coleta do Material	73
4.4 PROCESSAMENTO E GRADUAÇÃO HISTOPATOLÓGICA	74
4.5 PROCEDIMENTOS ESTEREOLÓGICOS	75
4.5.1 Volume total do tumor (V_{ref}).....	77
4.5.2 Densidade numérica (N_v)	77
4.5.3 Número total de mastócitos (N).....	79
4.5.4 Volume médio dos mastócitos ($\bar{v}_N$ cell) e dos núcleos ($\bar{v}_N$ núcleo) pelo método do rotator planar vertical	79
4.5.5 Volume médio do núcleo dos mastócitos através do método do PSI ($\bar{v}_N$ PSI)	81
4.5.6 Relação do volume médio do núcleo pelo volume médio da célula ($\bar{v}_N$ núcleo/ $\bar{v}_N$ cel).....	82
4.6 PROCEDIMENTOS IMUNOISTOQUÍMICOS	82
4.6.1 Avaliação da Atividade Proliferativa: Ki-67	83
4.6.2 Avaliação da Expressão de KIT	84
4.7.1 Avaliação da Expressão do KIT e do Ligante por PCR em Tempo Real....	85
4.8 EVOLUÇÃO DOS CASOS CLÍNICOS.....	87
4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA	87
5 RESULTADOS.....	90
5.1 CASOS CLÍNICOS.....	90
5.2 EVOLUÇÃO DOS CASOS CLÍNICOS.....	92

5.3 GRADUAÇÃO HISTOPATOLÓGICA	102
5.4 PROCEDIMENTOS ESTEREOLÓGICOS	104
5.4.1 Volume total do tumor (V_{ref}).....	105
5.4.2 Densidade Numérica (N_v).....	108
5.4.3 Número total de mastócitos (N).....	109
5.4.4 Volume médio dos mastócitos ($\bar{v}_N$ cel) e dos núcleos ($\bar{v}_N$ núcleo) pelo método do rotator planar vertical	112
5.4.5 Volume médio dos núcleos dos mastócitos neoplásicos pelo método do PSI ($\bar{v}_N$ núcleo PSI).....	115
5.4.6 Relação do volume médio do núcleo pelo volume médio da célula pelo método do rotator planar vertical ($\bar{v}_N$ núcleo/ $\bar{v}_N$ cel).....	116
5.5 MARCADORES IMUNOISTOQUÍMICOS	118
5.5.1 Marcadores de Ciclo Celular – Ki-67.....	118
5.5.2 Expressão do KIT.....	122
5.6 EXPRESSÃO DO KIT POR PCR EM TEMPO REAL.....	125
6 DISCUSSÃO	130
6.1 CASOS CLÍNICOS.....	131
6.2 – EVOLUÇÃO DOS CASOS CLÍNICOS	134
6.3 GRADUAÇÃO HISTOPATOLÓGICA	143
6.4 PROCEDIMENTOS ESTEREOLÓGICOS	145
6.5 MARCADORES IMUNOISTOQUÍMICOS	148
6.6 EXPRESSÃO GÊNICA DO KIT POR PCR EM TEMPO REAL	152
6.7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	153
7 CONCLUSÕES	157
REFERÊNCIAS	159
APÊNDICE A.....	176
APÊNDICE B.....	178

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A prevalência das neoplasias entre os animais de estimação tem aumentado consideravelmente em decorrência de sobrevida mais longa desses animais (LAVALLE; ARAÚJO; CARNEIRO, 2003). Dentre as neoplasias cutâneas com maior frequência em cães está o mastocitoma compreendendo cerca de sete a 21% dos tumores cutâneos e 11 a 27% das neoplasias malignas (MACY, 1985) e segundo Thamm e Vail (2007) 16 a 21% das neoplasias cutâneas. São tumores potencialmente malignos, com alto poder metastático. Sua graduação é realizada geralmente por aspectos histomorfológicos, baseados na sua malignidade. Esta graduação é utilizada para direcionamento da conduta terapêutica dos animais portadores dessa neoplasia (THAMM; VAIL, 2007).

Apesar de ser um dos tumores cutâneos mais frequentes em cães, permanecem alguns dilemas causados pelo comportamento biológico altamente imprevisível, sendo que algumas neoplasias possuem comportamento benigno, enquanto outros são agressivos e possuem alto potencial metastático (ISHIGURO et al., 2001). Algumas tentativas de previsão do prognóstico do mastocitoma foram realizadas, utilizando critérios como estadiamento clínico, taxa de crescimento tumoral (THAMM; VAIL, 2007), atividade proliferativa (SIMOES et al., 1994) e grau histopatológico (PATNAIK et al., 1984), porém apenas o grau histopatológico consegue ter um parâmetro preditivo para esta neoplasia. No entanto, esta classificação não consegue prever de forma adequada o comportamento biológico das neoplasias de grau intermediário, que se encontram à margem das duas classificações. Este tipo de comportamento leva a falhas de tratamentos (PREZIOSI et al., 2004).

Devido a pouca compreensão do mastocitoma canino, principalmente relacionado aos tumores de grau intermediário de diferenciação, o presente estudo buscou informações sobre o comportamento desta neoplasia, e esclarecer as principais dúvidas e complicações frequentemente associadas e, assim, fornecer subsídios para instituição de regimes terapêuticos específicos, ofertando prognóstico mais preciso.

Na tentativa de encontrar outras formas de prever o prognóstico de cães com quadro clínico de mastocitoma cutâneo, novos indicadores estão sendo testados por

diversos pesquisadores. O objetivo desta pesquisa foi a investigação de indicadores de prognóstico de cães com mastocitoma cutâneo por meio de técnicas já conhecidas e outras que ainda não foram testadas para essa neoplasia. As ferramentas utilizadas para correlacionar com o prognóstico foram graus histológicos; estadiamento clínico da neoplasia; grau de proliferação celular, pela detecção de células marcadas com Ki-67 por imunohistoquímica; expressão da proteína do KIT por imunohistoquímica e expressão da proteína KIT e do seu ligante por reação em cadeia da polimerase em tempo real; avaliação estereológica do mastocitoma, sendo utilizados os parâmetros: volume total do tumor (V_{ref}), densidade numérica (N_v), número total de mastócitos neoplásicos (N), volume médio celular do mastócito neoplásico ($V_n \text{ cell}$), volume médio dos núcleos ($V_n \text{ núcleo}$) e a relação núcleo/célula ($V_n \text{ núcleo}/V_n \text{ cell}$).

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar de forma prospectiva a eficácia de parâmetros como dados clínicos, histológicos, estereológicos, marcadores celulares e expressão genética de alguns genes como potenciais indicadores de prognóstico em cães com mastocitoma canino.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1 – Determinar as características clínicas do paciente e de cada tumor;
- 2 – Determinar o estadiamento clínico de cada paciente;
- 3 – Determinar o grau histopatológico dos tumores apresentados;
- 4- Determinar a localização da expressão do KIT, através de avaliação imunoistoquímica, e graduá-lo;
- 5 – Determinar a quantidade de núcleos marcados com ki-67 por imunoistoquímica;
- 6 – Determinar a expressão gênica de c-kit e do Ligante de c-kit por PCR em tempo real;
- 7 – Determinar os parâmetros estereológicos: o volume total do tumor, a densidade numérica, o número total de mastócitos neoplásicos, o volume médio celular do mastócito neoplásico, o volume médio destes núcleos e a relação núcleo/célula e confrontá-los com o tempo de sobrevida, e tempo de recidiva e óbito;
- 8 – Associar estas variáveis com o tempo livre de recidiva e óbito, para uma análise de sobrevida, e verificar sua importância nesta associação.

REVISÃO DE LITERATURA

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 MASTÓCITO

Os mastócitos são células que compõem o tecido conjuntivo, distribuídos também nos tecidos e órgãos de várias espécies, incluindo pulmões, mucosa gástrica, derme, região perivascular e ocasionalmente a medula óssea (LAVALLE; CARNEIRO; PEREIRA, 2003). A sua distribuição varia de acordo com a espécie animal, aumentando em número conforme a idade. Sua origem é hematopoiética, sendo provenientes de CD34(+) *stem cells*, CD13(+) e CD117(+) (também conhecido como KIT) na medula óssea, circulam como precursor de células imaturas no sangue periférico e invadem o tecido conectivo quando adquirem seu fenótipo maduro e terminam a sua diferenciação sobre a influência de fatores do micro-ambiente do tecido e participam da regulação das respostas imunes adaptativas (ORDEIX et al., 2001; GILFILLAN; TKACZYK, 2006).

Os mastócitos possuem longa vida, de aproximadamente seis meses no tecido conjuntivo, mantendo capacidade de proliferação após maturação (RECH et al., 2004, TIZARD, 2009). As citocinas que promovem a proliferação de mastócitos e/ou maturação são a interleucina 3, que é importante na proliferação precoce dos mastócitos, enquanto o *stem cell factor* (SCF), que se liga ao receptor de SCF (*c-kit*), atua na manutenção da viabilidade do mastócito e promove a sua maturação (ORDEIX et al., 2001). Após a maturação estas células estão prontas para contribuir para os mecanismos de defesa do organismo, que estão associados com imunidade inata (GILFILLAN; TKACZYK, 2006, TIZARD, 2009).

Os mastócitos são células pleomórficas à avaliação histológica. Apresentam núcleo redondo e possuem grânulos citoplasmáticos que contêm proteoglicanos ácidos, os quais se ligam aos corantes básicos. Alguns destes corantes, como os do tipo Romanowsky, assumem uma coloração diferente quando se ligam aos grânulos do que quando ao DNA nuclear, sendo então chamados “metacromáticos”. Os mastócitos neoplásicos também contêm grânulos, os quais podem variar em número e conteúdo de acordo com o grau de diferenciação (O’KEEFE, 1990).

O mecanismo pelo qual a quantidade de mastócitos é regulada nos tecidos não é conhecido, mesmo o mecanismo de acúmulo de mastócitos sob algumas condições patológicas. Os mastócitos maduros geralmente se apresentam com grânulos citoplasmáticos que contêm substâncias biologicamente ativas como histamina, heparina, serotonina, fatores quimiotáticos, enzimas proteolíticas, metabólitos do ácido aracdônico, conferindo aos mastócitos um papel importante nas reações imunológicas, inflamatórias e alérgicas (RECH et al., 2004; GIEGER et al., 2005; TURIN et al., 2006; WELLE et al., 2008). A neoplasia composta por mastócitos é conhecida por mastocitoma, ou sarcoma dos mastócitos (LAVALLE; CARNEIRO; PEREIRA; 2003).

Os basófilos compartilham numerosas semelhanças com os mastócitos, tanto tintoriais quanto em componentes de grânulos. Este tipo celular também possui receptores $Fc\epsilon$ de alta afinidade ($Fc\epsilon RI$), podendo ser ativados por ligação de antígeno à IgE. Porém, deve ser considerado um tipo celular distinto, pois se diferenciam na medula óssea e circulam em sua forma madura. Como outros granulócitos, só emigram dos vasos em direção aos tecidos quando recrutados para locais de inflamação. Assim como os neutrófilos, expressam numerosas moléculas de adesão importantes à aderência ao endotélio e diapedese, como LFA-1 (CD11aCD18), Mac-1 (CD11bCD18) e CD44 (MISDORP, 2004).

A ativação dos mastócitos resulta em três tipos de respostas biológicas: (1) a desgranulação, na qual o conteúdo pré-formado de seus grânulos é liberado por exocitose; (2) a síntese de mediadores químicos derivados de membranas celulares, como os metabólitos do ácido aracdônico; e (3) a transcrição, tradução e secreção de citocinas. A desgranulação pode ser desencadeada por estímulos físicos, químicos, neurológicos e imunológicos (ABBAS; LICHMAN; POBER, 2000). As substâncias liberadas provocam vasodilatação, aumento de permeabilidade vascular, contração de células musculares lisas, secreção de muco, quimiotaxia de neutrófilos e eosinófilos, prurido, anticoagulação e destruição tecidual. São também capazes de produzir leucotrienos e $TNF-\alpha$, quando ativados por anticorpos como IgE. Após a desgranulação possuem membrana citoplasmática em excesso, pela fusão de membrana de grânulos (GILFILLAN; TKACZYK, 2006; TIZARD, 2009).

Em cães, as principais doenças relacionadas com os mastócitos são as reações de hipersensibilidade tipo I, local e sistêmica e os mastocitomas (CULLEN; PAGE; MISDORP, 2002; TIZARD, 2009).

3.2 MASTOCITOMA

3.2.1 Incidência e Etiopatogenia

O mastocitoma é uma neoplasia de células redondas, com idade média de ocorrência de oito a nove anos (PATNAIK et al., 1984), não havendo predisposição sexual observada. As raças mais predispostas são Boxer, Boston Terrier, Bull Terrier, Labrador Retriever, Golden Retriever, Fox Terrier, Beagle, Schnauzer, Sharpei, Pugs, Bull Mastiff, Cocker Spaniel, Staffordshire terrier, Fox terrier, Bulldog Inglês, Dachshund, Schnauzer, Rhodesian Ridgebacks e cães sem raça definida (PATNAIK et al., 1984; SIMOES et al., 1994; GOLDSCHIMIDT; HENDRICK, 2002; SÉGUIN, 2003; STREFEZZI et al., 2003; MISDORP, 2004; RECH et al., 2004, WELLE et al., 2008).

Costa-Casagrande et al. (2008) referem a ocorrência de 540 casos de mastocitoma, entre os 3193 casos de neoplasias atendidos no Serviço de Cirurgia de Pequenos Animais do HOVET/FMVZ/USP, no período de janeiro de 2000 a dezembro de 2007. Dos animais estudados, 38,84% dos animais eram da raça Boxer, 26,15% animais sem raça definida e o restante 35,01% animais de outras raças.

Os mastocitomas, geralmente, são tumores pequenos, firmes e bem circunscritos, podendo ser eritematosos, alopecicos e/ou ulcerados, formando nódulos ou placas (GOLDSCHIMIDT; HENDRICK, 2002). Podem também se apresentar pobremente definidos, macios e como lesões flutuantes, assemelhando-se a outros tumores, como lipoma, por exemplo. Outras vezes pode ser grande,

difuso, envolver outros órgãos (LAVALLE; ARAÚJO; CARNEIRO, 2003). Os principais locais de ocorrência são a derme e o subcutâneo, sendo raras as manifestações em outros locais, apesar da abundância de mastócitos no trato respiratório e gastrointestinal de cães (LONDON; SÉGUIN, 2003). Na maioria dos casos as formações são solitárias, mas mastocitomas cutâneos múltiplos são relatados entre 5 e 25% dos pacientes. Não está claro se os tumores múltiplos são metástases ou possuem origem multicêntrica (TURIN et al., 2006). As raças mais predispostas a desenvolverem mastocitomas múltiplos são os Boxers, Pugs, Weimaraners, Golden Retrievers e Shar-peis. (PATNAIK et al., 1984; GOLDSCHMIT; HENDRICK, 2002).

Esta neoplasia já foi descrita em diversas regiões do corpo do animal, sendo os localizados em região prepucial, inguinal e perineal os que apresentam maior malignidade (OGILVIE; MOORE, 1995). Na maioria das ocasiões os tumores viscerais são precedidos por tumores cutâneos indiferenciados, representando disseminação tumoral (THAMM; VAIL, 2007). A ocorrência de leucemia primária de mastócitos é rara, sendo mais comum a secundária em decorrência de disseminação sistêmica (LONDON; SÉGUIN, 2003).

Dentre as lesões cutâneas, as regiões mais afetadas são: o tronco e períneo, em 50 a 63% dos casos; extremidades, 33 a 40%; cabeça e pescoço, 10 a 15%. Lesões múltiplas são observadas em 3 a 14% dos casos (SIMOES et al., 1994; ABADIE et al., 1999; LONDON; SÉGUIN, 2003).

A etiopatogenia e os eventos moleculares e genéticos que contribuem para a tumorigênese durante o desenvolvimento e progressão dos tumores ainda não estão bem elucidados, acreditando-se na existência de origem multifatorial (THAMM; VAIL, 2007). Dentre as etiologias propostas, foi sugerido que a inflamação cutânea crônica pode levar ao desenvolvimento de mastocitoma. No entanto, apenas raros casos de mastocitoma estão associados a dermatite crônica, feridas crônicas ou aplicação de substâncias irritantes (GOVIER, 2003). Outros estudos sugerem a possibilidade de causa hereditária e/ou viral associados a inflamação crônica, por sua capacidade de ser transplantado para outros cães imunocomprometidos (cães de experimentação) por extratos celulares, porém partículas virais não foram demonstradas ultraestruturalmente, não havendo evidência do vírus, o que não sustenta essa etiologia (MISDORP, 2004). A transmissão hereditária de seqüências

de genes predispondo a esta neoplasia foi evidenciado nas raças descendentes do Bulldog, sendo observada uma fragilidade cromossômica, com instabilidade nos cromossomos 3, 4 e 15, mas essas alterações foram interpretadas como conseqüências da idade avançada dos animais, e não uma síndrome racial específica ou doença familiar (GINN et al., 2000). O desenvolvimento do tumor provavelmente dependa de outros fatores, como agente carcinogênico ou vírus (MACY, 1985).

Algumas pesquisas apontam alterações nos receptores de estrógeno e progesterona como um dos possíveis fatores de risco para mastocitoma, porém ainda sem completo entendimento na etiopatogênese do tumor, entretanto alguns estudos apontam uma influência destes hormônios na função dos mastócitos (ELLING; UNGEMACH, 1982), o que não foi confirmado por Gerritsen et al. (1998) que não encontrou diferenças de expressão dos receptores de estrógeno e progesterona nestes animais.

Quanto a patogenia, as alterações genéticas que predispõe o animal ao mastocitoma não são completamente entendidas. Alterações no gene supressor da apoptose P53 foi identificada em alguns mastocitomas, mas o seqüenciamento em um número limitado de casos têm não revelaram mutação (GINN et al., 2000; JAFFE et al., 2000; WU; HAYASHI; INOUE, 2004). Alterações na expressão das proteínas P21 e P27, inibidores de ciclina dependentes que contribuem para regulação do ciclo celular têm sido identificados em muitos mastocitomas caninos, podendo ser responsáveis pelo aumento do número de mastócitos por não permitir que estas células entrem em apoptose (WU; HAYASHI; INOUE, 2004).

Estudos recentes demonstram anormalidades no receptor de *stem cell factor* (SCF), KIT (LONDON et al., 1996; WU; HAYASHI; INOUE, 2004; WELLE et al., 2008). O KIT é um receptor de fator de crescimento localizado na membrana da célula, normalmente expresso nos mastócitos, e codificado para o proto-oncogene *c-kit*. Dois mecanismos têm sido propostos para a proliferação dos mastócitos: uma seria a ligação dependente e a outra uma ligação independente. Pouco se sabe a respeito do mecanismo ligante dependente em mastocitomas, porém para o mecanismo ligante independente está associado a dois tipos de alterações. Um é a alteração do sequenciamento do gene do *c-kit* (CD117) dentro do domínio da justamembrana do domínio conduzindo a sinalização constitutiva ou amplificada do

KIT, o qual definitivamente resulta em uma proliferação e sobrevivência aberrante destas células que expressam estas mutações (ZAVODOVSKAYA et al., 2004) e desenvolvimento da neoplasia. O segundo mecanismo é explicado por uma super-expressão do *c-kit* induzindo um aumento constante dos níveis dos receptores KIT ativado (RIVA et al., 2005; TURIN et al., 2006). O ligante específico para o receptor KIT (também conhecido como SCFR, do inglês “*stem cell factor receptor*”) é o SCF, uma citocina que, entre outras funções, se liga no domínio extracelular causando dimerização do receptor, o qual induz a autofosforilação do domínio cinase e inicia a respostas biológicas múltiplas sinalizando as vias (proliferação, migração, diferenciação dos mastócitos para a sobrevivência e ativação celular, as *stem cells* hematopoiéticas, as células germinativas, e os melanócitos) (WALTER, 2001; OZAKI et al., 2002; ZAVODOVSKAYA et al., 2004; TURIN et al., 2006).

A principal mutação encontrada foi a duplicação (ITD-Internal Tandem Duplication), porém podem haver também deleções e mutações pontuais do domínio justamembrânico de KIT, principalmente encontradas no exon 11, intron 11 e exon 12 (LONDON et al., 1999). Isso pode explicar o crescimento descontrolado dos tumores e a relação positiva das duplicações ou deleções com a malignidade do mastocitoma (LONDON et al., 1996; ZEMKE et al., 2002). A mutação no exon 11, consistindo em duplicações cooperativas internas foi identificada em 30 a 50% dos mastocitomas canino grau II e III. A observação da presença da mutação no proto-oncogene do *c-kit* do mastocitoma pode ser utilizada como marcador para determinar a origem molecular dos múltiplos tumores (ZAVODOVSKAYA et al., 2004). Como o *c-kit* é expresso em células hematopoiéticas e mastócitos, mas não em histiócitos e melanócitos, tem sido utilizado como marcador imunoistoquímico para mastocitomas e também relacionadas com o prognóstico do animal (LONDON et al., 1996, KIUPEL et al., 2004).

3.2.2 Comportamento Biológico e Metástases

O comportamento biológico dos mastocitomas é extremamente variável, fazendo com que clínicos e cirurgiões os considerem como neoplasias potencialmente malignas (O'KEEFE, 1990; SIMOES et al., 1994).

Os tumores bem diferenciados possuem comportamento geralmente benigno, com longo tempo de evolução, sem sinais clínicos sistêmicos. Os indiferenciados geralmente evoluem mais rapidamente, podendo haver sinais sistêmicos, isolados ou múltiplos, havendo maior predisposição a metástases; estes frequentemente apresentam edema peritumoral, ulceração tumoral e eritema, podendo haver prurido local, com histórico de lambedura (GIEGER et al., 2005). Ocasionalmente, manipulação mecânica durante o exame do tumor pode resultar em degranulação do tumor e subsequente eritema e edema no tecido ao redor. Este fenômeno é conhecido como sinal de Darier. As formações de grau intermediário podem assumir comportamento dos tumores diferenciados ou indiferenciados (THAMM; VAIL, 2007).

As complicações relacionadas ao mastocitoma geralmente são secundárias a degranulação e liberação de substâncias ativas, como a heparina, histamina, fator quimiotático do eosinófilo, enzimas proteolíticas e serotonina (GOLDSCHIMDT; HENDRICK, 2002).

Das síndromes paraneoplásicas uma das mais comuns é a ulceração gastrointestinal, que raramente pode evoluir para perfuração. A ulceração gástrica pode causar anorexia, emese, hematoquezia, melena, anemia, dor abdominal e em alguns casos perfuração gástrica ou intestinal e peritonite (GLEIXNER et al., 2007). As ulcerações mais comuns são em estômago e mais raramente em duodeno, compreendendo cerca de 25% a 83% dos casos necropsiados (GOLDSCHIMDT; HENDRICK, 2002; SUEIRO et al., 2002). A hipótese mais aceita para explicar o aparecimento destas lesões é a de que a histamina liberada pelos mastócitos provocaria lesões endoteliais levando à liberação de fibrolisina e à lesão na vasculatura da submucosa gástrica, com consequente trombose e infarto nestas áreas (O'KEEFE, 1990). A maior parte das ulcerações que ocorrem no piloro ou duodeno anterior acontece pela diminuição da produção de muco nestas áreas. A

histamina liberada pelos grânulos do mastócito atua nas células parietais via receptor H_2 , resultando em um aumento da secreção de ácido clorídrico (GOLDSCHMIDT; HENDRICK, 2002; SUEIRO et al., 2002).

A concentração de histamina plasmática está geralmente aumentada em cães com mastocitoma. Estes cães mantêm a concentração de gastrina baixa, apesar do aumento da histamina, não ocorrendo o *feed-back* negativo. A concentração plasmática de histamina e gastrina não estão relacionadas com o grau histológico, estadiamento, volume do tumor (FOX et al., 1990; ISHIGURO et al., 2003). A liberação de substâncias como histamina e serotonina pode provocar maior permeabilidade vascular pela vasodilatação e contração das células endoteliais predispondo a infecções sistêmicas variadas (MATSUDA et al., 2009).

Outra complicação pode ocorrer durante a intervenção cirúrgica quando há excesso de desgranulação de histamina e outras substâncias vasoativas, o que pode resultar em uma hipotensão rebote, podendo evoluir para o choque, e trombocitopenias por coagulação intravascular disseminada. A liberação de heparina pelas células neoplásicas leva a uma alteração no tempo de coagulação, podendo ser observado principalmente durante o ato operatório e no pós-operatório imediato. A dificuldade de cicatrização de feridas está relacionada à liberação local de proteases e aminas vasoativas, que levam a deiscência de sutura do local onde foi removido o tumor. A histamina se ligaria a receptores H_1 e H_2 de macrófagos resultando em liberação de fator supressor de fibroblastos, situação que prejudica a cicatrização local (MACY, 1985; BALDI et al., 2006). Processos inflamatórios locais se devem a liberação de histamina e de enzimas proteolíticas sem ter relação com o crescimento real do tumor (THAMM; VAIL, 2007). Glomerulonefrite multifocal foi observada em aproximadamente 70% dos cães, caracterizada por infiltrados pericorpusculares de plasmócitos, acúmulo focal de material amorfo em membrana basal glomerular e espessamento da cápsula de Bowmann (PULLEY; STANNARD, 1990). Grande parte destas complicações é evitada com a diminuição da manipulação tumoral (MACY, 1985; O'KEEFE et al., 1990; LEMARIE et al., 1995; THAMM; VAIL, 2007).

Os mastocitomas são considerados sempre como potencialmente malignos, mas seu verdadeiro potencial de metástase é desconhecido. Tumores bem diferenciados têm menor taxa de metástase, com 10% de chance de ocorrer, e

tumores de grau intermediário possuem baixo ou moderado potencial de metástase. Os tumores indiferenciados têm maior chance de fazer metástase, sendo a taxa de aproximadamente 55 a 96% (LEMARIE et al., 1995, CAHALANE et al., 2005; THAMM; VAIL, 2007).

A maioria dos mastocitomas faz metástase para os linfonodos locais (46%) e baço (41%) ou outros órgãos viscerais. O envolvimento dos pulmões é incomum. Pode ser observado mastócitos circulantes em sangue periférico ou em medula óssea em doenças sistêmicas disseminadas. A forma visceral do mastocitoma geralmente é precedida de uma forma primária de tumor indiferenciado cutâneo (O'KEEFE, 1990; LEMARIE et al., 1995, GOVIER, 2003; THAMM; VAIL, 2007), porém ocorrências primárias são descritas na literatura, como o mastocitoma mesentérico, que geralmente tem um curso maligno com metástase visceral (MATSUDA et al., 2009).

3.2.3 Diagnóstico

A avaliação do diagnóstico dos animais com suspeita de mastocitoma geralmente tem três metas: 1) diagnóstico definitivo por exame citológico e/ou histopatológico; 2) estadiamento clínico; 3) documentação de síndromes paraneoplásicas (JOHNSON et al., 2002; RECH et al., 2004). A decisão por outros recursos diagnósticos, como citologia dos linfonodos, exames de imagem, ficam na dependência da presença ou ausência de fatores de prognóstico negativos (THAMM; VAIL, 2007).

O diagnóstico citológico pode ser realizado por meio de punção por agulha fina (PAF) ou por decalque das lesões sobre a lâmina de microscopia (O'KEEFE, 1990; LONDON; SÉGUIM, 2003). A citologia aspirativa por agulha fina é vantajosa, pois é método pouco invasivo, com poucos riscos para o paciente, e reduzida agressão ao processo neoplásico (GOLDSCHMIDT; HENDRICK, 2002; LAVALLE; CARNEIRO; PEREIRA, 2003).

É neoplasia de células redondas, assim como linfoma, plasmocitoma, histiocitoma, melanoma e o tumor venéreo transmissível (LONDON; SÉGUIN, 2003). Ao exame citológico são observadas células redondas, com grânulos citoplasmáticos metacromáticos (azul ou púrpura) na coloração de Rowmanovsky ou Hematoxilina-Eosina (HE). Nos tumores indiferenciados ou mesmo de grau intermediário pode ser necessário o uso de outras colorações, como o Azul de Toluidina, Giemsa, Wright-Giemsa, para que os grânulos sejam visualizados (LAVALLE; CARNEIRO; PEREIRA, 2003). Com estas colorações os grânulos adquirem coloração azul-violácea, facilitando sua identificação (LONDON; SÉGUIN, 2003).

Lavalle, Carneiro e Pereira (2003) afirmaram que citologia do linfonodo regional é eficaz como método de pesquisa de metástase, havendo geralmente correspondência da citologia com a histopatologia, observando maior dificuldade nos tumores de grau III. É importante que todos os nódulos cutâneos sejam avaliados citologicamente, uma vez que todos podem se tratar de mastocitoma (LONDON; SÉGUIN, 2003). Dobson e Scase (2007) não consideram fácil a interpretação do aspirado de linfonodo, porque normalmente o linfonodo contém mastócitos no seu interior, devendo-se diferenciar as células normais das neoplásicas. O guia da OMS admite que o linfonodo esteja positivo para metástase quando a contagem mastócitos representa mais de 3% da população celular no aspirado. Entretanto, mesmo com este critério, mais de 25% dos cães normais serão diagnosticados como mastocitoma metastático (DOBSON; SCASE, 2007). Em um trabalho recente foi observada uma boa associação da citologia dos linfonodos com o prognóstico do mastocitoma. A avaliação dos linfonodos foi associada ao grau histopatológico e a sobrevida, sendo encontrada uma correlação positiva entre os animais que apresentavam linfonodos comprometidos e menor sobrevida, assim como geralmente apresentavam grau mais elevado do histopatológico. Para considerar o linfonodo positivo para metástase deveria ter mastócitos no infiltrado linfóide do linfonodo, com presença de agregado de células, mastócitos pobremente diferenciados, com pleomorfismo, anisocitose, anisocariose, e/ou diminuição ou granulação variável, e/ou mais de cinco agregados de mais de três mastócitos. Os linfonodos eram considerados possivelmente metastáticos e provavelmente metastáticos quando apresentavam duas ou três incidências de agregados de duas

ou três células, e mais de três locais de agregados de mastócitos de duas ou três células, e/ou dois a cinco agregados de mais de três mastócitos, respectivamente. Estes autores também consideraram que a citologia dos linfonodos alterados contribui para o estadiamento clínico dos animais com mastocitoma. Foi encontrada uma especificidade de 96% e sensibilidade de 100% pelos critérios propostos (KRICK et al., 2009).

Quando o diagnóstico citológico não é conclusivo, ou se torne difícil de ser realizado, este diagnóstico deve ser realizado por meio de técnicas histopatológicas, por biópsias incisionais, com “*punch*” ou agulhas “*tru-cut*” (LONDON; SÉGUIN, 2003). Porém este tipo de diagnóstico é mais invasivo, podendo haver um crescimento descontrolado da neoplasia, ulceração e/ou desgranulação após a realização do exame (GIEGER et al., 2005). Células pobres em grânulos são mais facilmente reconhecidas na citopatologia que na histopatologia por apresentar maior resolução dos grânulos citoplasmáticos. Portanto, a avaliação citopatológica foi considerada muito importante ao diagnóstico, além de envolver menor risco (MACY, 1985). A extirpação do linfonodo também é recomendada para avaliação histopatológica, nos casos em que o diagnóstico citológico não foi conclusivo ou há suspeita de metástase (THAMM; VAIL, 2007).

Os exames de imagem, como a ultrassonografia ou outro método, são indicados para inspeção dos linfonodos abdominais, sublobares, fígado e baço, ou presença de mastocitoma visceral. A radiografia de tórax raramente é indicada, porque dificilmente ocorre metástase para os pulmões. O padrão de metástase do mastocitoma nos pulmões é infiltrativo e raramente nodular. A radiografia fica indicada para avaliação do linfonodo mediastínico ou se há outra doença concomitante (MACY et al., 1985; THAMM; VAIL, 2007). A tomografia computadorizada é indicada para avaliação das margens do tumor e para a inspeção de linfonodos.

A avaliação citológica de lesões suspeitas no fígado ou no baço é controversa, pois estes órgãos possuem mastócitos normalmente no seu parênquima, sendo difícil diferenciar o normal do alterado (THAMM; VAIL, 2007). Porém em um recente estudo foi observada uma correlação positiva entre citologia positiva para infiltrado de mastócitos e menor tempo de sobrevida em animais com mastocitoma, havendo uma média de 73 dias de sobrevida para os cães que

apresentavam o baço e/ou fígado positivos contra 733 dias para os negativos (STEFANELLO et al., 2009). A avaliação da capa leucocitária também é controversa, pois a infiltração sanguínea é rara. A mastocitemia é mais observada em doenças inflamatórias, que em mastocitomas. A indicação da avaliação da capa leucocitária fica para os animais que apresentarem mastocitoma visceral ou estiverem com suspeita de mastocitemia (THAMM; VAIL, 2007). O aspirado de medula óssea também fica indicado apenas quando há suspeita de leucemia ou mastocitoma visceral. A infiltração medular ou mastócitos circulantes no sangue periférico é rara nos mastocitomas, ficando mais evidente nos mastocitomas viscerais. Como o prognóstico dos mastocitomas viscerais é muito ruim, a presença ou ausência de mastócitos circulantes no sangue periférico ou na medula óssea, geralmente não altera a decisão de tratamento (DOBSON; SCASE, 2007; WELLE et al., 2008). Porém, Marconato et al. (2008) demonstraram efetividade da terapia com mesilato de imatinib em três cães que apresentavam infiltração medular de mastócitos, obtendo sobrevida de 75 a 159 dias, comparado a média de 43 dias com uso da lomustina em 11 cães, indicando a avaliação da medula óssea e da capa leucocitária para animais em que há suspeita de envolvimento sistêmico.

3.2.4 Tratamento

A decisão do tratamento é baseada na presença ou ausência de fatores prognósticos negativos e a apresentação clínica da doença (THAMM; VAIL, 2007). Os tumores localizados podem ser tratados com terapia local, como intervenção cirúrgica e/ou radioterapia e este têm maior possibilidade de cura (CHAFFIN; THRALL, 2002). Entretanto, tumores disseminados devem ser tratados com medicações sistêmicas, como os quimioterápicos, onde a remissão pode acontecer, mas a cura é muito difícil. As opções de tratamento para os mastocitomas são: a excisão cirúrgica, a quimioterapia, a radioterapia ou uma combinação de tratamentos. Aproximadamente 80 a 90% dos tumores bem diferenciados e aproximadamente 60 a 75% dos cães com mastocitomas de grau intermediário têm

demonstrado uma sobrevida mais longa após a excisão cirúrgica completa. Os cães com tumores pouco diferenciados com a mesma terapia apresentam sobrevida de aproximadamente seis meses devido a metástases ou recorrência local. A intervenção cirúrgica e a radioterapia são descritas como as melhores opções de tratamento. Tratamentos cirúrgicos isolados têm uma taxa de 30% de recorrência. Os tumores não encapsulados podem se estender para tecidos macroscopicamente normais ao redor (THAMM; VAIL, 2007). Segundo Murphy et al. (2004) a média de sobrevida para pacientes grau III tratados somente com excisão cirúrgica foi de 278 dias, com 46% de possibilidade de atingir mais de 12 meses de sobrevida.

O tratamento de escolha para tumores localizados em pele ou subcutâneo ou em áreas possíveis, é a excisão ampla (SÉGUIN et al., 2001), com margens de segurança de pelo menos três centímetros de diâmetro de tecido sadio para todas as direções (laterais e profundas). Na profundidade muitas vezes é necessário a remoção de fáscia e músculos, e linfonodos regionais citologicamente positivos para metástase. As margens cirúrgicas devem ser avaliadas histopatologicamente (OGILVIE; MOORE, 1995). Trabalhos mais recentes indicam a excisão de margens menores para tumores menos invasivos ou tumores bem diferenciados. A margem pode ser de dois centímetros na lateral e apenas uma fascia profunda para uma excisão completa (SIMPSON et al., 2004), porém Thamm e Vail (2007) recomendam reavaliações periódicas destes animais, para diagnóstico precoce de recidivas. Para casos em que as margens cirúrgicas ficaram contaminadas, pode-se realizar uma segunda intervenção cirúrgica se possível ou a realização de terapias adjuvantes como radioterapia local ou quimioterapia. Apenas 30% dos tumores com bordos contaminados têm histórico de recorrência local (OGILVIE; MOORE, 1995; THAMM; VAIL, 2007). Nos tumores de grau II no histopatológico Ozaki et al. (2007) afirmaram haver uma piora na taxa de metástase e no prognóstico destes animais que tiveram os bordos cirúrgicos comprometidos.

De forma geral, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a escolha pelo procedimento cirúrgico deve ser feita quando o tumor apresenta-se em massa única, com ou sem acometimento dos linfonodos mais próximos. Já nos casos onde há metástases, ou quando há várias massas tumorais, devem-se realizar outros tipos de abordagem (MACY, 1985; O'KEEFE, 1990; MISDORP, 2004).

A radioterapia é recomendada em todos os estágios clínicos da doença, sendo mais efetiva assim que o tumor é detectado, ou quando a excisão cirúrgica não pode ser realizada da forma mais ampla. A dosagem da radioterapia isolada varia de 40 a 45 Gray, em três a quatro aplicações semanais, resultando em um ano de controle em aproximadamente 50% dos casos. Se houver necessidade de dosagem mais agressiva pode ser utilizado 48 a 57 Gray (THAMM; VAIL, 2007). Outros trabalhos demonstram efetividade da radioterapia para tumores incompletamente excisados para 97% dos casos tratados com período livre da doença por mais de um ano (FRIEMBERG et al., 1997). Outro estudo prospectivo de mastocitoma estágio 0 ou 1 grau II demonstrou 94% de efetividade com um ano de tempo livre de doença, além de 100% dos animais apresentarem-se vivos depois de um ano (AL SARRAF et al., 1996). Mayer (2006) faz uma revisão dos tempos de sobrevida e tempo livre de doença de diversos mastocitomas tratados com radioterapia, associada ou não a outras terapias, sempre enfatizando a grande efetividade deste tratamento. Apesar da alta radiosensibilidade dos mastócitos, as principais desvantagens desse tratamento são o custo e a disponibilidade de equipamento, que só é encontrado nos principais centros de referência (MACY, 1985; O'KEEFE, 1990; LONDON; SÉGUIN, 2003).

Os tumores localizados nos membros distalmente e de graduação histológica mais elevada (grau II ou III), têm três opções de tratamento. A primeira mais radical implica na amputação do membro, o que garante as margens, mas compromete a locomoção do animal. A segunda opção é apenas a radioterapia isolada, que tem taxas de controle variadas. A terceira opção seria a combinação de intervenção cirúrgica com radioterapia. Para o estágio 0 da doença a combinação de intervenção cirúrgica e radioterapia pode garantir uma sobrevida longa de dois anos em 85 a 95% dos casos, em tumores de grau leve ou intermediário de evolução. Independente da terapia de escolha, os tumores de grau I ou II podem evoluir regularmente com recorrência local ou metástase sistêmica (CAHALANE et al., 2004; THAMM; VAIL, 2007). Os tumores com grande volume, que envolvem mais de dois planos teciduais, onde a incisão cirúrgica com boas margens de segurança não é possível ou mastocitomas de extremidades, em que se almeja intervenção cirúrgica menos radical, pode-se realizar radioterapia para a citoredução tumoral. Os

efeitos colaterais da radioterapia são alopecia e descamação local (GIEGER et al., 2005).

A quimioterapia neste tipo de neoplasia é indicada para tratar a doença sistêmica, diminuir o volume da neoplasia e então permitir o tratamento cirúrgico, e também para evitar a recorrência da doença, inclusive nos casos em que os bordos não ficaram limpos histopatologicamente, ou na existência de metástases para linfonodos locais ou distantes, ou doença sistêmica. Também tem indicação quando há falha no tratamento radioterápico e/ou cirúrgico e para neoplasias de grau III no histopatológico. Os corticosteróides, como a prednisona/prednisolona, têm sido amplamente utilizados e indicados, sendo estes citotóxicos para as células. Sua ação baseia-se em reduzir a síntese de DNA, mitoses e, consequentemente, a multiplicação de células tumorais. A localização citoplasmática dos receptores para este fármaco pode ajudar a explicar a sua eficácia. Os corticosteróides inibem a produção de fatores de crescimento e citocinas, dos quais as células são dependentes, induzindo a apoptose. Os glicocorticóides contribuem aparentemente na resposta anti-tumoral pela diminuição do edema e inflamação peritumoral. A taxa de resposta estimada é de 20%, mas por curto período de controle clínico (MACY, 1985; SUEIRO et al., 2002; MISDORP, 2004; CAMPS-PALAU et al., 2007).

Outra opção de tratamento, para auxiliar na citoredução de tumores volumosos é a terapia intralesional com a triancinolona na dose de 1 mg/cm² do tumor, a cada duas semanas, com doses máximas de 10 a 40 mg. A terapia sistêmica é realizada com a prednisona, sendo a dose dependente do protocolo ao qual este fármaco está inserido. O resultado pode ser frustrante para os mastocitomas grau III, independente da dose utilizada, porque as células anaplásicas provavelmente têm menos receptores de membrana para glicocorticóides. Uma das melhores respostas a protocolos com poliquimioterapia, com taxas acima de 78% de resposta ao tratamento, encontra-se com o uso da vimblastina, na dose de 2,0 mg/m², IV, uma vez por semana, por quatro semanas, e após a cada 15 dias, completando 12 semanas de tratamento, em combinação com a prednisona, na dose de 1,0 mg/kg/uma vez ao dia, via oral, por duas semanas e após 0,5 mg/kg/ uma vez ao dia, até completar 12 semanas. A prednisona somente é descontinuada assim que a vimblastina estiver completada. Pacientes com grau elevado de mastocitoma, tratados com cirurgia e terapia adjuvante com o protocolo

acima, têm média de sobrevida de 331 dias, com 45% destes pacientes com sobrevida entre um e dois anos (SUEIRO et al., 2002; DAVIES et al., 2004). A toxicidade ocorreu em 20% dos pacientes, consistindo em mielossupressão e toxicidade gastrointestinal, observada em outro trabalho, onde a taxa de resposta foi de 47% com o uso deste protocolo (THAMM et al., 1999), sendo que Davies et al. (2004) consideraram baixo o risco de toxicidade. Vickery et al. (2008) demonstraram a efetividade e segurança de doses mais altas de vimblastina, com dose máxima testada de 2,67 mg/m². A vimblastina na dose de 3 mg/m² demonstrou toxicidade mais grave, com necessidade de internação. Neste estudo observaram uma melhor resposta a terapia, com maior taxa de redução tumoral, porém sugerem mais estudos que comprovem esta superioridade em relação à dose usual. Rassnick et al. (2008) não observaram diferença no tempo de sobrevida nos animais que receberam vimblastina na dose de 2 mg/m² (77 dias) e na dose de 3,5 mg/m² (63 dias), ambos grupos não foi administrado glicocorticóide, porém uma maior taxa de resposta foi observada na dose mais alta, assim como mais toxicidade por mielossupressão e sinais gastrointestinais.

Outras drogas são citadas, mas ainda sem comprovação clínica de sua eficiência, como a L-asparaginase, vinorelbina (MACY, 1985; O'KEEFE, 1990; SUEIRO et al.; 2002; GRANT et al., 2008). A vincristina, na dose de 0.75 mg/m², por semana, mostrou-se um tratamento ineficiente como única forma de tratamento para os mastocitomas, com taxa de resposta de 7% apenas e grande toxicidade (32%) (McCAW et al., 1997; MISDORP, 2004). O protocolo utilizando a ciclofosfamida na dose de 200-250 mg/m² a cada 3 semanas, associada a vimblastina (2-2,2 mg/m², a cada 3 semanas) e a prednisona (1 mg/kg, diária por 24 semanas), por 6 meses teve uma taxa de resposta associada a 64%, com duração média de resposta de 141 dias. A toxicidade associada a este protocolo foi de mielotoxicidade, sendo principalmente neutropenia (11,4%), toxicidade gastrointestinal (14,2%) e cistite hemorrágica (2,8%) (CAMPS-PALAU et al., 2007). A lomustina é muito utilizada no tratamento de linfoma e tumores cerebrais em cães, e recentemente foi demonstrada sua efetividade contra o mastocitoma canino, com taxa de resposta em aproximadamente 42% dos animais tratados. (LONDON; SÉGUIM, 2003), outro trabalho cita 57% de resposta para os animais tratados com lomustina associado a vimblastina. A dose utilizada é entre 60–100 mg/m², por via oral, a cada três ou

quatro semanas. A lomustina é uma nitrosuréia com potencial mielotóxico alto, portanto a dose da medicação deve ser ajustada de acordo com o resultado do hemograma (BALDI et al., 2006; JUNG et al., 2006). O principal efeito de mielotoxicidade é neutropenia, sendo esta severa em 41% dos animais com lomustina (RASSNICK et al., 1999) e de 57% para os animais que receberam lomustina e vimblastina (COOPER; TSAI; BENETT, 2009). Pode ocorrer simultaneamente emese, hematemesa, hematoquesia e diarreia (RASSNICK et al., 1999). A hepatotoxicidade é observada com o uso acumulativo deste quimioterápico (CAHALANE et al., 2004). Hosoya et al. (2009) citam a lomustina em combinação com a prednisona como uma terapia alternativa a radioterapia eficaz em mastocitomas incompletamente excisados. Outro protocolo envolve o uso de lomustina na dose média de 59 mg/m² com vimblastina na dose de 2 mg/m² teve uma taxa de sobrevida de 30 semanas nos pacientes que apresentavam doença macroscópica e 48 semanas nos que apresentavam doença microscópica (COOPER; TSAI; BENETT, 2009).

O protocolo envolvendo clorambucil e prednisona demonstrou uma resposta satisfatória em pacientes com doença avançada e mastocitomas inoperáveis, com sobrevida média de 144 dias e 533 dias de intervalo médio livre de doença, sendo que 38% dos animais tiveram resposta completa. Neste protocolo não foi observado toxicidade (TAYLOR et al., 2009).

Terapias alternativas locais incluem hipertermia em combinação com radioterapia, terapia fotodinâmica, corticosteróide intralesional, crioterapia, braquiterapia intralesional, eletroquimioterapia e terapia de hiposmolaridade (SIMOES; SCHNOING, 1994; NEWMAN et al., 2007; KODRE et al., 2009). Esta última, em que se utiliza a água destilada, as células se rompem devido ao meio hiposmótico, porém é necessário um tempo de exposição muito longo, inviabilizando o procedimento, pelo risco de contaminação cirúrgica. A criocirurgia é contra-indicada devido ao risco de degranulação, e consequente choque hipovolêmico (THAMM; VAIL, 2007). A maioria destas terapias não apresentou comprovação de sua efetividade no uso em grande escala, o que restringe sua utilização (WELLE et al., 2008), incluindo a terapia com água hipotônica, que não demonstrou diferença estatística na sobrevida e taxa de sobrevida entre os animais

tratados e não tratados com esta terapia de forma adjuvante a intervenção cirúrgica para excisão neoplásica (BROCKS et al., 2008).

Além das terapias acima citadas, estão sendo testados outros medicamentos que inibem o receptor de tirosino quinase (KIT). Alguns ainda têm apenas publicações de sua efetividade *in vitro* (PRYER et al., 2003; GLEIXNER et al., 2007; KOBIE et al., 2007; LIN et al., 2008) e outros já possuem publicações de resposta clínica em cães com mastocitoma, demonstrando efetividade sozinhos ou em combinação de tratamentos. Entre as substâncias testadas está o sulfato de toracenib, o masitinib, o imatinib (LONDON et al., 2003; HAHN et al., 2008; ISOTANI et al., 2008; MARCONATO et al., 2008; LONDON et al., 2009).

Deve-se reavaliar o paciente a cada três meses, após o diagnóstico definitivo, e então a cada três meses por um ano e meio, e após este período a cada seis meses por toda a vida. O local do tumor, os linfonodos regionais, exame físico completo, e hemograma são acompanhados. Para uma avaliação mais apurada pode-se realizar ultrassom abdominal e exame de medula óssea, se houver indicação para isto (THAMM; VAIL, 2007).

Os sinais clínicos sistêmicos são tratados conforme necessário. Quando houver sinais de degranulação de histamina, pode-se utilizar bloqueadores de histamina (bloqueador de H₁ ou H₂), como difenhidramina (bloqueador de H₁), e/ou bloqueadores de H₂ como cimetidina, ou ranitidina, ou bloqueadores de bomba de prótons (omeprazol). Estes agentes também podem ser utilizados quando sabidamente haverá manipulação tumoral, como no ato cirúrgico, ou quando haverá degranulação *in situ*, como nos casos de radioterapia local, ou quimioterapia intralesional com a finalidade de citoredução. Em casos de ulceração gastroentérica comprovada pode-se associar o sucralfato e ocasionalmente o misoprostol (OGILVIE; MOORE, 1995; DOBSON; SCASE, 2007; THAMM; VAIL, 2007).

As excisões incompletas podem ser tratadas com terapias adjuvantes de maneira efetiva, com radioterapia. Já nos casos em que a excisão foi completa permanecem dúvidas sobre qual protocolo adotar para pacientes com grau II de diferenciação, não havendo como prever se houve a cura completa após a cirurgia ou se haverá recorrência ou disseminação. Não se conhece a eficácia das terapias adjuvantes nestes casos (THAMM; VAIL, 2007). Porém, Cahalane et al. (2004) não observaram diferenças na sobrevida, recorrência e metástase em animais tratados

com apenas cirurgia, cirurgia em combinação com quimioterapia ou radioterapia, ou cirurgia combinada com outras duas formas de tratamento em animais com mastocitoma na região inguinal e perineal. Estes mesmos autores também afirmam que a excisão incompleta do tumor não influenciou estatisticamente na taxa de recorrência. Séguin et al. (2001) também não observaram diferenças de recorrência entre os tumores com margens incompletamente excisadas, dos tumores com margens limpas. Apenas uma pequena quantidade de neoplasias incompletamente excisadas recorrem. No entanto, alguns autores referem que esta porcentagem de recorrência é maior, com 50% dos casos. Afirmam que as margens cirúrgicas completas podem reduzir a taxa de recorrência e metástase nos tumores de grau intermediário (MICHELS et al., 2002; OZAKI et al., 2007).

3.2.5 Prognóstico

A alta prevalência dos mastocitomas e de seu comportamento biológico variável provocam uma busca constante por prognósticos acurados e um correto entendimento da biologia molecular desta neoplasia canina, sendo este entendimento crítico para o sucesso no tratamento da doença (WEBSTER et al., 2007). O prognóstico é bem variável, pois depende de vários fatores como localização, aparência e tamanho do tumor, sinais clínicos sistêmicos, estadiamento da doença, grau de diferenciação, sexo, raça, e outros fatores (RECH et al., 2004). Nenhum fator isolado consegue prever de forma acurada o comportamento biológico do mastocitoma ou a resposta ao tratamento em cães afetados (GOVIER, 2003). Desta forma, esta neoplasia cutânea tem provocado várias frustrações terapêuticas, devido a erros no estabelecimento do prognóstico, e consequentemente na definição do tratamento instituído. O risco de intoxicação pode estar aumentado se os animais receberem tratamento mais agressivo com quimioterapia sem haver real necessidade que isto ocorra (CAHALANE et al., 2004). Para que haja melhora na predição da evolução desta neoplasia há uma constante busca por indicadores de prognóstico mais precisos.

3.2.5.1 Parâmetros Clínicos

Os principais parâmetros clínicos observados para se avaliar o prognóstico são em relação à localização, aparência e tamanho dos tumores, idade, raça, sexo, quantidade de nódulos e as características de crescimento da neoplasia (WELLE et al., 2008).

A localização dos mastocitomas cutâneos em cães é um dado importante para estabelecer o prognóstico (CAHALANE et al., 2004). Os tumores localizados nos membros têm prognóstico melhor do que os localizados no tronco ou cabeça. Os tumores localizados em área perineal, prepucial, escroto, inguinal, mucosa intranasal e oral, áreas de junção muco-cutânea e músculos são geralmente mais agressivos, com pior prognóstico, assim como os tumores viscerais, que têm comportamento diferenciado dos tumores cutâneos. Estes tumores têm maior predisposição a metástase, maior taxa de recorrência e menor tempo de sobrevida, que os tumores em outras localizações (GIEGER et al., 2005; KIUPEL et al., 2005). Cahalane et al. (2004) avaliaram o prognóstico de cães com mastocitoma em região inguinal e perineal e observaram que não há piora no tempo de sobrevida, recorrência e metástases nas neoplasias nestas regiões. Os tumores localizados no tecido subcutâneo possuem prognóstico melhor comparado aos localizados na derme, incluindo os tumores com margens cirúrgicas incompletas (NEWMAN et al., 2007).

A presença de múltiplos nódulos está relacionada com piores prognósticos (KIUPEL et al., 2005), porém Murphy et al. (2006) não encontraram piora no prognóstico dos animais que apresentavam múltiplos nódulos, sendo o tempo de sobrevida muito próximo aos que possuíam nódulo único. A profundidade das lesões, utilizada como critério de classificação de Patnaik et al. (1984), não apresentou significado prognóstico (KIUPEL et al., 2005), assim como o volume tumoral no momento do diagnóstico (O'KEEFE, 1990; LONDON; SÉGUIN, 2003). Os tumores recorrentes apresentam um prognóstico pior, quando comparados com tumores primários (CAHALANE et al., 2004).

Tumores ulcerados, eritematosos ou com prurido local têm sido associados com uma piora do prognóstico (MULLINS et al., 2006).

Alguns autores testaram a idade, sexo, raça, localização e número de procedimentos cirúrgicos em relação ao período de sobrevida dos animais, mas não obtiveram diferenças estatísticas significantes (AL-SARRAF et al., 1996). Porém, Kiupel et al. (2005) relataram tendências de animais idosos, da raça Boxer, apresentarem recidiva à distância, e de machos idosos apresentarem sobrevidas menores. Cahalane et al. (2004) também observaram uma piora na sobrevida de animais idosos.

A presença de doenças sistêmicas (anorexia, vômito, ulceração gastroentérica, melena, eritema generalizado, edema) é associada a tumores mais agressivos (MULLINS et al., 2006; THAMM; VAIL, 2007). Os animais da raça Boxer tendem a apresentar mastocitomas bem diferenciados ou de grau intermediário, geralmente guardando melhor prognóstico. Shar-peis e Labradores tendem a apresentar mastocitomas mais agressivos, tendo pior evolução (BOSTOCK, 1973). Os machos apresentam uma sobrevida mais curta quando tratados com quimioterapia comparados às fêmeas (MADEWELL et al., 1992).

A taxa de crescimento tumoral (volume do tumor dividido pela duração de tempo que o tumor está presente) é um importante indicador de prognóstico. Mastocitomas que se mantêm localizados e estão presentes por períodos prolongados (meses ou anos) sem aumento significativo de volume são geralmente benignos, podendo ter um prognóstico favorável. No entanto os tumores com grande volume possuem um prognóstico pobre (BOSTOCK, 1973).

O estadiamento clínico é a determinação do grau de envolvimento local ou sistêmico do tumor, estabelecido pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (Tabela 1). Este método é utilizado para auxiliar estabelecimento da terapêutica, do prognóstico e da resposta a terapia dos animais acometidos por mastocitoma. Para esta neoplasia o risco de metástase aumenta conforme o aumento do estadiamento. O ideal é estabelecer o estadiamento clínico antes de realizar a cirurgia em pacientes que possuem linfonodo regional evidentemente metastático, se os tumores são altamente infiltrativos ou não passíveis de serem excisados, edema peritumoral ou ulceração presente, ou tumores recorrentes, ou estarem presentes em locais não favoráveis. Após a cirurgia o estadiamento deve ser conduzido em pacientes com tumores pouco diferenciados e aqueles excisados incompletamente, antes de

instituir a terapia radiológica (OGILVIE; MOORE, 1995; LAVALLE; ARAÚJO; CARNEIRO, 2003; THAMM; VAIL, 2007).

Estadiamento	Características
Estádio 0	Incompletamente excisado, confinado à derme, sem envolvimento do linfonodo regional.
Estádio 1	Tumores confinados à derme, sem envolvimento de linfonodo regional.
Estádio 2	Tumores confinados à derme, com envolvimento do linfonodo regional.
Estádio 3	Tumores múltiplos ou grandes, com ou sem envolvimento dos linfonodos regionais.
Estádio 4	Tumores com metástases distantes, incluindo invasão medular e presença de mastócitos no sangue periférico, ou recorrência com metástases.

Quadro 1 - Estadiamento clínico dos mastocitomas, segundo a Organização Mundial de Saúde (Fonte: LAVALLE; ARAÚJO; CARNEIRO, 2003)

Com intuito de ajudar a definir o estadiamento clínico pode ser realizado exames complementares como a radiografia torácica e abdominal, ultrassonografia abdominal, hemograma completo e pesquisa de mastócitos no sangue periférico, e aspiração da medula óssea, quando houver suspeita para doenças não localizadas. A tomografia computadorizada ou ressonância magnética podem ser indicadas para um planejamento cirúrgico mais adequado de tumores volumosos ou mastocitomas de parede. A influência do estadiamento no tempo de sobrevida dos animais é inconsistente. As metástases regionais e distantes devem ser determinadas com cautela por causa da falta de padronização da definição de metástase, não sendo possível muitas vezes diferenciar metástase nodal de migração de células não neoplásicas (THAMM; VAIL, 2007). Em um estudo recente Krick et al. (2009) afirmaram que a citologia dos linfonodos é um bom método para determinação de metástase, sendo o resultado da citologia correspondente com o grau histológico, evolução do tumor, prognóstico, sendo um método pouco invasivo e eficaz para estadiamento clínico.

A capa leucocitária não é específica para mastocitoma, podendo ocorrer em outras enfermidades inflamatória como pancreatite, parvovirose e dirofilariose. É relatado que cães com capa leucocitária positiva para mastocitoma podem sobreviver por mais tempo e os negativos geralmente estão associados a cães com mastocitoma

disseminado. A capa leucocitária pode provir evidência para mastocitose sistêmica em cães com mastocitoma e sinais clínicos associados ao mastocitoma, como hemorragia gastrointestinal, edema peritumoral ou outros, porém este teste é inespecífico e insensível (THAMM; VAIL, 2007). O exame de urina e as dosagens bioquímicas são importantes para a avaliação do estado geral do paciente antes de se instituir o tratamento (LAVALLE; ARAÚJO; CARNEIRO, 2003).

3.2.5.2 Graduação Histopatológica

A graduação histopatológica segue sendo o método de eleição na tentativa de prever o comportamento biológico desta neoplasia (SIMOES et al., 1994; LONDON; SEGUIN, 2003; MISDORP, 2004). Esta técnica ajuda a definir os graus de diferenciação celular, estabelecendo um diagnóstico mais preciso (RECH et al., 2004). As margens cirúrgicas também devem ser avaliadas (THAMM; VAIL, 2007). Apesar de existirem diversas técnicas de graduação tumoral, a mais utilizada é a de Patnaik, Ehler e MacEwen (1984), considerada a mais lógica pela maioria dos autores (MACY, 1985; O'KEEFE, 1990; LONDON; SEGUIN, 2003; STREFEZZI et al., 2003; MISDORP, 2004). Esta técnica divide o tumor em três categorias. O grau I ou bem diferenciado; o grau II ou intermediariamente diferenciado; e o grau III ou pouco diferenciado. A divisão em graus é baseada em várias características histomorfológicas (Quadro 2).

Graus	Descrição
I	O grau I são os tumores bem diferenciados, com predomínio de células redondas a ovais, uniformes, aspecto homogêneo basofílico, nucléolo não-visível, citoplasma amplo e ausência de figuras de mitose. Os núcleos são redondos e com cromatina condensada. Estão confinados a derme e espaço interfoliculares. Os mastócitos estão arranjados em fileiras ou pequenos grupos, separados por fibras colágenas maduras da derme. O edema e a necrose são mínimos nas lesões traumatizadas.
II	O grau II são os tumores intermediariamente diferenciados. São neoplasias de moderada a alta celularidade, e as células neoplásicas infiltram ou substituem a derme e o tecido subcutâneo. Podem se estender aos músculos esqueléticos e/ou tecidos subjacentes. As células frequentemente apresentam anisocitose, pleomorfismo (redondas, ovaladas ou fusiformes) ou uniformidade, núcleo com anisocariose ou redondo a oval, aspecto predominante vesicular com nucléolo visível, podendo ter ou não figuras de mitose. Pode haver células gigantes espalhadas difusamente. O citoplasma é distinto com grânulos intracitoplasmáticos finos na maioria dos casos. Em outros casos os grânulos são grandes e hipercromáticos. Os núcleos são redondos e com cromatina difusa e nucléolos únicos. Pode haver células com dois núcleos. Pode haver áreas de edema e necrose difusas.
III	O grau III são os tumores pouco diferenciados, com todas as células com anisocitose e pleomorfismo, anisocariose por vezes associada a células multinucleadas, com um ou vários nucléolos e podem ser confundidos com outras neoplasias de células redondas. As células estão arranjadas em grupos bem compactos, invadindo tecidos subcutâneos e mais profundos. O citoplasma é indistinto, com grânulos finos intracitoplasmáticos ou grânulos que não são óbvios. O estroma é fibrovascular ou espesso e fibrocolagenizado com áreas de hialinização. Células binucleadas são comuns. Muito comum a existência de figuras de mitose. Sinais como necrose, hemorragia e edema são mais abundantes nos mastocitomas grau III. Pode ser encontrado colagenólise, esclerose, edema, necrose e inflamação secundária, que quando severas podem comprometer a visualização das células neoplásicas e a avaliação das margens.

Quadro 2 - Classificação Histomorfológica de Patnaik, Ehler e MacEwen (1984)
(Fonte: GOLDSCHMIDT; HENDRICK, 2002)

Todos os graus podem apresentar eosinófilos isolados ou agrupados, mas principalmente no grau III (RECH et al, 2004). Nos mastocitomas, os eosinófilos contribuem para a formação do estroma e na angiogênese, sendo associados a necrose e hemorragia (ORDEIX et al., 2001). Goldschmidt e Hendrick (2002)

afirmaram que a presença de eosinófilos pode auxiliar no diagnóstico de mastocitomas pouco diferenciados, para evitar o diagnóstico de tumor de células redondas, sem especificação da célula de origem. A interleucina 5, produzida por mastócitos e pelos próprios eosinófilos, tem papel fundamental na atração dessas últimas células para o local da lesão. A coloração, como o azul de toluidina, pode auxiliar na confirmação do diagnóstico, permitindo muitas vezes a visualização dos grânulos citoplasmáticos, que quase não são visualizados, pois há uma diminuição da sulfatação em mastócitos neoplásicos, tornando-os ortocromáticos. Os eosinófilos observados nos mastocitomas foram associados com a necrose e hemorragia, atribuindo a eles a responsabilidade pelos efeitos deletérios nos tecidos infiltrados (RECH et al., 2004).

Em um recente trabalho Murphy et al. (2004) investigaram 340 mastocitomas cutâneos, derivados de 280 cães, estabelecendo o grau histopatológico e correlacionaram com o tempo de sobrevida. Observaram que 26% dos tumores eram grau I, 59% grau II e 16% de grau III. O tempo de sobrevida para os diferentes graus em um ano foi estatisticamente significativo, sendo 100%, 92% e 46% de animais vivos ao final de um ano para os graus I, II e III respectivamente. O tempo médio de sobrevida para os animais pobremente diferenciados (grau III) foi de 278 dias, enquanto para os graus I e II foi superior a 1300 dias. A recidiva foi observada em 19% dos cães com neoplasias de grau III, 6% nos de grau intermediário e em um cão que apresentava tumor bem diferenciado.

Apesar do sistema de graduação histológica seguir diversas características histológicas pré-definidas, muitas vezes a classificação é subjetiva através de parâmetros como invasão, celularidade e morfologia celular, e índice de mitose, podendo determinar diferentes graus para um mesmo tumor, sendo mais observado este fato nos mastocitomas grau II (STREFEZZI et al., 2003). Nestes casos o prognóstico é mais difícil de prever e as mortes relacionadas nesses animais variam de 20 a 50%. Estes podem assumir comportamento de grau I, enquanto outros de grau III (THAMM; VAIL, 2007). Outros métodos de classificação têm sido testados como potenciais marcadores de prognóstico, na tentativa de melhorar a predição do comportamento desta neoplasia em termos de recorrência, metástase, e sobrevida do animal.

Northrup et al. (2005) realizaram um trabalho multi-institucional em que obtiveram variações intra e inter-observadores na graduação de mastocitomas cutâneos caninos, utilizando-se da mesma metodologia de classificação (PATNAIK; EHLER; MACEWEN, 1984). Os diferentes patologistas atribuíram classificações distintas para as mesmas neoplasias, reforçando a tese da subjetividade da classificação. Esta subjetividade ocorre principalmente na classificação dos mastocitomas grau II.

Apesar da sua subjetividade evidente, a classificação histopatológica ainda segue sendo indispensável para determinação de prognóstico dos animais, não sendo superada por nenhum outro indicador prognóstico mais eficiente (LONDON; SEGUIN, 2003; MISDORP, 2004; WEBSTER et al., 2007).

3.2.5.3 Índice Mitótico

A contagem de figuras de mitose por campo, ou índice mitótico, expressa em porcentagem, tem sido realizada para avaliação proliferativa de neoplasias humanas, como carcinomas tireoidianos e mamários, e de animais, como sarcomas de partes moles, tumores mamários e melanomas cutâneos. É uma técnica relativamente simples, porém apresenta problemas de reprodutibilidade, por não conseguir realizar a seleção dos mesmos campos, apresenta variações intra-observadores e de uso de objetivas de tamanhos variados, dificuldade de identificação de núcleos picnóticos, além de representarem apenas uma das fases do ciclo celular, a fase M (QUINN; WRIGHT, 1990).

Romanski et al. (2007), demonstraram uma correlação positiva entre o grau da neoplasia, segundo Patnaik, Ehler e MacEwen (1984), e o índice mitótico, a taxa de metástase e o tempo de sobrevida do animal. Além disso, também ajudou a diferenciar os casos de mastocitoma grau II, onde os animais com alto índice mitótico apresentam uma sobrevida mais curta, necessitando de uma terapia mais agressiva. A média de sobrevida para os tumores com índice mitótico menor que cinco foi significativamente mais longa comparada aos que apresentavam índice mitótico maior que cinco. Em outro trabalho para comprovação do estudo acima foi

observado um tempo de sobrevida médio de poucos meses para aos animais que possuíam índice mitótico acima de cinco, não sendo estabelecido o tempo de sobrevida médio para o outro grupo (ELSTON et al., 2009).

3.2.5.4 Morfometria

Além da classificação histopatológica dos tumores, outros métodos de classificação têm sido testados como potenciais indicadores de prognóstico. Uma das soluções encontradas para minimizar as variações subjetivas de interobservadores e consequentemente alcançar as decisões diagnósticas foi a técnica de morfometria computadorizada (STREFEZZI et al., 2003; MAIOLINO et al., 2005). Os parâmetros que Strefezzi et al. (2003) e Maiolino et al. (2005) consideram mais apropriado para morfometria nuclear são a área, o diâmetro e o perímetro do núcleo, sendo observadas diferenças significativas entre os graus II e III e entre os graus I e III com coloração de HE, sendo menos significativa a diferença entre os graus I e II na coloração do panótico, considerando-se apenas a diferença entre os graus I e III. Existe correlação entre a dimensão nuclear e a sobrevida de animais tratados cirurgicamente, sendo os tempos de sobrevida são significantemente menores quanto maiores: a área, o diâmetro médio e o perímetro dos núcleos, sendo a mortalidade estimada em função da neoplasia para os mastocitomas de baixo grau (até 52 μm^2 de área; 8,06 μm de diâmetro médio; 26,25 μm de perímetro nuclear) 15,4%, contra 81,8% para os de alto grau (acima de 52 μm^2 de área; 8,06 μm de diâmetro médio; 26,25 μm de perímetro nuclear) (STREFEZZI, 2007). A irregularidade e diferenças entre os núcleos das células do mastocitoma podem prejudicar a classificação citomorfométrica, atrapalhando a classificação tumoral. Esta diferenciação da morfologia nucleolar pode ser influenciada pelo método de coloração (STREFEZZI et al., 2003).

Outro estudo recente avaliou morfometricamente o linfonodo regional para predição de micrometástases nos cães com mastocitoma, sendo observado o número de mastócitos nos linfonodos de cães saudáveis, cães com doença inflamatória e mastocitoma cutâneo, incluindo cães sem evidência de metástase no linfonodo,

com suspeita e sabidamente portadores de metástase no linfonodo regional. Os mastócitos foram avaliados nos seguintes parâmetros morfométrico: área nuclear, perímetro nuclear e maior para menor diâmetro, entre outros. Os animais que possuíam sabidamente metástase nos linfonodos apresentaram maior área e perímetro de núcleo que os animais que possuíam doença inflamatória, sendo encontrado 0,07; 2,4 e 47,1 mastócitos nos linfonodos sem presença de metástase, com suspeita e sabidamente com metástase respectivamente. A área e o perímetro do núcleo dos mastócitos no grupo suspeito para metástase sugere a presença de mastócito neoplásico, predizendo a micrometástase, sendo esta informação muito interessante na previsão de metástases e para administração de tratamento (MARCONATO et al., 2008).

3.2.5.5 Métodos Histo e Imunoistoquímicos

3.2.5.5.1 Marcadores de Ciclo Celular

A propensão para a proliferação celular descontrolada é uma das grandes características do câncer, e conseqüentemente as mensurações desta proliferação têm sido muito utilizadas para o prognóstico das doenças neoplásicas tanto em humanos como na medicina veterinária (WEBSTER et al., 2007). A determinação da capacidade proliferativa do mastocitoma tem sido considerada como parte integral da evolução histológica, e pode ser correlacionada com a evolução clínica do paciente. No entanto, a quantificação da proliferação celular por contagem de figuras de mitose não é fácil. A avaliação da atividade celular através de histo ou imunoistoquímica tenta complementar ou, até mesmo, substituir a contagem de mitoses, considerada por muitos um método subjetivo, trabalhoso e de baixa reprodutibilidade (ABADIE et al., 1999). Na medicina veterinária os métodos de avaliação mais comumente utilizados incluem a determinação da frequência de Regiões Organizadoras Nucleolares com a afinidade pela prata – AgNOR (SIMOES et al., 1994; RECH et al., 2004), a contagem de células positivas para o Antígeno

Nuclear de Proliferação Celular – PCNA (SIMOES et al., 1994; ABADIE et al., 1999; LONDON; SEGUIN, 2003) e a contagem de células positivas para Ki-67 (ABADIE et al., 1999; SAKAI et al., 2002).

Os AgNORs são subestruturas nucleolares que estão envolvidas com a transcrição de RNA ribossomal (WEBSTER et al., 2007). As Regiões Organizadoras do Nucléolo são alças de DNA que transcrevem o RNA ribossomal, e podem ser demonstradas através de método de impregnação pela prata, permitindo visualizar o nucléolo e estudar a variação do tamanho do nucléolo e o número de pontos corados pela prata em tecidos (RECH et al., 2004). Desta forma mede indiretamente o índice de proliferação celular, e está relacionada com a velocidade com que as células percorrem o ciclo celular. O número de AgNOR por núcleo é correlacionado com o grau histológico. Quanto maior o número de pontos argirofílicos intranucleolares, pior é o prognóstico. Contagens maiores de AgNORs/célula representam prognóstico ruim, com mortalidade de 75% nos animais acometidos nos primeiros quatro meses após o tratamento cirúrgico, enquanto os que apresentavam contagens baixas, menores que 1,7 AgNORs/célula apresentaram sobrevida maior de 6 meses, sendo nenhum óbito observado neste intervalo (BOSTOCK et al., 1989). Esta técnica é considerada menos subjetiva que a histologia (SIMOES et al., 1994; GOLDSCHMIDT; HENDRICK, 2002). Os valores médios relatados para os mastocitomas grau I, II e III são 1,5, 3,2 e 6,3 respectivamente. Nos mastocitomas grau II os valores de AgNOR podem oscilar entre 1,28 e 3,96, podendo ocorrer sobreposição aos graus I e III, pelo seu amplo comportamento biológico. O índice mitótico também pode variar o índice de AgNOR, principalmente no mastocitoma grau III (ORDEIX et al., 2001). Um aumento no número de AgNOR pode ser resultado de células com ciclo ativado com aumento do conteúdo celular de DNA, o que ocorre em células que proliferam ativamente (RECH et al., 2004). A grande variação entre as técnicas de coloração, empregadas pelos vários grupos de pesquisa, inviabiliza a comparação confiável dos resultados obtidos, apesar de, isoladamente, os resultados serem consistentes (SCASE et al., 2006). RECH et al. (2004) consideraram a técnica de fácil execução, com custo acessível e confiável como meio auxiliar para estimar um prognóstico mais objetivo para os mastocitomas.

Outra forma mais objetiva de detectar as proteínas nucleolares relacionadas com a replicação do DNA é através da detecção imunoistoquímica dos marcadores de ciclo celular como o Ki-67 e o PCNA (ABADIE et al., 1999). A avaliação imunoistoquímica de antígeno nucleolar celular proliferativo (PCNA), que é a mensuração indireta da proliferação tumoral, tem sido correlacionada com o resultado pós-cirúrgico (THAMM; VAIL, 2007). O PCNA é uma subunidade auxiliar da DNA polimerase delta e esta envolvida em inúmeros processos no núcleo, mais notavelmente no reparo de DNA (WEBSTER et al., 2007). É detectada desde a fase G1 até a transição G2-M, atingindo seu máximo na fase S do ciclo celular. Está ausente na fase G0, mas, diferentemente do Ki-67, sua expressão varia muito nas fases G1-S-G2-M. Pode ser induzida por dano ao DNA e, ainda, possui meia-vida longa, fazendo com que as frações proliferativas sejam, muitas vezes, super-representadas (SIMOES et al., 1994; ABADIE et al., 1999; MADEWELL et al., 2001). Webster et al. (2007) observaram que o PCNA isolado não tem valor prognóstico significativo estatisticamente quando utilizado isoladamente.

A marcação e quantificação de Ki-67 são consideradas as melhores ferramentas para avaliação da fração de crescimento de uma população celular. Sua meia vida é curta, pois é degradado em aproximadamente uma hora após a mitose. Sendo assim, mesmo marcações tênues podem ser consideradas positivas, dispensando os “*cut offs*”, geralmente utilizados para avaliação do PCNA (SCASE et al., 2006). O Ki-67 consiste em duas subunidades de proteínas que estão presentes em células durante a fase ativa do ciclo celular (G1, S, G2, e mitose), mas ausentes durante a fase de quiescência (G0) (LONDON; SÉGUIN, 2003).

A função do Ki-67 ainda não está totalmente elucidada, porém é provavelmente associada com o RNA nucleolar, portanto, com o ciclo celular (LONDON; SEGUIN, 2003). Abadie et al. (1999) associaram a imunodetecção de Ki-67 com o prognóstico dos animais com mastocitoma, onde observaram um maior número de núcleos positivos para Ki-67/1000 núcleos em cães que morreram de mastocitoma, em relação aos que sobreviveram. Desta forma, foi possível correlacionar a marcação com Ki-67 com o grau histológico, inclusive nos mastocitomas de grau intermediário, permitindo a diferenciação em grupos com diferentes taxas de sobrevivência. A marcação de ciclo celular, determinada por meio de imunoistoquímica, pode ser correlacionada com a suscetibilidade da

neoplasia a quimioterapia, pois a maioria das drogas age na divisão celular. Porém não há confirmação se a expressão da proliferação está associada com a suscetibilidade dos mastocitomas a quimioterapia. SCASE et al. (2006) confirmaram a utilidade do Ki-67 como indicador de prognóstico independente da graduação histológica, sendo este útil, principalmente, na subdivisão de mastocitomas de grau II quanto à agressividade. Em um estudo de mastocitomas de grau intermediário, o índice de células marcadas com ki-67 ajudou a definir o prognóstico destes animais, sendo os animais que apresentaram quantificação de ki-67 menor ou igual a 1,8% dos mastócitos marcados apresentaram uma maior sobrevida (não definido) que os animais que apresentaram um índice maior que 1,8% (média de sobrevida de 292 dias), sendo a sobrevida global para os dois grupos de 875 dias, portanto o índice de ki-67 pode ajudar a definir que animais estão sob alto risco de morte (MAGLENNON et al., 2008). O Ki-67 mensura a fração de crescimento das células, ou seja, determina o número relativo de células ativadas envolvidas no ciclo celular (WEBSTER et al., 2007). O Ki-67 não está envolvido com imunoreatividade por reparo do DNA e por ter uma meia vida curta é considerado um marcador de prognóstico mais realista (ABADIE et al., 1999).

A proliferação celular é o resultado de ambos os números de ciclos celulares (fração de crescimento) em um dado tumor e a taxa de progressão de ciclo celular (tempo de geração). Para avaliar verdadeiramente a proliferação celular é necessário avaliar tanto a fração de crescimento (Ki-67) e o tempo de geração (AgNOR) (WEBSTER et al., 2007). Webster et al. (2007) recomendam a utilização de AgNOR e Ki-67, em associação à avaliação da expressão de *c-kit* como métodos rotineiros para indicação do prognóstico em mastocitomas. Sakai et al. (2002) compararam o uso de Ki-67 e BrdU, que é considerado como marcador de prognóstico mais acurado em humanos, e concluíram que o ki-67 é padrão ouro de marcação de proliferação celular. Quando correlacionado as margens incompletamente excisadas de mastocitoma, os animais que possuíam baixas contagens de núcleos positivos para ki-67, a taxa de óbito também foram menores. Já os que possuíam altas contagens de núcleos positivos, apresentavam maior índice de óbito (OZAKI et al., 2007).

Os valores de ki-67 não são influenciados estatisticamente pela utilização de corticosteróides (LANGFORD et al., 1996).

3.2.5.5.2 Oncogenes

Os oncogenes, genes causadores de câncer, derivam de proto-oncogenes, genes que regulam o crescimento e a diferenciação celular normais. Diversos produtos dos oncogenes – as oncoproteínas – já foram estudados, sendo que os receptores de fatores de crescimento podem estar ativados constantemente ou hiperexpressos no câncer (KUMAR et al., 2005).

O *c-kit* é um proto-oncogene que codifica para KIT (CD117), um tipo III de proteína tirosino-cinase que é receptorora do *stem cell factor* (SCF), uma citocina estimulante do fator de crescimento do mastocitoma. O receptor *c-kit* consiste em um domínio extracelular de cinco alças de imunoglobulina *like* e um domínio tirosino cinase intracelular, ou seja, um receptor transmembrânico de tirosino-cinase. O ligante do receptor do *c-kit*, o SCF, também conhecido como fator de crescimento do mastócito, está envolvido com a sobrevivência dos mastócitos, sua proliferação, maturação, diferenciação, quimiotaxia, desgranulação, supressão da apoptose e adesão de fibronectina. O KIT é expresso por mastócitos e células progenitoras de mastócitos, células intersticiais de Cajal, que são as células marcapassos do trato gastrointestinal, melanócitos, células germinativas, células progenitoras hematopoiéticas (KIUPEL et al., 2004; ZEMKE et al., 2005; WEBSTER et al., 2006).

Mutações no domínio cinase ou no domínio da justamembrana têm sido mostrados como causas da ativação constitutiva do *c-kit* na ausência da ligação do ligante. A ativação constitutiva do *c-kit* em certas linhagens de células murinas conduzindo a um crescimento celular descontrolado e do comportamento agressivo típico do desenvolvimento tumoral (ZEMKE et al., 2002). Mutações no receptor tirosino-cinase têm sido descritos em diversos distúrbios de mastócitos em humanos, como a urticária pigmentosa ou mastocitoses agressivas, leucemias de linhagens de mastócitos em humanos e nos GISTs (tumores estromais gastrointestinais). As mutações ocorrem na porção do domínio cinase do KIT nas mastocitoses em humanos, porém nos GISTs elas se encontram no domínio da justamembrana. Já nas leucemias estas mutações ocorrem em ambos os domínios (justamembrana e cinase) do *c-kit*. Independente do local de mutação nos domínios, estas mutações resultam em uma proteína KIT constitutivamente ativada, que pode ser fosforilada

mesmo na ausência do ligante. Ou seja, adquire capacidade de proliferação mesmo sem ter sido ativada (WEBSTER; KIUPEL; YUZBASIYAN-GURKAN, 2006).

Diversas anormalidades (mutação pontual, deleção e duplicação) têm sido identificadas em mastocitomas caninos na justamembrana do domínio do *c-kit* e nas linhagens celulares de mastocitomas (RIVA et al., 2005). Webster, Kiupel e Yuzbasiyan-Gurkan (2006) não encontraram mutações no domínio cinase do *c-kit*, ficando estas mutações restritas ao domínio da justamembrana. Uma correlação muito próxima foi identificada entre a presença de mutações e a agressividade do tumor e seu grau histopatológico. Muitas destas mutações resultam em uma ativação constitutiva do *c-kit*, que têm sido vistas como implicação no desenvolvimento e progressão da neoplasia de mastócitos canina (PREZIOSI et al., 2004).

A presença de mutações está significativamente associada a um grau histopatológico mais alto em mastocitomas, e estes pacientes com estas mutações, possuem um prognóstico pior se comparados com os animais que não possuem estas mutações (ZENKE et al., 2002; ZAVODAVSKAYA et al., 2004; WEBSTER et al., 2006; WEBSTER; KIUPEL; YUZBASIYAN, 2006). Zenke et al. (2002), observaram uma alta taxa de mutação nos tumores pouco diferenciados (grau III), com um número de duplicações no domínio da justamembrana, porém o número de duplicações foi o mesmo nos graus II e III dos tumores. Não foi observado mutação no grau I de diferenciação. As duplicações da justamembrana estão associadas apenas a tumores mais agressivos, porém não é possível estabelecer relação racial com a presença de mutação. Zavodavskaya et al. (2004) relataram que presença de uma única mutação somática no oncogene ou no gene supressor do tumor pode ser utilizada para determinar a origem clonal de múltiplos tumores. Desta forma, as células malignas dos mastócitos podem permanecer quiescentes por um longo período de tempo antes de retornarem ao mesmo local de origem ou em localizações distantes. A habilidade de distinguir se o mastocitoma é recorrente, dos considerados como nova doença primária pode ser importante porque identifica recorrência ou metástase e pode corroborar para a escolha do tratamento, como a quimioterapia, por exemplo.

Riva et al. (2005), assim como Zenke et al. (2002) não identificaram associação entre os tipos de mutações no KIT e a raça, sexo ou idade dos animais.

As alterações na justamembrana do domínio do gene do *c-kit* devem influenciar a desregulação da função do KIT e o desenvolvimento das células de mastócitos neoplásicas de diferentes formas. No entanto, Ohmori et al. (2008) observaram que mesmo células de mastócitos não neoplásicos em cultura podem apresentar mutação no gene do c-kit, sendo estas mutações independentes da proliferação neoplásica do mastocitoma canino, sendo que estas células mutadas não têm seu gene suprimido por inibidores tirosino quinase, como imatinib, despertando a necessidade de mais estudos relacionados a novos mecanismos de mutação independente de proliferação neoplásica nos mastócitos, e que o melhor foco terapêutico para inibição de mutações independente de neoplasia (OHMORI et al., 2008).

Reguera et al. (2000) identificaram aumento da expressão de KIT quanto menor a diferenciação tumoral, além da existência de dois padrões de marcação imunoistoquímica, sendo um na membrana citoplasmática e outro no citoplasma, geralmente ao redor do núcleo. Finalmente, Zenke et al. (2002) relataram mutações nos tumores de graus II e III e não nos de grau I. Tais informações sugerem a expressão e as mutações de KIT podem estar relacionadas com a gênese e progressão tumoral, sendo a expressão de KIT um potencial indicador de prognóstico para mastocitomas (LONDON; SÉGUIN, 2003).

Kiupel et al. (2004) observaram que os mastocitomas com marcação de KIT apenas na perimembrana não estavam associados com redução no tempo de sobrevida e com a recorrência. No entanto, marcações de KIT difusas no citoplasma estavam diretamente associadas com reduções no tempo de sobrevida e altas taxas de recorrência. Desta forma, estes autores sugeriram uma nova classificação para mastocitomas, baseada na localização da expressão do KIT por marcação imunoistoquímica. Os tumores classificados como (I) são aqueles com marcação predominante em membrana citoplasmática, com mínima marcação citoplasmática, portanto menos agressivos; os classificados como (II) são os com marcação intensa citoplasmática em focos, ou em pontilhados; e os que obtiveram classificação (III) foram os que obtiveram marcação difusa citoplasmática, obscurecendo outras características citoplasmáticas. Os padrões KIT-II e KIT-III estavam significativamente relacionados à taxa de recidiva local e menores períodos de sobrevida dos animais. Newman et al. (2007) não encontraram correlação entre a

localização do KIT e o prognóstico de animais com tumores subcutâneos. Webster et al. (2007) afirmam que os melhores resultados na caracterização do comportamento biológico de mastocitomas foram obtidos com a avaliação conjunta de grau histopatológico, padrão de localização de KIT, AgNOR e Ki-67. Adicionalmente, sugeriu-se a associação entre a localização aberrante do KIT e o aumento da atividade proliferativa de mastocitomas.

Webster et al. (2006) observaram uma correlação positiva entre a mutação no domínio da justamembrana do mastocitoma e a localização aberrante do KIT por imunoistoquímica. Os animais que possuíam mutação no *c-kit* coincidiam com uma localização aberrante do KIT, que coincidiu com a agressividade da neoplasia e um prognóstico ruim em termos de uma sobrevida curta e/ou baixo intervalo de tempo livre da doença. Porém nem todos os caninos que possuem localização aberrante do KIT possuem mutação do *c-kit*, o que pode ser devido a outros fatores que provocam uma localização aberrante do KIT. Webster, Kiupel e Yubzbaskyan-Gukan (2006) verificaram se não havia mutações no outro domínio, o cinase. Porém estes pesquisadores não encontraram outras mutações ou polimorfismos que justificassem esta localização do KIT. Portanto, as mutações neste local não justificam a localização do KIT. O domínio cinase parece não contribuir para a progressão dos mastocitomas caninos.

Turin et al. (2006) avaliaram expressão do mRNA do *c-kit* através de Reação em Cadeia da Polimerase por transcriptase reversa quantitativa em tempo real realizada tanto na formação, como no sangue dos animais, sendo este sangue coletado em três tempos no momento cirúrgico (pré, trans e pós-cirúrgico imediato), e em mais três momentos, sendo estes com três, seis e nove meses de pós-operatório. O objetivo deste trabalho foi avaliar esta aferição como indicador de prognóstico para mastocitomas em cães, avaliando seu comportamento clínico, comparando com outros parâmetros. A expressão do *c-kit* não foi significativamente relacionado com o tamanho, localização, graduação do tumor, comportamento biológico, tratamento e sobrevivência dos animais.

O MDM2 – “mouse Double minute-2” – é um proto-oncogene cujo potencial oncogêncio baseia-se em sua hiperexpressão/amplificação e têm sido demonstrada em neoplasias em linhagens de células murinas, e também sua amplificação têm sido demonstrada em neoplasias humanas e caninas, principalmente sarcomas e

tumores mamários (SETOGUSHI et al., 2001), nas quais a amplificação de MDM2 está, muitas vezes, associada a presença de TP53 normal (NASIR et al., 2000; NASIR et al., 2001; SETOGUSHI et al., 2001). A oncoproteína MDM2 regula negativamente a ação de P53, catalizando a ubiquinização e, consequentemente sua exclusão do núcleo, além da subsequente degradação da mesma. Isto possibilita a diminuição da atividade de P53, mesmo na ausência de mutação do gene TP53 (NASIR et al., 2001; O'BRIEN; GIANNAKAKOU, 2003). A expressão de MDM2 foi investigada em mastocitomas caninos por Wu, Hayashi e Inoue (2006) que constataram a hiperexpressão da oncoproteína em tumores de grau III quando comparados aos tumores de menor grau, apesar de nem todos os tumores serem positivos para a mesma. Além disso, observou-se que apenas uma pequena parte dos mastocitomas MDM2 positivos, 12,8% (5/39), eram positivos também para P53. Tais resultados sugerem que a hiperexpressão de MDM2 pode acontecer independentemente da TP53 e, ainda, ser responsável por sua exclusão do núcleo e sua degradação/ubiquinização.

3.2.5.5.3 Antioncogenes ou Genes Supressores de Tumores

Dentre os genes supressores de tumores, responsáveis por inibir o crescimento e diferenciação celular, pesquisa-se com frequência a presença de mutações no gene TP53. A P53 normal regula a transição da fase G1 para a S do ciclo celular, promovendo ou reprimindo a síntese de RNAm. Sua função é garantir a fidelidade genômica reparando o DNA danificado ou induzindo a apoptose quando os danos são irreparáveis (GINN et al., 2000; NASIR et al., 2001; KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005). Suas principais interações acontecem com os genes CDKN1A (p21) e BAX: na primeira, inibindo a progressão para a mitose; e na segunda, iniciando o processo apoptótico (LEVINE; FLEISCHLI, 2000; NASIR et al., 2001).

A mutação do gene TP53 tem sido considerada a alteração mais comum em cânceres humanos, causando diminuição ou perda total da função de seu produto (GINN et al., 2000). Mutações do gene TP53 foram relatadas em diversos tumores caninos e linhagens celulares derivadas como, por exemplo, rabdomiossarcomas,

osteossarcomas, condrossarcomas e mixossarcomas (SETOGUSHI et al., 2001). A detecção imunoistoquímica da proteína baseia-se no fato da variante mutante ser mais estável e possuir duração maior que a P53 normal, o que provoca seu acúmulo, geralmente no núcleo das células (GINN et al., 2000).

Investigou-se a expressão do gene TP53 tentando correlacionar sua positividade com a graduação histopatológica, a taxa de recidiva e o tempo de sobrevida em casos de mastocitoma. Apesar destas mutações serem de grande valor prognóstico para grande parte dos tumores humanos, os trabalhos veterinários em mastocitomas cutâneos caninos não obtiveram resultados semelhantes (GINN et al., 2000; WU; HAYASHI; INOUE, 2006). Entretanto, a função da P53 pode ser anulada por vários mecanismos não mutacionais como: sua exclusão do núcleo das células; pela formação de complexos com proteínas virais; e através da expressão do oncogene MDM2 (NASIR et al., 2001; WU; HAYASHI; INOUE, 2006).

Em um recente trabalho foi avaliada a expressão imunoistoquímica da proteína BAX para avaliação do seu potencial como indicador de prognóstico para mastocitoma, porém sua expressão não demonstrou correlação com a mortalidade em função do tumor e o tempo de sobrevida, também não havendo correlação com os graus histopatológicos (STREFEZZI, 2007).

A proliferação celular é estritamente regulada por complexos de quinase ciclina-dependente (CDK). A p27 e a p21 são membros dos inibidores de CDK da família Cip/Kip, os quais inibem inúmeras CDKs e regulam o ciclo das células. Previamente, a desregulação na expressão da p27 foi demonstrada em várias neoplasias. A p21 pode ser induzida por desvios da p53-dependente e p53-independente, e sua expressão é relatada para a diferenciação terminal. Diminuição da expressão da p21 causada pela função da p53 diminuída foi relatada para prever um comportamento agressivo em várias malignidades. Por outro lado, a p21 também funciona como fator de montagem e ativação da CDK assim como um inibidor de quinase. Acredita-se que a super expressão da p21 em carcinomas é associada com a progressão do tumor. A expressão imunoistoquímica reduzida do p27 sugere evento patogênico precoce na tumorigênese de mastocitomas e histiocitomas. A perda ou diminuição da expressão do p27 é um evento precoce da tumorigênese dos mastócitos e histiócitos, e a expressão do p21 pode ser um marcador da

progressão dos mastócitos e da proliferação das células do histiocitoma (GINN et al., 2000; WU; HAYASHI; INOUE, 2004).

3.2.5.5.4 Proteínas que Expressam a Resistência a Múltiplas Drogas

As respostas dos mastocitomas a quimioterapia simples ou as poliquimioterapias geralmente são muito variadas. O principal fator que contribui para esta resistência são células tumorais resistentes a multidrogas (MDR). As principais proteínas responsáveis pela MDR são a glicoproteína-P (PGP) e a proteína associada a resistência a múltiplas drogas (MRP). A super expressão da PGP resulta em redução do acúmulo de certas drogas dentro da célula, que é relacionado com o fenótipo de MDR. A expressão desta proteína é alta em cães e gatos com linhas de células neoplásicas que expressam o fenótipo MDR. A PGP foi imunoistoquimicamente detectada em vários tecidos caninos normais ou neoplásicos. A estrutura química da MRP é muito similar a da PGP e pertence a mesma superfamília transportadora. A super expressão desta proteína tem sido observada em linhas de células MDR derivadas de uma variedade de tecidos caninos tumorais (MIYOSHI et al., 2002).

Um estudo realizado por Miyoshi et al. (2002) na tentativa de correlacionar a expressão do MDR e o prognóstico da quimioterapia, através da expressão imunoistoquímica da PGP e da MRP em tecidos de caninos com mastocitomas, resultou que os mastocitomas bem diferenciados expressam a PGP e/ou a MRP mais frequentemente que os tumores pouco diferenciados. Porém, se fosse desta maneira todos os tumores grau III responderiam bem a quimioterapia, o que não é observado com frequência no mastocitomas grau II e III, tendo geralmente uma eficácia variável. A conclusão foi de que a MDR em mastocitoma canino provavelmente envolva a expressão de outras proteínas, além da PGP e da MRP, não sendo possível fazer esta associação.

MATERIAIS E MÉTODO

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Este projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, sob o número de protocolo 1014/06.

4.1 SELEÇÃO DOS ANIMAIS

No período de aproximadamente três anos, os cães atendidos no Serviço de Cirurgia de Pequenos Animais – HOVET – FMVZ/USP com diagnóstico citológico aspirativo por agulha fina de mastocitoma foram incluídos no estudo, não havendo preferência de sexo, idade e raça. Os critérios de inclusão no estudo foram:

- cães com diagnóstico citológico de mastocitoma, passível de excisão cirúrgica da formação;
- cães passíveis de acompanhamento da evolução clínica por no mínimo um ano após o procedimento cirúrgico;
- cães com confirmação do diagnóstico através do exame de histopatológico após a excisão cirúrgica.

4.2 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Foram excluídos os animais em que não foi possível a realização da excisão das neoformações ou a avaliação por no mínimo um ano após a ressecção.

4.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os cães com mastocitoma foram submetidos a avaliação clínica, incluindo anamnese e exame físico e informações relacionadas a neoplasia, como evolução, localização, consistência, presença de sangramento, características de crescimento, dimensão, superfície, presença de alopecia, eritema ou ulceração, temperatura da formação, base de inserção, avaliação da bioquímica sérica (fosfatase alcalina, alanino amino transferase, uréia, creatinina, e outras enzimas de acordo com a necessidade), citologia dos linfonodos regionais, ultrassonografia abdominal, e tomografia do tumor nos casos em que o tumor era infiltrativo e não era possível determinar o seu plano de clivagem.

4.3.1 Procedimentos Clínicos Cirúrgicos Estabelecidos

Os animais foram submetidos a intervenção cirúrgica de ressecção da formação, quando possível, com margens amplas de dois a 3 cm nas laterais e na profundidade. Os pacientes que necessitaram de terapias complementares, como quimioterapia, foram avaliados e submetidos ao tratamento. O protocolo quimioterápico adotado foi com prednisona (2 mg/kg/SID/VO 7 dias; 1 mg/kg/SID 15 dias e 0,5 mg/kg/SID/VO até o final das aplicações) e vimblastina (2 mg/m²/IV) por 12 semanas, em um total de 8 aplicações de vimblastina. Para resgate, o protocolo adotado foi com lomustina na dose de 70 a 90 mg/m² a cada três ou quatro semanas. A opção pelo protocolo quimioterápico foi baseada no grau histopatológico, estadiamento clínico do tumor e adesão do proprietário ao tratamento.

4.3.2 Coleta do Material

As neoplasias excisadas com diagnóstico citológico de mastocitoma foram coletadas e todas as formações foram submetidas à avaliação histopatológica para confirmação do diagnóstico. O tumor foi separado do tecido cutâneo e subcutâneo, pesado na íntegra e fragmentado em secções de aproximadamente 2 a 3 mm de espessura. Uma fração de 1/3 das secções foi coletada, seguindo o padrão SURS (Systematic Uniform Random Sampling), para realização do estudo estereológico, sendo no mínimo três secções coletadas para esta finalidade. As fatias do tumor enviadas para estereologia foram novamente pesadas, identificadas, imersas em uma solução de formoldeído a 4% e mantidas em geladeira a 4° C. Outra terça parte das secções da formação foi congelada a – 80° C para posterior extração de RNA. O último terço dos fragmentos foi enviado a histopatologia juntamente com a pele e o tecido subcutâneo para avaliação de bordos da cirurgia, sendo imersos em solução de formol a 10%.

A graduação histológica foi realizada por grau de diferenciação celular, de acordo com critérios propostos por Patnaik e colaboradores (PATNAIK; EHLER; MACEWEN, 1984) com coloração de Hematoxilina - Eosina e a coloração histoquímica com azul de toluidina nos casos em que não era possível a diferenciação celular e graduação histopatológica. As margens cirúrgicas foram avaliadas e estabeleceu-se o estadiamento clínico do tumor, de acordo com a OMS.

Os parâmetros clínicos avaliados foram:

- raça, sexo, idade;
- localização do tumor;
- presença de alteração em linfonodo;
- número de formações;
- tempo de evolução das formações (desde a primeira observação até o momento da cirurgia);
- abrangência (dérmica; subcutânea);
- presença de sangramento no tumor;
- presença de sinais clínicos sistêmicos;

- presença de metástase;
- dimensões do tumor (menor que três centímetro ou maior);
- coloração do tumor (eritematoso, hiperpigmentado ou normal);
- características do crescimento (estável, lento ou rápido);
- taxa de crescimento tumoral (volume do tumor/ tempo de evolução, em meses);
- consistência do tumor (firme; macio);
- tipo de superfície tumoral (lisa; irregular; verrucosa);
- presença de aderência a planos profundos;
- presença de alopecia;
- presença de ulceração;
- presença de sensibilidade dolorosa;
- base de inserção (sésil; pedunculada);
- temperatura do tumor (normal; aumentada; frio);
- terapia adjunta com quimioterapia (sim; não).

4.4 PROCESSAMENTO E GRADUAÇÃO HISTOPATOLÓGICA

As amostras foram encaminhadas para confecção de lâminas com cortes de 5µm de espessura e coloração por Hematoxilina - Eosina no Laboratório de Histologia do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. O diagnóstico e a classificação dos mastocitomas foram realizados pelo Serviço de Patologia Animal do HOVET – FMVZ/USP.

A classificação em graus foi baseada na diferenciação celular e em outros eventos descritos por Patnaik, Ehler e MacEwen (1984). A graduação divide o tumor em 3 graus histológicos, sendo o grau I, tumores que possuem células bem diferenciadas, enquanto o grau III são os tumores que mostram células pouco diferenciadas, sendo difícil visualizar os grânulos citoplasmáticos. Os tumores

classificados como grau II são os que apresentam células com grau intermediário de diferenciação.

4.5 PROCEDIMENTOS ESTEREOLÓGICOS

O processamento do material para estereologia foi realizado no Laboratório de Estereologia, Estocástica e Anatomia Química (LSSCA), do Departamento de Cirurgia da FMVZ/USP.

Após a divisão do tumor de forma sistemática, uniforme e aleatória (SURS) as secções foram conservadas em formoldeído a 4% e mantidas em temperatura de 4°C. Antes do processamento a cápsula do tumor foi removida e as secções novamente pesadas em balança de alta precisão.

As secções foram novamente divididas com ajuda de um aparelho antitético chamado *Tissue Slider*, para que proporcionasse barras de espessura semelhante. Estas barras foram novamente selecionadas de forma sistemática, uniforme e aleatória, verticalizadas (BEDDELEY, 1986) (Figura 1), embebidas em Agar a 10% (10g de Agar (Fluka®), com 100 ml de água, fervido sob agitação e após mantido em estufa a 70°C por 30 minutos) e seccionadas com espessura de 40 µm, por meio de micrótomo de lâmina vibratória (vibrótomo) (LADERKARL et al., 1997). Finalmente os cortes histológicos foram corados com solução de azul de toluidina, para isso os cortes foram desidratados em lâmina silanizada, deixando secar ao ar por 3 minutos, impregnados com o corante azul de toluidina por 10 segundos, diferenciação em álcool 50% por 3 minutos e após em álcool 100% por duas passagens de 2 minutos, xilol 100% I e II por 2 minutos, e montagem da lâmina com DPX e lamínula. Em seguida os cortes foram observados ao microscópio de luz (Leica® DMR) e analisados com o auxílio de software estereológico new-CAST® (Versão 3.0.8.0).

Figura 1 - Fotografia representando a sequência de amostragem do tumor no qual se pode observar: O tumor já sem a pele e cápsula (A), preparando o tumor para o corte em secções com o aparelho anti-tético *tissue slider* (2mm) (B), secções do tumor em sequência (C), fração das secções amostradas (secções 2, 5 e 8) (flecha branca) (D), cada secção foi cortada em barras também com o *tissue slider* (2mm) (E), fração das barras amostradas (barra 2) (flecha branca) (F)

O estudo estereológico consistiu em determinar: o volume total do tumor, a densidade numérica, o número total de mastócitos neoplásicos, a volume médio celular do mastócito neoplásico, o volume médio destes núcleos e a relação núcleo/célula, sendo estes dados confrontados com o tempo de sobrevida e recidiva do tumor, por método estatístico.

O volume das células de mastócitos e de seus núcleos foram estimados utilizando rotator planar vertical (VEDEL-JENSEN; GUNDERSEN, 1993; LADERKARL et al., 1997). Além do rotator planar vertical, o volume médio dos núcleos dos mastócitos foi estabelecido pelo método de PSI (*Point Sampling Intersection*) (GUNDERSEN et al., 1988; LADERKARL, 2004). Foram utilizadas sempre as mesmas células para o cálculo de todos os parâmetros. A *frame* utilizada foi de $1600 \mu\text{m}^2$ de área, com altura de $20 \mu\text{m}$ (eixo z). Procurou-se utilizar 20 *frames* por secção histológica e nove secções histológicas por animal.

4.5.1 Volume total do tumor (Vref)

O volume total do tumor foi estimado dividindo-se o peso do tumor, obtido a partir do seu peso seco, em gramas, pela densidade específica do mastocitoma. A densidade específica foi calculada pelo Princípio de Cavalieri (MAYHEW; OLSEN, 1991; HOWARD; REED, 2005).

$V_{ref} = p/d$, sendo V_{ref} = volume total do tumor, p = peso total do tumor obtido a partir do peso seco, em gramas e d = densidade específica do tumor.

4.5.2 Densidade numérica (Nv)

A densidade numérica (N_v) é a relação entre o número total de objetos contados (neste caso, os mastócitos) e o volume total dos *disectors* utilizados para contá-los (STERIO, 1984; MAYHEW; GUNDERSEN, 1996; HOWARD; REED, 2005). O método do *disector* óptico foi usado para estimar o número total de mastócitos (Figura 2).

Para obter estes dados, foi utilizada esta fórmula:

$N_v = \Sigma Q^- / (n_{dis})h \times a$, onde:

(n_{dis}) = número de *disectors* contados;

h = altura de cada *disector*;

a = áreas teste bidimensional imparcial usada para a amostragem das partículas a serem contadas;

$h \times a$ = volume de cada *disector* (V_{dis});

Q^- = o número das partículas contadas em cada *disector* utilizado;

ΣQ^- = somatória das partículas contadas nos *disectors*.

O número de *disectors* utilizados para cada corte histológico foi de 20, sendo estes distribuídos de forma sistemática, uniforme e aleatória, de forma a cobrir todo o fragmento do tumor. O núcleo foi eleito como unidade de contagem das células,

pois estas células são mononucleares. Neste projeto a área dos *disectors* foi de $1600\ \mu\text{m}^2$ e a altura de $20\ \mu\text{m}$.

Figura 2 - Fotomicrografia representativa do método do *disector* óptico utilizado para contagem de células tumorais, onde se observa diferentes planos focais (A – E). Pode-se notar o aparecimento de mastócitos marcados com a letra “A”. Coloração Azul de Toluidina, escala de barra $10\ \mu\text{m}$

4.5.3 Número total de mastócitos (N)

O número total de mastócitos foi obtido multiplicando-se volume total dos mastócitos (V_{ref}) pela densidade numérica (N_v) de acordo com a fórmula $N = V_{ref} \times N_v$ (GUNDERSEN et al., 1988; LADEKARL, 2004). O coeficiente de erro (CE) para este parâmetro foi calculado através da fórmula $CE(N) = 1/\sqrt{\Sigma Q}$. Este coeficiente é calculado para medir a precisão do método para obter o parâmetro.

4.5.4 Volume médio dos mastócitos ($\bar{v}_N$ cell) e dos núcleos ($\bar{v}_N$ núcleo) pelo método do rotator planar vertical

O volume médio dos mastócitos neoplásicos e dos seus núcleos foram obtidos pelo método do rotator planar vertical (VEDEL; JENSEN; GUNDERSEN, 1993; LADEKARL et al., 1997). Este método permite estimar o volume médio e a distribuição volumétrica das partículas independentemente da sua forma, distribuição ou orientação. Para isso foi utilizado um rotator de seis linhas, sendo o ponto de marcação inicial, o centro do núcleo e os outros dois pontos de referência, o bordo superior e inferior da linha criada de forma sistemática, uniforme e aleatória. Após esta marcação, seis linhas foram criadas e marcadas nos bordos das células (Figura 3).

Obteve-se a estimativa do volume médio das células através da seguinte fórmula:

$\bar{v}_N \text{ cel} = 4\pi/3 \cdot l_n^3$, onde l_n é uma distância medida a partir de um ponto fixo da célula ou fora dela, até uma borda arbitrariamente escolhida na mesma.

Para estimativa do volume nuclear também foi utilizado o mesmo método do rotator de 6 linhas, sendo primeiramente marcados os pontos: central, superior e inferior. A partir destes pontos as seis linhas eram obtidas e marcadas

nos bordos do núcleo. A fórmula para cálculo foi a mesma utilizada para cálculo do volume celular.

Figura 3 - Fotomicrografia representativa do método do rotator planar vertical (seis linhas), sendo aplicado na célula (A) e no núcleo (B). Coloração de Azul de Toluidina, Barra de escala de 10 µm

4.5.5 Volume médio do núcleo dos mastócitos através do método do PSI ($\bar{v}_N \text{ PSI}$)

O volume médio do núcleo dos mastócitos também foi obtido através do método do PSI (*Point Sample Intersection*) (GUNDERSEN et al., 1988; LADEKARL, 2004). Este método foi desenvolvido para amostrar partículas planas com a chance proporcional a suas dimensões lineares (comprimento ou altura). Os pontos randômicos distribuídos em uma secção posicionada aleatoriamente batem uma partícula com a probabilidade a qual é diretamente proporcional ao volume da partícula. São amostrados apenas os núcleos que encostam nos pontos randômicos. Para isso foi utilizada uma combinação de quatro grupos com quatro linhas paralelas cada e uma densidade de dez pontos, de forma sistemática, uniforme e aleatória (Figura 4). Conhecendo a magnificação e o comprimento físico da régua, calcula-se o cubo do comprimento intersectado vezes o $\pi/3$, através da fórmula:

$\bar{v}_N \text{ PSI} = \pi/3 \times l_o^3$, onde l_o^3 é o comprimento intersectado no núcleo elevado ao cubo, quando o ponto de intersecção toca o núcleo.

Figura 4 - Fotomicrografia representativa do método do *Point Sample Intersection* (PSI), aplicado no núcleo do mastócito neoplásico. Coloração de Azul de Toluidina, barra de escala de 10µm

4.5.6 Relação do volume médio do núcleo pelo volume médio da célula ($\bar{v}_N$ núcleo/ $\bar{v}_N$ cel)

Após estabelecido os volumes médios da célula e do núcleo, pelo método do rotator, estimou-se a relação do volume núcleo-célula, através da fórmula:

$\bar{v}_N \text{ núcleo} / \bar{v}_N \text{ cel} = \bar{v}_N \text{ núcleo} / \bar{v}_N \text{ cel}$, onde $\bar{v}_N \text{ núcleo}$ é o volume médio do núcleo dos mastócitos e $\bar{v}_N \text{ cel}$ é o volume médio do mastócito, obtidos pelo método do rotator planar vertical.

4.6 PROCEDIMENTOS IMUNOISTOQUÍMICOS

O processamento imunoistoquímico foi realizado no Laboratório de Oncologia Experimental do Departamento de Patologia da FMVZ/USP.

Para confecção das lâminas para imunoistoquímica foram realizados cortes de 5 μm de espessura, aderidos em lâminas silanizadas, desparafinados em estufa por 30 minutos a 60° C, em xilol, seguidos por mais um banho de xilol, por 30 minutos e outro banho de 30 minutos em xilol com álcool também a 60° C. A rehidratação foi realizada com 2 banhos em álcool absoluto, por 5 minutos cada banho, seguido por banhos em álcool graduado (95% e 70%) e finalmente, um banho em PBS por 5 minutos.

A recuperação dos antígenos foi feita por aquecimento dos cortes histológicos em solução tampão, por 15 minutos, em forno de microondas, na potência máxima. Para o anticorpo anti-KIT foi utilizado tampão citrato com pH 6.0. Enquanto para o anti-Ki67 foi utilizado o tampão EDTA, com pH 9.0. Após o resfriamento por 20 minutos no próprio tampão, as amostras foram lavadas em água corrente por 5 minutos e, em seguida, tratadas para bloqueio de peroxidase endógena, por 30 minutos, em solução de peróxido de hidrogênio a 5%, seguindo-se lavagens das lâminas com 5 banhos em PBS de 5 minutos cada. O bloqueio das reações

inespecíficas foi realizado com solução de leite desnatado a 5%, diluído em PBS 1x, durante 15 minutos em estufa a 37° C. Após foram realizados três banhos com PBS por 5 minutos cada, com suave agitação. Os cortes histológicos foram submetidos às incubações com anticorpos primários para anti-Ki-67 (Dako, 1:100) e anti-KIT (Dako, 1:100) por 12 horas (*over night*) em câmara úmida a 8° C. Após a incubação foram realizados três banhos de 5 minutos com PBS, em seguida os mesmos foram incubados com anticorpo secundário biotinilado *kit* LSAB+System-HRP¹ por 30 minutos em temperatura ambiente na câmara úmida. Em seguida mais três banhos de 5 minutos com PBS. O anticorpo terciário, complexo Estreptoavidina-Biotina *kit* LSAB+System-HRP¹, foi incubado também por 30 minutos em câmara úmida em temperatura ambiente. Após a incubação, mais três banhos com PBS foram realizados. A revelação foi realizada através solução contendo diaminobenzina (DAB+Chromogen)¹, observando a coloração, colocando 100µl/lâmina, fazendo cada lâmina individualmente. Em seguida mais três lavagens com PBS, por 5 minutos cada. A contra-coloração foi realizada com Hematoxicilina, por 2 minutos, seguida de lavagem em água corrente. Em seguida foi realizada a desidratação em banhos de álcool graduado (70%, 95% e álcool absoluto duas vezes, com 5 minutos cada), seguida pela diafanização com solução de álcool misturado a xilol e dois banhos de xilol com 10 minutos e montagem em resina sintética e lamínula. A imunoistoquímica destas células normais em divisão, como a das células basais da epiderme e das células germinativas dos folículos pilosos, foram utilizados como controles positivos internos para Ki-67, e as células de Cajal para o KIT.

4.6.1 Avaliação da Atividade Proliferativa: Ki-67

As avaliações dos índices de proliferação celular com Ki-67 foram realizadas através da determinação da porcentagem de núcleos positivos em um mínimo de 1000 núcleos de mastócito ao acaso, em 10 ou mais campos randomizados, em

¹ Dako, Carpinteria, CA, USA

objetiva de 40x. Mesmo os núcleos com marcações fracas foram considerados positivos, conforme realizados por outros autores (SIMOES et al., 1994; ABADIE et al., 1999; SAKAI et al., 2002; SCASE et al., 2006). Os núcleos positivos e negativos foram quantificados manualmente, através da ferramenta Manual Tag, com auxílio de um sistema de análise de imagem computadorizado, utilizando o software Image ProPlus 4.5[®]. Os animais foram separados em dois grupos, de acordo com a quantidade de núcleos positivos. Os animais que possuíam menos de 6,0% dos núcleos positivos foram incluídos no grupo A, enquanto os que possuíam mais de 6,0% no grupo B.

4.6.2 Avaliação da Expressão de KIT

A avaliação da expressão de KIT por imunoistoquímica foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Kiupel et al. (2004), classificando os mastocitomas de acordo com o padrão de marcação, sendo considerado KIT I as marcações predominantes em membrana celular, com mínima marcação citoplasmática; KIT II as marcações pontilhadas ou em focos predominantes em citoplasma; e finalmente KIT III as marcações difusas em citoplasma, encobrindo, muitas vezes, outras estruturas. Foram realizadas contagens manuais com auxílio de software Image ProPlus 4.5[®] objetiva de 40x, sendo considerado o padrão com maior porcentagem ao final da contagem de 10 campos randomizados.

4.7 PROCEDIMENTOS DE BIOLOGIA MOLECULAR

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

Para a técnica de PCR em tempo real foram utilizadas amostras dos tumores extraídas no momento do procedimento cirúrgico que foram congeladas rapidamente em nitrogênio líquido, sendo conservadas -80° C, até o momento da sua utilização. Para extração do RNA foi utilizado cerca de 30 mg de tecido tumoral, sendo esse macerado com ajuda de um pistilo autoclavado e tratado com água livre de RNases. O protocolo para a extração do RNA foi realizado adicionando 500 µl de Trizol, ao material macerado. Tomando os devidos cuidados para não contaminar a amostra e degradar o RNA. Após a maceração o material foi incubado em temperatura ambiente por 5 minutos, em seguida adicionou-se 100 µl de clorofórmio e realizada a homogeneização. O extrato da amostra foi incubado por 2 minutos em temperatura ambiente e centrifugado durante 20 minutos a 1200 rpm a 4° C. Após, o conteúdo sobrenadante foi transferido para um novo tubo, contendo 500 µl de isopropanol gelado. Após incubação de 15 minutos em gelo, o material foi centrifugado durante 20 minutos a 1200 rpm a 4° C. O sobrenadante foi desprezado e adicionou-se 1 ml de etanol 70% (em água tratada com DEPC). Após mais uma centrifugação por 10 minutos a 1200 rpm a 4° C, o sobrenadante foi novamente desprezado, o *pellet* secado e re-suspenso em 100 µl de água MiliQ tratada com DEPC e agitado em *vortex* por 10 minutos. Então o material foi incubado a 56° C por 10 minutos. O RNA extraído foi imediatamente congelado e mantido a – 80° C até o momento do seu uso. A quantificação do RNA foi realizada por método de quantificação da concentração e determinação da razão A260/280 nm, sendo o RNA diluído na proporção de 10 µl de RNA para 40 µl de água MiliQ autoclavada tratada com DEPC. A absorbância foi lida em biofotômetro¹ e a razão avaliada, juntamente com a concentração. Amostras entre 1,7 à 2,0 indicam baixa contaminação do RNA, sendo consideradas de boa qualidade para a transcrição reversa. Para verificar a

¹ Eppendorf, Hamburg, Germany

viabilidade do RNA foi realizada uma análise em gel de agarose a 1,5% em tampão tris-acetato-edta.

O RNA viável foi transcrito reversamente formando DNA complementar (cDNA) utilizando o *kit* de retrotranscrição do cDNA². O preparo do cDNA inicia com o tratamento com DNase, em que é adicionado 1000 ng RNA, 1 µl de Buffer de DNase, 1 µl DNase e 7 µl de água MiliQ com DEPC, e incubado por 15 minutos em temperatura ambiente. Após adicionou-se 2 µl de EDTA (25 mM), sendo incubado 10 minutos a 65° C. Após o resfriamento, foi adicionado 1 µl de Oligo DT (0,5 mg/ml), 1 µl de dNTP (10 mM), incubado a 65° C, deixando resfriar. Então iniciou-se o tratamento com RNase, sendo adicionado 1 µl First Strand Buffer (5x), 2 µl de DTT (0,1M), 1 µl de RNase OUT (5000 UI), incubado 2 minutos por 42° C e depois resfriado. Após adicionou-se 1 µl de Superscript II (10000 U), incubado 50 minutos a 42° C, seguindo-se por uma incubação de 15 minutos a 70° C sendo novamente resfriado. O cDNA foi armazenado a – 20° C até o momento do uso.

O cDNA obtido de cada exemplar foi amplificado por reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCR em tempo real), utilizando o *kit* Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG³, adicionando 12,5 µl de MIX, 0,5 µl de ROX, 4 µl de cDNA diluído 1:20 em água MiliQ, 5,5 µl de água MiliQ, e 2,5 µl de Primer, totalizando 25 µl de solução final para cada amostra. A análise por PCR em tempo real foi realizada em sistema de detecção ABI Prism 7000⁴ o qual contém uma câmera CCD acoplada que captura a fluorescência emitida e analisa os dados utilizando um programa de detecção. Para avaliação da expressão foram colocados em tubos apropriados⁵, 25 µl de cada produto de PCR. Após a completa mistura dos reagentes cada tubo foi fechado com tampas MicroAmp Optical⁶. Todas as reações foram realizadas em duplicata. O PCR em tempo real foi executado por 40 ciclos, com as seguintes condições de amplificação: 2 minutos a 50°C, 10 minutos à 95°C; seguidos de 40 ciclos a 90°C por 15 segundos para desnaturação da fita de cDNA e a 60°C por 1 minuto para sua extensão. Os primers utilizados foram o *c-kit* ligante⁷ e

² Invitrogen

³ Invitrogen

⁴ Applied Biosystems, Foster City, CA

⁵ Optical Tubes Applied Biosystems

⁶ Applied Biosystems

⁷ QT 00895342 – Quant Tect Primer Assay - QIAGEN

o primer KIT receptor⁸. Ao final, os dados foram analisados pelo método do 2DDCT, descrito por Livak e colaboradores (LIVAK et al., 2001).

4.8 EVOLUÇÃO DOS CASOS CLÍNICOS

Os animais foram acompanhados durante todo o período de pós-cirúrgico e de quimioterapia nos casos em que esta foi utilizada. Após a recuperação cirúrgica, os animais foram reavaliados a cada mês nos primeiros três meses e após, a cada três meses por no mínimo um ano. Os exames de acompanhamento foram o histórico do animal, exame físico, ultrassom abdominal e radiografia quando necessário para avaliar metástase e recidiva. Foi recomendado o retorno anterior ao intervalo de três meses nos casos em que proprietário observasse reaparecimento das formações.

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A associação entre variáveis classificatórias foram avaliadas com o teste de razão de verossimilhança.

As variáveis que apresentaram significância em relação à normalidade dos dados foram avaliadas com os testes de Mann-Whitney (Análise de variância), para as variáveis com distribuição normal, sendo os valores analisados pela mediana e valores máximo e mínimo, ou Kruskal-Wallis, quando as variáveis não tinham distribuição normal, sendo os valores analisados pela mediana e valor mínimo e máximo.

As curvas de eventos ao longo do tempo foram construídas segundo método de Kaplan-Meier e comparados com o teste log-rank.

⁸ QT 00897099 – vkit Hardy-Zuckerman 4 Feline Sarcoma Viral Oncogene Homolog - QIAGEN
COSTA-CASAGRANDE, T. A.

As variáveis significantes nos testes de “log-rank” foram utilizados no ajuste do modelo de Regressão de Cox múltiplo.

O valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 CASOS CLÍNICOS

Do total de 156 pacientes, foram selecionados 81 cães com diagnóstico citológico positivo para mastocitoma, sendo 40 fêmeas (49,38%) e 41 machos (50,62%). A raça mais frequente foi a Boxer com 32 animais, correspondendo a 39,51% dos cães. Os cães sem raça definida apareceram com 16,05% (13/81) dos casos estudados. As demais raças seguidas por frequência foram o Labrador (13,6%, 11/81), o Pinscher Miniatura (4,95%, 4/81), o Dachshund (4,95 %, 4/81), Cocker Spaniel (3,7%, 3/81), Doberman (2,5, 2/81) e Dog Alemão, Fila Brasileiro, Fox Paulistinha, Husky Siberiano, Pug, Rottweiler, Maltês, Schnauzer Miniatura, Bull Terrier, American Starffordshire Terrier, Golden Retriever com apenas um exemplar cada (1,3%, 1/81).

A idade média dos pacientes foi de 8,43 anos, variando entre três e 17 anos de idade. Destes, 20 (24,7%) animais tinham entre três e seis anos, 35 (43,2%) entre sete e nove anos e 26 (32,1%) cães possuíam dez anos ou mais. A maioria dos animais possuía apenas uma formação (49/48, 60,5%), enquanto 32 cães possuíam duas ou mais formações (39,5%). Dos 81 animais, foram extraídas 148 formações de localizações variadas. O local mais comum foram os Membros Pélvicos, compreendendo 54 formações (36,5%), seguido pela Região Tóraca (24/148, 16,2%), Flanco (17/148, 11,5%), Bolsa Escrotal (11/148, 7,5%), Membro Torácico (10/148, 6,8%), Cervical (9/148, 6,1%), Cabeça e Região de Períneo e Genital, ambas com sete formações cada (4,7%), Lombar (4/148, 2,7%), Abdome (3/148, 2%) e Dígito com duas formações (1,3%). Os dados estão sumarizados no apêndice A, tabela14.

As variáveis: sexo, raça e localização do tumor não apresentaram associação aos eventos combinados taxa de recidiva e óbito pelo teste de log-rank, que compara as curvas de sobrevida de Kaplan-Meier ($p=0,275$; $p=0,250$; $p=0,950$ respectivamente; $p>0,05$), e também quando os eventos foram analisados separados quanto taxa de recidiva ($p=0,399$) e óbito ($p=0,185$) para o sexo; taxa de

recidiva ($p=0,209$) e óbito ($p=0,088$) para raça; e taxa de recidiva ($p=0,207$) e óbito ($0,386$) para localização. A quantidade de formações também não apresentou valor estatístico na curva de sobrevida livre de recidiva ($p=0,768$; $p>0,05$). Quando analisado separadamente quanto a recidiva e óbito, pelo teste do log-rank, foi observado os respectivos valores de $p=0,319$; $p=0,994$, não sendo significativos ($p>0,05$).

A idade apresentou associação com a taxa de óbito e tempo livre de formação e na curva de sobrevida livre de recidiva ($p=0,001$; $p<0,05$), pelo teste de log-rank (Figura 5). Os animais que se apresentaram em idades mais avançadas, com mais de dez anos, tiveram aumento das taxas de recidiva ou óbito pela neoplasia com 58% de recidiva e 65% de óbito entre os animais deste grupo. Os animais com idade entre sete e nove anos apresentaram 54% de recidiva e 63% de óbito e os de menos de sete anos 35% de recidiva e 45% de óbito entre os animais desta faixa etária. Porém, em análise multivariada não se apresentou como variável independente (Modelo de regressão de Cox múltiplo).

Figura 5 - Curva de Kaplan-Meier de análise de sobrevida livre e recidiva dos casos estudados em função da faixa etária de forma dicotomizada, de 3 a 6 anos, de 6 a 9 anos e acima de 10 anos ($p=0,006$, teste de log rank), pontos=cesura à direita

5.2 EVOLUÇÃO DOS CASOS CLÍNICOS

Os animais selecionados foram submetidos a excisão das formações e acompanhados durante todo pós-operatório.

Os pacientes foram acompanhados até 19 de abril de 2010 para obtenção dos dados a respeito da evolução destes animais. No exame clínico do animal foram obtidos dados a respeito das características da formação, sinais sistêmicos, como edema peritumoral, gastroenterite, ulceração gastroduodenal, hemorragia, entre outros.

Dos animais atendidos 18 (18/81, 22,22%) possuíam linfonodos alterados no momento da consulta. A média de meses para tempo de evolução (intervalo de tempo entre a observação do tumor e a intervenção cirúrgica) foi de 7,88 meses, com no mínimo um mês e no máximo 30 meses de evolução. A média do tempo de sobrevida global foi de 18,32 meses, sendo que 33 destes animais ainda se encontram vivos. O tempo mínimo de sobrevida foi de três meses. O óbito ocorreu em 59,26% (48/81) dos animais, sendo 43 relacionados à neoplasia. 50,62% dos animais (41/81) apresentaram recidiva da neoplasia, local ou distante do local original do tumor. Destes cães que apresentaram recorrência 36 (36/41, 87,80%) vieram a óbito após a recidiva. Os dados estão ilustrados no apêndice B, tabela 15.

Dos animais atendidos, 32,1% (26/81) foram classificados como estágio 0, 24,7% (20/81) como estágio 1, 42% (34/81) como estágio 3 e 1,2% (1/81) como estágio 4, de acordo com os dados estabelecidos pela OMS. De acordo com a análise estatística pelo teste de log-rank, houve associação entre o estadiamento clínico dos mastocitomas com a taxa de óbito e tempo livre de recidiva ($p=0,011$; $p<0,05$) (Figura 6). Todavia, quando analisada a presença de linfonodos alterados antes da cirurgia, não foi observada associação com a recidiva ($p=0,739$; $p>0,05$), ou com os eventos combinados recidiva ou óbito ($p=0,055$; $p>0,05$), porém com associação com a ocorrência de óbito ($p=0,01$; $p<0,05$), teste de log-rank (Figura 7). Quando realizada análise multivariada pelo teste de regressão de Cox múltiplo as variáveis não demonstraram independência.

Figura 6 - Curva de Kaplan-Meier de análise de sobrevida livre de recidiva dos casos estudados em função do estadiamento clínico da neoplasia, sendo classificados de 0 a 4, de acordo com as normas da OMS ($p=0,002$, teste de log rank)

Figura 7 - Curva de Kaplan-Meier de análise óbito dos casos estudados em função de ter ou não a presença de alterações nos linfonodos ($p=0,01$, teste de log rank), pontos=cesura à direita

Ocorreu metástase em 39 animais, sendo quatro do grau I, 23 do grau II e 12 do grau III. O principal local de metástase foi o linfonodo (30/39), seguido pelo baço (2/39). Cinco (5/25) cães apresentaram metástase para os linfonodos e baço ao mesmo tempo e dois (2/39) mostraram metástase para linfonodo, baço e fígado. A análise estatística de curva de sobrevida livre de recidiva (teste de log-ank) observou associação entre os animais livres de óbito e recidiva e os que não apresentavam metástase ($p=0,000$, $p<0,05$). Portanto, os cães com metástase possuem 95% de chance de evoluir para óbito ou exibir recidiva. A análise multivariada (método de regressão Cox) demonstrou consistência, ou seja, esta é uma variável preditiva independente ($p=0,001$; $p<0,05$) (Figura 8), quando avaliada separadamente segundo óbito ($p=0,00$) ou recidiva ($p=0,001$), ela apresentou alto valor preditivo.

Os sinais sistêmicos foram relatados em onze animais (13,6%), sendo principalmente relacionados a distúrbios gastroentéricos, inapetência, edema peritumoral e no pós-operatório, deiscência de sutura e atraso de cicatrização. A presença de sinais clínicos sistêmicos foi altamente associada com o tempo livre de recidiva e óbito ($p=0,009$; $p<0,05$), com 85% de chance de evoluir para óbito ou recidiva quando apresentavam estes sinais (Figura 9). Esta variável também foi considerada independente pela análise multivariada de Cox quando analisados com os eventos combinados recidiva ou óbito ($p=0,02$) e também foi significativa na análise de recidiva ($p=0,027$), ou seja, a presença de sinais clínicos implica em evolução para recidiva ou para os eventos combinados recidiva ou óbito independente de outras variáveis.

Figura 8 - Curva de Kaplan-Meier de análise de sobrevida livre de recidiva dos casos estudados em função da presença de metástase: sim ou não ($p=0,006$, teste de log rank), pontos=cesura à direita

Figura 9 - Curva de Kaplan-Meier de análise de sobrevida livre de recidiva dos casos estudados em função da presença sinais clínicos sistêmicos: sim ou não ($p=0,033$, teste log rank). Pontos=cesura à direita

A quimioterapia foi realizada em 35 animais no período do pós-operatório, enquanto que 46 não realizaram. Quatro cães compareceram para realizar a quimioterapia quando apresentaram recidiva do tumor. O protocolo adotado foi com prednisona, na dose de 2 mg/kg por 7 dias, depois 1 mg/kg por 15 dias, administrados a cada 24 horas, passando para 0,5 mg/kg a cada 24 horas até o final do protocolo, e vimblastina, na dose de 2 mg/m² aplicada uma vez por semana por 4 semanas e depois a cada 15 dias por mais quatro aplicações, totalizando 12 semanas de protocolo. Cinco animais necessitaram de protocolo de resgate com lomustina na dose de 70 a 90 mg/m², administrada a cada quatro semanas por via oral. O principal efeito colateral da quimioterapia foi gastroenterite, observado em nove (9/35; 25,71%) dos pacientes que foram submetidos a quimioterapia. A hepatotoxicidade foi observada em quatro (4/35; 11,43%) animais que receberam lomustina. Através do teste de log rank não foi possível observar significância estatística entre os cães que receberam quimioterapia e os animais que ficaram livres de óbito ou recidiva ($p=0,472$; $p>0,05$), e também quando analisada a taxa de óbito ($p=0,313$) e recidiva ($p=0,758$).

Da avaliação das características dos tumores de cada animal, notou-se que 24,7% (20/81) apresentaram sangramento, 35 (35/81; 43,2%) mostraram crescimento estável, 20 (20/81; 24,7%) lento e 26 (32,1%) rápido. O diâmetro médio das formações foi de 2,96 cm, variando de 0,5 a 15 cm, a consistência variou de macia (46/81) a firme (35/81), com superfície irregular em doze das 81 formações e lisa em 69 das 81 formações. Três formações encontravam-se aderidas, seis parcialmente aderidas e o restante (72) não estava aderido a planos profundos. Quanto ao aspecto visual 51 eram alopécicas e 30 não alopécicas, 36 eritematosos e 45 não, 12 hiperpigmentados e 69 não, 27 ulcerados e 54 não. Quanto a temperatura quatro cães apresentaram aumento da temperatura do tumor. Foi observada uma base de inserção tumoral séssil em 76 dos animais e cinco mostravam uma base pedunculada. As características: tempo de evolução, abrangência, alopecia, hiperpigmentação, presença de sensibilidade e base de inserção, não demonstraram diferença estatística na curva de sobrevida livre de recidiva (teste de log rank) ($p=0,705$; $p=0,158$; $p=0,656$; $p=0,204$; $p=0,584$; $p=0,833$; respectivamente; $p>0,05$) e também nas curvas de óbito ($p=0,899$; $p=0,484$; $p=0,689$; $p=0,353$; $p=0,544$; $p=0,7$, respectivamente) e recidiva ($p=0,836$; $p=0,192$;

p=243; p=0,345; p=0,223; p=0,729, respectivamente). As variáveis como presença de sangramento (p=0,031; p=0,016; p=0,032) (Figura 10); consistência (p=0,018; p=0,045; p=0,068) (Figura 11); tipo de superfície (p=0,029; p=0,001; p=0,057) (Figura 12); velocidade de crescimento (p=0,028; p=0,001; p=0,097; p<0,05) (Figura 13), aderência a planos profundos (p=0,001; p=0,000; p=0,001) (Figura 14), eritema (p=0,035; p=0,134; p=0,025) (Figura 15); presença de ulceração (p=0,011; p=0,002; p=0,012) (Figura 16) e temperatura (p=0,000; p=0,000; p=0,000) (Figura 17) estão associadas aos eventos combinados como óbito e tempo livre de recidiva, óbito e recidiva, respectivamente, pelo teste de log rank, todos apresentando p<0,05. Os tumores com dimensões maiores que três centímetros de diâmetro apresentaram associação com maior taxa de óbito (p=0,003; p<0,05) (Figura 18), porém não tem significância estatística com maior taxa de recidiva (p=0,083; p>0,05) ou na associação recidiva e óbito (p=0,068). A variável presença de sangramento demonstrou-se um fator preditivo independente para recidiva na análise multivariada de Cox múltiplo (p=0,037; p<0,05). O tipo de superfície influencia de forma preditiva independente o óbito na análise multivariada de regressão pelo método de Cox múltiplo (p=0,002; p<0,05), ou seja, os animais com tumores irregulares possuem grande probabilidade de evoluir para o óbito, independente de outras variáveis. As demais variáveis têm valor prognóstico, porém não independentes.

A taxa de crescimento tumoral, estabelecida pela dimensão do tumor dividido pelo tempo de evolução (tempo desde a observação até a intervenção cirúrgica), não apresentou significância estatística com óbito ou recidiva associados (p=0,417; p>0,05), mesmo quando analisados de forma separada: óbito (p=0,054; p>0,05) e recidiva (p=0,741; p>0,05).

Figura 10 - Curva de Kaplan-Meier da análise de sobrevida livre de recidiva dos casos estudados em função da presença de sangramento: sim ou não ($p=0,031$, teste log-rank). Pontos= censura à direita

Figura 11 - Curva de Kaplan-Meier da análise de sobrevida livre de recidiva dos casos estudados em função da consistência da neoplasia: macia ou firme ($p=0,018$, teste log-rank). Pontos= censura à direita

Figura 12 - Curva de Kaplan-Meier da análise de sobrevida livre de recidiva dos casos estudados em função do tipo de superfície da neoplasia: lisa ou irregular ($p=0,029$, teste log-rank). Pontos= censura à direita

Figura 13 - Curva de Kaplan-Meier da análise de sobrevida livre de recidiva dos casos estudados em função da velocidade de crescimento: rápido, lento ou estável ($p=0,028$, teste log-rank). Pontos= censura à direita

Figura 14 - Curva de Kaplan-Meier de análise de sobrevida livre de recidiva dos casos estudados em função do tipo de aderência a planos profundos, sendo considerada: aderida, parcialmente aderida ou não aderida ($p=0,001$, teste log-rank). Pontos= censura à direita

Figura 15 – Curva de Kaplan-Meier de análise de sobrevida livre de recidiva dos casos estudados em função da presença de eritema: sim ou não ($p=0,035$ teste log-rank). Pontos=censura à direita

Figura 16 – Curva de Kaplan-Meier de análise de sobrevida livre de recidiva dos casos estudados em função da presença de ulceração: sim ou não ($p=0,011$, teste log-rank). Pontos=censura à direita

Figura 17 - Curva de Kaplan-Meier de análise de sobrevida livre de recidiva dos casos estudados em função da temperatura tumoral: aumentada ou normal ($p=0,000$, teste log-rank). Pontos= censura à direita

Figura 18 - Curva de Kaplan-Meier de análise do óbito dos casos estudados em função da dimensão da formação, sendo divididos em dois grupos: menor de três centímetros de diâmetro (<3 cm) ou maior de três centímetros de diâmetro (>3 cm) ($p=0,009$, teste log-rank). Pontos= censura à direita

5.3 GRADUAÇÃO HISTOPATOLÓGICA

As análises da graduação histopatológica e a dos marcadores imunoistoquímicos foram realizadas nas mesmas amostras, para melhor comparação entre os resultados. Dos 81 animais 63% (51) apresentavam mastocitoma grau II, 18,5% (15/81) grau I e 18,5% (15/81) grau III. Durante o período de acompanhamento clínico total, o óbito ocorreu em 59,25% (48/81) dos pacientes, sendo 43 relacionados à neoplasia (43/81, 53,08%). O óbito relacionado ao tumor ocorreu em 13 dos animais com mastocitoma grau III, 25 tumores classificados como grau II e cinco dos animais com mastocitoma grau I. A recidiva ocorreu em 24 dos 51 animais com mastocitoma grau II, seis dos 15 cães classificados como grau I e 11 dos 15 que apresentaram mastocitoma grau III (Tabela 1).

Tabela 1 - Distribuição das taxas de mortalidade, relacionadas ou não aos mastocitomas, em função da graduação histopatológica proposta por Patnaik; Ehler; MacEwen. (1984). Porcentagens em relação aos totais de casos para cada grau histopatológico. FMVZ/USP–São Paulo-2006-2010

	Morte relacionada ao tumor	Morte não relacionada ao tumor	Vivos ao final do estudo	Total
Grau I	5 (6,17%)	2 (2,47%)	8 (9,87%)	15 (18,5%)
Grau II	25 (30,87%)	3 (3,7%)	23 (28,39%)	51 (63%)
Grau III	13 (16,06%)	0 (0%)	2 (2,47%)	15 (18,5%)
Total	43 (53,1%)	5 (6,17%)	33 (40,73%)	81 (100%)

Foi realizada uma análise univariada entre todos os eventos relacionando o óbito e o tempo livre de recidiva, para avaliar se estes eventos encontravam-se associados ou não quando combinados, sendo considerado significativo quando p fosse menor que 0,05. A análise de tempo de recidiva e óbito em função dos graus histológicos revelou alta significância ($p=0,002$) (Figura 19). A média de meses para que ocorresse o óbito ou recidiva foi de 24,85 para os pacientes com neoplasia grau I, 19,54 para os mastocitomas de grau II e 8,94 meses para os animais com tumores de grau III. Quando colocada em avaliação pelo método multivariado (Cox) foi considerada significativa, portanto independente, na previsão de óbito ($p=0,02$) e recidiva ($p=0,02$) separadamente, mas não quando analisados como eventos combinados. Encontramos que não existe diferença de risco de óbito ou recidiva entre os tumores de grau II e I, porém o risco de óbito aumenta em 3,057 vezes e o de recidiva em 3,369 vezes do grau III para o I. Dentre os casos considerados de grau I, 13 dos 15 animais (86,67%) sobreviveram por mais de 12 meses, enquanto 41 dos 51 animais que apresentavam grau II (80,39%) sobreviveram por período maior que 12 meses e cinco dos 15 cães com grau III (33,33%) tiveram uma sobrevida por mais de 12 meses.

As margens encontraram-se comprometidas em 27 dos 81 animais, enquanto 8 ficaram com margens estreitas e 46 animais com margens livres. A presença de margens comprometidas não foi associada a uma maior taxa de recidiva ou óbito através da análise pelo teste de log rank ($p=0,783$; $p>0,05$), ou nos eventos separados óbito ($p=0,264$) ou recidiva ($p=0,856$).

Figura 19 – Curva Kaplan-Meier de análise de sobrevida livre de recidiva dos casos estudados em função da classificação histopatológica (Patnaik et al. 1984), que divide em três graus I, II e III ($p=0,002$, teste de log rank). Pontos=censura à direita

5.4 PROCEDIMENTOS ESTEREOLÓGICOS

Para o estudo estereológico prévio foram avaliados os mastocitomas de 20 animais, com graus histológicos diferenciados: Grau I - cinco; Grau II - dez; Grau III - cinco. Do total de animais avaliados quinze evoluíram para óbito, sendo dois do grau I, nove do grau II e quatro do grau III. Os dados estereológicos foram sumarizados na tabela 2.

Os resultados foram expressos da seguinte forma: média; coeficiente de variação total ou observado (CV), que é a razão do desvio padrão pela média.

Tabela 2 - Valores dos parâmetros estereológicos avaliados em mastocitomas com diferentes graus histopatológicos - FMVZ/USP- São Paulo- 2006-2010

Prontuário	Vref (mm ³)	Nv (mm ⁻³)	N	Vn cell (µm ³) Rotator	Vn núcleo (µm ³) Rotator	Vn nucleo (µm ³) PSI	Vn nuc/Vn cell (Rotator)
96788	850	75000	64000000	815,94	106,08	135,69	0,13
180661	4310	41000	175000000	561,35	76,37	173,67	0,136
158376	690	47000	32000000	403,72	62,41	141,93	0,155
125250	2060	81000	168000000	667,89	104,15	142,34	0,16
174600	53610	189000	10158000000	450,36	74,43	98,95	0,165
182413	1470	171000	251000000	394,155	65,98	90,60	0,167
182142	2630	150000	394000000	495,51	83,14	118,97	0,167
182644	490190	109000	53400000000	652,74	108,38	91,3	0,17
135105	1030	39000	40200000	611,53	112,78	106,23	0,18
178316	490	72000	35000000	203,64	37,62	60,34	0,185
86699	10190	225000	2293000000	781,86	153,43	144,0	0,196
183432	21417	162191,78	3473661352	468,02	100,66	134,66	0,215
176974	40777	2570565	10482000000	375,51	60,25	61,19	0,16
185034	4932	138450	682835400	568,37	95,98	95,84	0,17
198906	612	75555,55556	46240000	360	70,57	90,013	0,196
177674	1019	146162,1622	148939243,3	927,16	158,95	110,76	0,171
125576	505	24692,3077	123064615,4	451,59	96,43	128,81	0,213
181476	436893	587034,4828	256000000000	406,63	96,434	100,48	0,237
181712	4408	151652,1739	668482782,6	510,3	100,03	102,94	0,196
187574	6505	125090,9091	813716363,7	668,1	105,1298	109	0,157
Média	54229,4	269969,7186	21712903438	538,71875	93,46019	107,7494267	0,176346271
SD	140967,8254	554316,4866	60831759693	176,2880364	29,23127516	26,55287799	0,026522414
CV	2,599472341	2,053254304	2,8016404963	0,327235754	0,312767128	0,246431733	0,150399629

Vref – Volume referência; Nv – Densidade numérica; Ntotal – número total de células cancerosas; Vn cell – volume médio da célula cancerosa; Vn nucleo – volume médio do núcleo da célula cancerosa; SD – desvio padrão; CV – coeficiente de variância. Os valores de Vref, Nv, Ntotal e Vn são individuais de cada animal.

5.4.1 Volume total do tumor (Vref)

Para uma melhor análise deste parâmetro, os dados foram divididos em três grupos, definidos a partir da escolha de um valor arbitrário de corte sendo o grupo A os animais que possuíam volume médio tumoral de até 1000 mm³, o grupo B os que apresentaram valores entre 1000 e 10000 mm³ e do grupo C quando os volumes fossem maiores que 10000 mm³.

O volume total de cada tumor está apresentado na tabela 6. O volume médio dos tumores foi de 54229,4 mm³ (2,6). A variação foi de 490 – 490190 mm³. Esta

variável mostrou significância com a taxa de recidiva e óbito na análise univariada de log-rank ($p=0,025$; $p<0,05$) (Figura 20), ou seja, quanto maior o volume, maior a chance de recidiva ou óbito. Quando avaliado em análise multivariada de Cox múltiplo, esta variável não demonstrou consistência, não se apresentando como valor preditivo independente.

Figura 20 – Curva Kaplan-Meier de análise de sobrevida livre de recidiva dos casos estudados em função do volume total do tumor, dicotomizado: até 1000 mm³; de 1000 a 10000 mm³ e maior de 10000 mm³ ($p=0,025$, teste de log rank). Pontos=censura à direita

Esta variável foi associada à graduação histopatológica, pela razão de verossimilhança, sendo observado que a distribuição do volume total dos tumores é diferente entre os graus, tendo frequências de volumes tumorais distintos dentro de cada graduação ($p=0,014$; $p<0,05$). Quando analisado a quantidade de volumes do tumor entre os graus histopatológicos, observou-se diferença estatisticamente significativa entre as medianas e os valores mínimo e máximo de volume total do tumor dentro de cada grau histopatológico, método de Kruskal-Wallis ($p=0,02$; $p<0,05$) (Tabela 3). Com este resultado, realizou-se o teste de Dunn, que encontrou o grau histopatológico I com valores menores de Vref em relação aos graus II e III (Figura 21).

Tabela 3 - Distribuição frequências de volume total do tumor em função de cada grau do histopatológico e distribuição das medianas e valores mínimo e máximo dos volumes totais dos mastocitomas para cada grau do histopatológico, segundo a classificação de Patnaik, Ehler e MacEwen (1984) – FMVZ/USP - São Paulo – 2006-2010

Volume total do tumor	Grau Histológico					
	I		II		III	
0-1000 mm ³	4	80,0%	1	20,0%	0	0,0% *
1000-10000 mm ³	1	12,5%	5	62,5%	2	25,0% *
>10000 mm ³	0	0,0%	3	50,0%	3	50,0% *
Mediana (mínimo - máximo)	690 (490 - 1030)		4408 (505 - 436893)		21417 (1019 - 490190) **	

*Razão de verossimilhança, p=0,014

**Teste de Kruskal-Wallis, p=0,02

Figura 21 – Distribuição da frequência dos diferentes volumes totais do tumor de acordo com os graus histopatológicos, sendo estes volumes distribuídos em três grupos: 0-1000mm³; 1000-10000mm³ e acima de 10000mm³ (p=0,014; p<0,05; razão de verossimilhança) – FMVZ/USP- São Paulo–2006-2010

5.4.2 Densidade Numérica (Nv)

Os valores de densidade numérica para cada tumor estão sumarizados na tabela 6. A densidade média para os animais foi de 269969,72 mm⁻³ (2,053), verificando-se uma variação de 39000 a 587034 mm⁻³.

Para uma melhor análise deste parâmetro, os dados foram dicotomizados em três grupos, definidos a partir da escolha de um valor arbitrário de corte sendo o grupo A os animais que possuíam densidade numérica de mastócitos até 50000 células/mm³, o grupo B os que apresentaram valores entre 50000 e 150000 células/mm³ e do grupo C quando a densidade foi maior que 150000 células/mm³. Não foi encontrada associação entre a variável densidade numérica com uma maior taxa de recidiva ou óbito pelo teste de log-rank, mesmo quando avaliada a curva de sobrevida livre de recidiva (p=0,919; p=0,251; p=0,895; respectivamente; p<0,05).

Quando analisada a associação da densidade numérica em relação aos graus do histopatológico foi observado, através do método de verossimilhança, a distribuição de Nv não é diferente em relação aos graus histológicos (p=0,099). Porém, o método de Kruskal-Wallis, mostrou medianas e valores mínimo e máximo diferenciados dentro dos graus histopatológicos (p=0,016; p<0,05) (Tabela 4). O teste de Dunn mostrou que o grau histopatológico I tem valores menores de Nv em relação aos graus II e III (Figura 22).

Tabela 4 - Distribuição frequências de densidade numérica em função de cada grau do histopatológico e distribuição das medianas e valores mínimo e máximo de densidade numérica para cada grau do histopatológico, segundo a classificação de Patnaik, Ehler; MacEwen (1984) – FMVZ/USP - São Paulo – 2006-2010

Nv	Grau Histológico					
	I		II		III	
0-50000	2	66,7%	1	33,3%	0	0,0% *
50000-150000	2	28,6%	3	42,9%	2	28,6% *
>150000	0	0,0%	5	62,5%	3	37,5% *
Mediana (mínimo - máximo)	72000 (39000 - 75556)		151652 (41000 - 587034)		162192 (109000 - 257056)**	

*Razão de verossimilhança, p=0,895

**Teste de Kruskal-Wallis, p=0,016

Figura 22 - Distribuição dos diferentes densidade numérica de células de acordo com os graus histopatológicos, sendo estas densidades distribuídos em três grupos: 0-50000 mm^{-3} ; 50000-150000 mm^{-3} e acima de 150000 mm^{-3} ($p=0,895$; $p<0,05$; razão de verossimilhança) – FMVZ/USP-São Paulo–2006-2010

5.4.3 Número total de mastócitos (N)

Os valores de número total de mastócitos para cada tumor estão demonstrados na tabela 6. O número médio de mastócitos nos tumores avaliados foi de 21712903438 (2,80), com variação de 32000000 a 53400000000. O coeficiente de erro médio foi de 6,7%, com variação de 3,2 a 10,26%.

Os dados foram dicotomizados para melhor análise estatística. Os animais que apresentavam número total de células até 100000000 foram agrupados no grupo A, no grupo B ficaram os animais que obtiveram um número de células entre 100000000 a 10000000000 e os do grupo C os que apresentaram valor maior que 10000000000 células no tumor. Houve diferença significativa entre o número total de mastócitos com a curva de sobrevida livre de recidiva na análise do teste log-rank ($p=0,029$; $p<0,05$) (Figura 23), a expectativa de óbito foi maior quando se detectou

um maior número de mastócitos neoplásicos no tumor ($p=0,0011$). A análise multivariada de Cox múltiplo não demonstrou independência desta variável.

Figura 23 – Curva de Kaplan-Meier de análise de sobrevida livre de recidiva dos casos estudados em função do número total de mastócitos do tumor, dicotomizado: até 100000000 (10^8); de 100000000 a 10000000000 (10^8-10^{10}) e maior de 10000000000 (10^{10}) ($p=0,029$, teste de log rank). Pontos=censura à direita

Há associação entre a frequência do número total de mastócitos e o grau histopatológico, de forma significante, observada através do teste de verossimilhança ($p=0,001$; $p<0,05$). O teste de Kruskal-Wallis verificou que as medianas e valores mínimo e máximo do número total de mastócitos é significante, diferente dentro de cada grau ($p=0,016$; $p<0,05$) (Tabela 5), sendo o número total de mastócitos é menor no grau I, em relação aos graus II e III, pelo teste de Dunn (Figura 24).

Tabela 5 - Distribuição frequências de número total de mastócitos em função de cada grau do histopatológico e distribuição das medianas e valores mínimo e máximo de número total de mastócitos para cada grau do histopatológico, segundo a classificação de Patnaik, Ehler; MacEwen (1984) – FMVZ/USP - São Paulo – 2006-2010

Ntotal ($\times 10^7$)	Grau Histológico					
	I		II		III	
0-100	5	100,0%	0	0,0%	0	0,0% *
100-1000	0	0,0%	6	75,0%	2	25,0% *
>1000	0	0,0%	3	50,0%	3	50,0% *
Mediana (mínimo - máximo) ($\times 10^3$)	72 (39 - 76)		152 (41 - 587)		162192 (109 - 2571)**	

*Razão de verossimilhança, $p=0,001$

**Teste de Kruskal-Wallis, $p=0,016$

Figura 24 – Distribuição do número total de mastócitos neoplásicos de acordo com os graus histopatológicos, sendo estes volumes distribuídos em três grupos: 0-100 ($\times 10^7$); 100-1000 ($\times 10^7$) e acima de 1000 ($\times 10^7$) ($p=0,001$; $p<0,05$; razão de verossimilhança) – FMVZ/USP-São Paulo–2006-2010

5.4.4 Volume médio dos mastócitos ($\bar{v}_N$ cel) e dos núcleos ($\bar{v}_N$ núcleo) pelo método do rotator planar vertical

O volume médio dos mastócitos de cada mastocitoma avaliado por estereologia está especificado na tabela 6. O volume médio dos mastócitos foi de $538,72 \mu\text{m}^3$ (0,327), com variação de 203,64 a $927,16 \mu\text{m}^3$.

O volume médio dos núcleos dos mastócitos pelo método dos rotator planar vertical para cada mastocitoma também estão inseridos na tabela 6. O valor médio dos núcleos dos mastócitos foi de $93,46 \mu\text{m}^3$ (0,312), com variação de 37,62 a $158,95 \mu\text{m}^3$.

Para uma melhor análise destes parâmetros, os dados foram divididos em três grupos, definidos a partir da escolha de um valor arbitrário de corte sendo o grupo A os animais que apresentaram volume médio celular até $500 \mu\text{m}^3$, o grupo B valores entre 500 e $700 \mu\text{m}^3$ e o grupo C maior que $700 \mu\text{m}^3$. Já para volume médio do núcleo no grupo A ficaram os animais com até $70 \mu\text{m}^3$, no B os com 70 a $100 \mu\text{m}^3$ de volume e no grupo C os que apresentaram volume médio nuclear maior que $100 \mu\text{m}^3$.

As variáveis volume médio dos mastócitos ($p=0,822$) e do núcleo ($p=0,474$) não apresentaram significância com taxa de recidiva e óbito, na curva de sobrevida livre de recidiva pelo teste de log-rank ($p>0,05$). Também não houve diferença estatisticamente significativa na associação entre o volume médio das células dos mastócitos e o grau do histopatológico ($p=0,897$; razão de verossimilhança). A diferença de distribuição das médias e seu desvio padrão de volume médio dos mastócitos para cada grau não foi significativa ($p=0,750$; $p>0,05$; análise de variância) (Tabela 6 e Figura 25).

Tabela 6 - Distribuição frequências do volume médio dos mastócitos em função de cada grau do histopatológico e distribuição das médias e desvio padrão de dos volumes médios dos mastócitos para cada grau do histopatológico, segundo a classificação de Patnaik, Ehler; MacEwen (1984) – FMVZ/USP - São Paulo – 2006-2010

Volume médio dos mastócitos	Grau Histológico					
	I		II		III	
1 – 500	3	33,3%	4	44,4%	2	22,2% *
500-700	1	14,3%	4	57,1%	2	28,6%*
>700	1	33,3%	1	33,3%	1	33,3% *
Média ± Desvio padrão	478,97 ± 238,09		543,76 ± 118,58		563,52 ± 230,95 **	

*Razão de verossimilhança, $p=0,897$

**Análise de Variância, $p=0,750$

Figura 25 – Distribuição do volume médio dos mastócitos neoplásicos de acordo com os graus histopatológicos, sendo estes volumes distribuídos em três grupos: 1-500 μm^3 ; 500-700 μm^3 e acima de 700 μm^3 ($p=0,897$; $p>0,05$; razão de verossimilhança) – FMVZ/USP-São Paulo-2006-2010

Houve associação do volume médio dos núcleos dos mastócitos com os graus do histopatológico ($p=0,003$; $p<0,05$) através do teste da razão de verossimilhança, sendo a distribuição de Vn nucleo Rot diferente em relação aos graus histológicos. A distribuição das médias dos núcleos dos mastócitos e seu desvio padrão não mostraram diferença significativa dentro de cada grau do histopatológico através da análise de variância ($p=0,452$; $p>0,05$) (Tabela 7 e Figura 26).

Tabela 7 - Distribuição frequências dos volume médios dos núcleos dos mastócitos em função de cada grau do histopatológico e distribuição das médias e desvio padrão dos volumes médios de núcleos dos mastócitos para cada grau do histopatológico, segundo a classificação de Patnaik, Ehler; MacEwen (1984) – FMVZ/USP - São Paulo – 2006-2010

Vn nucleo Rot	Grau Histológico					
	I		II		III	
1 – 70	3	60,0%	0	0,0%	2	40,0% *
70 – 100	0	0,0%	6	100,0%	0	0,0% *
> 100	2	25,0%	3	37,5%	3	37,5% *
Média ± Desvio padrão	77,89 ± 31,33		97,82 ± 23,36		98,84 ± 39,61 **	

*Razão de verossimilhança, $p=0,003$

**Análise de Variância, $p=0,452$

Figura 26 – Distribuição do volume médio dos núcleos dos mastócitos neoplásicos pelo método do PSI de acordo com os graus histopatológicos, sendo estes volumes distribuídos em três grupos: $1-70\mu\text{m}^3$; $70-100\mu\text{m}^3$ e acima de $100\mu\text{m}^3$ ($p=0,101$; $p<0,05$; razão de verossimilhança) – FMVZ/USP-São Paulo–2006-2010

5.4.5 Volume médio dos núcleos dos mastócitos neoplásicos pelo método do PSI ($\bar{V}_N$ núcleo PSI)

O volume médio dos núcleos dos mastócitos pelo método do PSI para cada tumor foi demonstrado na tabela 6. O volume médio dos núcleos avaliados por este método foi de $107,74\mu\text{m}^3$ (0,246), com variação de 54,05 a $163,51\mu\text{m}^3$. O agrupamento para análise estatística foi semelhante ao do parâmetro volume médio do núcleo pelo método do rotator planar vertical, tendo no grupo A os animais com até $70\mu\text{m}^3$, no B com 70 a $100\mu\text{m}^3$ de volume e no grupo C os que apresentaram volume médio nuclear maior que $100\mu\text{m}^3$. Também não houve associação do volume médio do núcleo pelo método do PSI com uma maior taxa de recidiva e óbito na análise univariada de log-rank ($p=0,937$).

A distribuição de V_n núcleo PSI não é diferente em relação aos graus histológicos ($p=0,101$; $p>0,05$; teste de verossimilhança), não havendo associação entre estas variáveis. O volume do núcleo do mastócito pelo método do PSI tem distribuição semelhante de médias e desvios padrões dentro dos diferentes graus do histopatológico análise de variância ($p=0,266$; $p>0,05$) (Tabela 8 e Figura 27).

Tabela 8 - Distribuição frequências dos volume médios dos núcleos dos mastócitos pelo método do PSI em função de cada grau do histopatológico e distribuição das médias e desvio padrão dos volumes médios de núcleos dos mastócitos pelo método do PSI para cada grau do histopatológico, segundo a classificação de Patnaik, Ehler; MacEwen (1984) – FMVZ/USP - São Paulo – 2006-2010

Vn nucleo Rot	Grau Histológico					
	I		II		III	
1 – 70	3	60,0%	0	0,0%	2	40,0% *
70 – 100	0	0,0%	6	100,0%	0	0,0% *
> 100	2	25,0%	3	37,5%	3	37,5% *
Média ± Desvio padrão	77,89 ± 31,33		97,82 ± 23,36		98,84 ± 39,61 **	

*Razão de verossimilhança, $p=0,101$

**Análise de Variância, $p=0,266$

Figura 27 – Distribuição do volume médio dos núcleos dos mastócitos neoplásicos pelo método do PSI de acordo com os graus histopatológicos, sendo estes volumes distribuídos em três grupos: $1-70\mu\text{m}^3$; $70-100\mu\text{m}^3$ e acima de $100\mu\text{m}^3$ ($p=0,101$; $p<0,05$; razão de verossimilhança) – FMVZ/USP-São Paulo–2006-2010

5.4.6 Relação do volume médio do núcleo pelo volume médio da célula pelo método do rotator planar vertical ($\bar{v}_N$ núcleo/ $\bar{v}_N$ cel)

A relação do volume médio do núcleo pelo volume médio da célula para cada paciente avaliado, estão inseridos na tabela 6. O valor médio desta relação foi de 0,176346 (0,15), com variação de 0,13 a 0,213. Os dados foram dicotomizados para melhor análise estatística. Os animais que apresentavam relação núcleo/célula até 0,15 foram agrupados no grupo A, no grupo B ficaram os que obtiveram valor entre 0,15 a - 0,17 e os do grupo C os que apresentaram valor maior que 0,17 na fração. A relação volume médio do núcleo pelo volume médio da célula não apresentou significância com a taxa de recidiva e óbito pelo teste de log-rank ($p=0,509$).

A distribuição de V_n núcleo/ V_n cel não é diferente em relação aos graus histológicos, não havendo associação entre as variáveis ($p=0,866$; $p>0,05$) através do teste de verossimilhança. Os graus histológicos são semelhantes em relação à

distribuição de valores da relação Vn núcleo/Vn cel, pela análise de variância ($p=0,711$; $p>0,05$) (Tabela 9 e Figura 28).

Tabela 9 - Distribuição frequências da relação do volume médios dos núcleos dos mastócitos pelo volume médio das células em função de cada grau do histopatológico e distribuição das médias e desvio padrão da relação dos volumes médios de núcleos dos mastócitos pelo volume médio das células para cada grau do histopatológico, segundo a classificação de Patnaik, Ehler; MacEwen (1984) – FMVZ/USP - São Paulo – 2006-2010

Vn nuc/Vn cell	Grau Histológico					
	I		II		III	
0 - 0,15	1	50,0%	1	50,0%	0	0,0% *
0,15 - 0,17	2	25,0%	4	50,0%	2	25,0% *
> 0,17	2	25,0%	4	50,0%	2	25,0% *
Média ± Desvio padrão	0,17 ± 0,03		0,18 ± 0,03		0,18 ± 0,02 **	

*Razão de verossimilhança, $p=0,866$

**Análise de Variância, $p=0,711$

Figura 28 – Distribuição da relação do volume médio do mastócito neoplásico pelo volume médio dos seus núcleos pelo método do Rotator de acordo com os graus histopatológicos, sendo estes volumes distribuídos em três grupos: 0-0,15; 0,15-0,17 e acima de 0,17 ($p=0,866$; $p>0,05$; análise de variância) – FMVZ/USP-São Paulo-2006-2010

5.5 MARCADORES IMUNOISTOQUÍMICOS

5.5.1 Marcadores de Ciclo Celular – Ki-67

Os casos foram divididos em dois grupos, definidos a partir da escolha de um valor arbitrário de corte entre a média e a mediana de todos os escores de $ki-67 < 6,0$, com menos de 6,0% de células positivas; e $ki-67 \geq 6,0$, com positividade maior igual a 6,0% (Figura 31).

Para os pacientes com escores $ki-67 < 6,0$, a taxa de mortalidade em função dos mastocitomas foi de 55,81% (24/43) contra 57,58% (19/33) para os casos de escore $ki-67 \geq 6,0$ (Tabela 10). Dos animais com morte relacionada ao tumor, 78,94% (15/19) dos caninos com escore de $ki-67 \geq 6,0$ tiveram óbito precoce, com menos de 12 meses, enquanto os animais com escore de $ki-67 < 6,0$ o óbito precoce foi de 25% (6/24). Houve uma forte associação entre os eventos combinados livre de óbito e recidiva das formações pelo teste de log-rank entre os animais que possuíam escore de $ki-67 \geq 6,0$ ($p=0,013$; $p<0,05$) (Figura 29). Em análise multivariada pelo método de Cox não foi observada uma correlação positiva, portanto não demonstrando a independência da variável como valor preditivo.

O teste do qui-quadrado mostrou que existe associação entre frequência de distribuição dos núcleos marcados com $ki-67$ e o grau histológico ($p=0,005$; $p<0,05$), tendo mais núcleos marcados por $ki-67$ quanto maior o grau histopatológico (Figura 30). Quando as medianas e seus valores mínimos e máximos dos grupos de $ki-67$ foram associados aos grupos marcados com KIT e a expressão gênica de *c-kit* e do seu ligante (*c-kit* LIG) não mostrou significância pelo método de Kruskal-Wallis ($p=0,788$; $p=0,633$; $p=0,585$; respectivamente; $p>0,05$).

Tabela 10- Distribuição das taxas de mortalidade, relacionadas ou não aos mastocitomas, em função dos escores de ki-67 para a totalidade de animais acometidos por mastocitoma. Porcentagens em relação ao total de casos de cada marcação. FMVZ/USP - São Paulo – 2006-2010

	Morte relacionada ao tumor	Morte não relacionada ao tumor	Vivos ao final do estudo	Total
Ki-67<6,0	24 (29,63%)	3 (3,7%)	19 (23,45%)	46 (56,78%)
Ki-67≥6,0	19 (23,46%)	2 (2,47%)	14 (17,29%)	35 (43,22%)
Total	43 (53,09%)	5 (6,17%)	33 (40,74%)	81 (100%)

Figura 29 - Curva de Kaplan-Meier de análise de sobrevida livre de recidiva dos casos estudados em função da marcação por Ki-67, padrão ki-67<6,0% e Ki-67≥6,0% (p=0,002, teste de log-rank), pontos=censura à direita

Figura 30 – Distribuição dos grupos de ki-67 de acordo com os graus histopatológicos, sendo estes grupos divididos de acordo com a porcentagem de núcleos marcados com ki-67; $ki-67 < 6,0\%$, $ki-67 \geq 6,0\%$ ($p=0,005$; $p<0,05$; método de qui-quadrado) – FMVZ/USP-São Paulo–2006-2010

Figura 31 - Fotomicrografias da marcação imunoistoquímica com Ki-67, com contra-coloração por hematoxilina, sendo (A) com núcleos marcados em menos de 6,0% das células, e (B) as com mais de 6,0% dos núcleos marcados. As flechas indicam os núcleos positivos para Ki-67. Objetiva de 40x

5.5.2 Expressão do KIT

Verificou-se a expressão dos padrões KIT-I em nove tumores (9/81, 11,11%); KIT-II em 50 formações (61,73%) e KIT-III em 22 (27,16%). Os padrões de marcação podem ser observados na figura 14. Dos animais que expressaram KIT I três pertencem ao grau I do histopatológico, quatro ao grau II e dois ao grau III. Dos pacientes que expressaram KIT II, cinco estavam incluídos nos animais de grau I; 34 nos de grau II e 11 nos de grau III. Enquanto dos animais que expressaram KIT III, sete eram do grau I, dez do grau II e cinco do grau III. Através do teste de log-rank para análise do tempo livre de óbito e recidiva não foi observada associação aos eventos combinados com os padrões de marcação do KIT ($p=0,680$, e $p>0,05$). Os padrões de imunomarcação do KIT estão representados na figura 33.

Dos animais que apresentaram óbito relacionado ao tumor seis (7,4%, 6/81) mostraram padrão KIT I, 26 (26/81, 32,1%) padrão KIT II de marcação, enquanto onze (11/81, 13,6%) padrão KIT III. Dos nove animais que demonstraram padrão KIT I, 66,67% (6/9) evoluíram para óbito relacionado ao tumor, enquanto que os que mostraram padrão KIT II foram somente 55,32% (26/47). O óbito relacionado ao mastocitoma ocorreu em 55% (11/20) dos pacientes com padrão de marcação KIT III (Tabela 11).

As medianas e valores mínimo e máximo do padrão de marcação do KIT não foi associado a expressão gênica do *c-kit* ($p=0,323$) e do seu ligante (*c-kit* LIG) ($p=0,115$) pelo método de Kruskal-Wallis. A frequência de distribuição dos padrões de marcação para KIT não foi diferente de acordo com o grau histopatológico pelo teste de verossimilhança ($p=208$; $p>0,05$) (Figura 32).

Tabela 11 - Distribuição das taxas de mortalidade, relacionadas ou não aos mastocitomas, em função dos padrões de marcação imunoistoquímica para KIT (segundo KIUPEL et al., 2004). Porcentagens em relação aos totais de casos para cada padrão de marcação. FMVZ/USP - São Paulo – 2006-2010

	Morte relacionada ao tumor	Morte não relacionada ao tumor	Vivos ao final do estudo	Total
KIT I	6 (7,41%)	0 (0,0%)	3 (3,7%)	9 (11,11%)
KIT II	26 (32,1%)	3 (3,7%)	21 (25,93%)	50 (61,73%)
KIT III	11 (13,58%)	2 (2,47%)	9 (11,11%)	22 (27,16%)
Total	43 (53,09%)	5 (6,17%)	33 (40,74%)	81 (100%)

Figura32 – Distribuição dos grupos de ki-67 de acordo com os graus histopatológicos, sendo estes grupos divididos de acordo com a porcentagem de núcleos marcados com ki-67; $ki-67 < 6,0\%$, $ki-67 \geq 6,0\%$ ($p=0,005$; $p<0,05$; método de qui-quadrado) – FMVZ/USP- São Paulo–2006-2010

Figura 33 - Fotomicrografias dos padrões de marcação imunoistoquímica do KIT, com contracoloração com hematoxilina. (A), Padrão KIT I; (B), Padrão KIT II; (C), Padrão KIT III; objetiva de 40x

5.6 EXPRESSÃO DO KIT POR PCR EM TEMPO REAL

A expressão do KIT e do seu ligante foi expressa em função da expressão de um dos animais (animal 53), que foi considerada igual a um. A nomenclatura dos animais foi de acordo com arquivos do Laboratório de Oncologia Comparada (Tabela 14). Foram analisadas 37 amostras de mastocitomas, selecionadas de forma aleatória, porém apenas 22 amostras demonstraram viabilidade de RNA, após a extração. Todos 22 animais mostraram maior expressão do que o animal modelo para o KIT e para o Ligante (Figura 34 e 35).

Tabela 12 - Distribuição dos animais de acordo com registro no Laboratório de Oncologia Comparada (LOC - VPT) e de acordo com a expressão gênica do *c-kit* e do Ligante de *c-kit*. FMVZ/USP - São Paulo – 2006-2010

Prontuário	Número de Registro		
	LOC	Exp. Gênica de <i>c-kit</i>	Ligante de <i>c-kit</i>
176974	52	6,132604871	22,84014651
179082	53*	1	1
170840	57	7,222508517	141,4844803
178403	58	0,1514066	11,22388323
125576	59	25,24629891	53,85468687
178675	61	26,8341819	23,68661277
181328	67	16,97100386	18,70043598
156092	68	7,748945514	5,692253845
181476	69	5,929868039	0,93400359
86699	70	3,356598548	5,72390608
180833	71	6,143241079	19,14638341
181697	72	12,60566218	20,29426239
182329	73	74,80174391	38,63937893
182644	74	6,56138329	15,19473912
135105	75	0,650896472	4,371110956
151626	76	0,514056913	2,264982651
181948	77	3,91768119	21,68311313
182142	80	1,884262548	16,84209848
174995	83	22,7059737	39,9188983
174600	84	15,54630693	5,623623463
185122	86	11,20056807	77,73540897
171469	88	17,40584561	17,66718155

*Animal base de comparação da expressão dos genes *c-kit* e ligante de *c-kit*, considerado o valor de expressão do gene igual a 1.

Figura 34 - Distribuição das expressões gênicas de *c-kit* em função da expressão do animal 53

Figura 35 - Distribuição das expressões gênicas do Ligante de *c-kit* em função da expressão do animal 53

Os dados acima foram analisados em função curva de sobrevida livre de recidiva, pelo teste de log-rank, não sendo observado associação entre estes eventos com a expressão gênica do *c-kit* ($p=0,289$; $p>0,05$), porém esta associação foi positiva com a expressão gênica do Ligante de *c-kit* ($p=0,010$; $p>0,05$) (Figura

36). Mas quando analisada de forma multivariada de Cox não apresentou valor preditivo independente.

Figura 36 - Curva de Kaplan-Meier de análise de sobrevida livre de recidiva dos casos estudados em função da expressão gênica do *c-kit* Ligante, sendo dicotomizado em função da média de expressão dos animais estudados, maior que 18 e menor que 18 ($p=0,010$, teste de log-rank), pontos=censura à direita

Dos animais avaliados acima, 59,1% (13/22) apresentaram recidiva das formações. O óbito foi constatado em 63,63% (14/22) dos animais, sendo 59,1% (13/22) relacionados ao tumor. Os casos em que evoluíram para o óbito foram os números 52, 58, 59, 61, 67, 68, 69, 70, 73, 74, 76, 80, 84 e 86, sendo o número 73 não relacionado ao tumor. Dentre estes casos que evoluíram para óbito relacionado ao mastocitoma, um pertencia ao padrão KIT I, nove ao KIT II e três ao KIT III. Os animais que apresentaram recidivas foram os números 52, 58, 59, 61, 68, 69, 70, 74, 75, 76, 80, 84 e 88. As médias de cada grupo para expressão de *c-kit* e o ligante de *c-kit* (LIG) são: KIT I – 16,95327 para *c-kit* e 58,82719 para LIG; KIT II - 14,193151 para *c-kit* e 25,324439 para LIG; KIT III - 6,98673 para *c-kit* e 15,387511 para LIG (Tabela 13).

Tabela 13 - Expressão gênica média de c-kit e do seu ligante de acordo com a classificação por padrão de marcação do KIT em imunoistoquímica. FMVZ/USP - São Paulo – 2006-2010

	c-kit	Desvio Padrão	Coeficiente de Variância	Ligante de c-kit	Desvio Padrão	Coeficiente de Variância
KIT I	16,95327089	8,1355503	2,08385053	58,82715364	26,74031114	2,199942751
KIT II	14,1931483	19,006622	0,746747516	25,32444374	34,78883515	0,727947447
KIT III	6,986736772	9,3013275	0,751154797	15,38751181	20,17475174	0,762711334

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Os animais avaliados neste estudo eram provenientes da casuística do Serviço de Cirurgia de Pequenos Animais do Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. A pesquisa foi desenhada de forma prospectiva, com acompanhamento clínico dos animais em retornos posteriores ao procedimento cirúrgico. Para que fossem incluídos na pesquisa estes pacientes deveriam ter diagnóstico de mastocitoma por citologia por agulha fina confirmados com histopatológico. Os proprietários precisavam aderir ao procedimento cirúrgico e após a excisão das formações, os pacientes tiveram acompanhamento pós-operatório de no mínimo 12 meses. Por este motivo alguns casos foram descartados do estudo. A casuística utilizada não reflete a totalidade dos casos atendidos, portanto não pode ser tomada como base epidemiológica.

Por ser um estudo prospectivo, não tivemos muitas dificuldades no acompanhamento dos casos clínicos, pois estes animais foram atendidos por estes pesquisadores e em sua maioria foram sempre reavaliados. Quando os animais não retornavam na data marcada para avaliação, obtivemos informações por telefone dos proprietários e quando possível, uma nova data era marcada para o acompanhamento deste paciente. Este fato é contraditório ao encontrado por outros autores, que relatam dificuldades de acompanhamento dos casos, pela dificuldade de contato telefônico e mau preenchimento de prontuários (KIUPEL et al., 2005; TRUMEL et al., 2005; STREFEZZI, 2007).

Neste trabalho consideramos como recidiva os tumores que retornaram no mesmo local donde haviam sido excisados e também as novas ocorrências de tumor em outros locais da pele destes animais, porém excluindo a metástase para os linfonodos ou outros órgãos abdominais, que foram considerados eventos distintos. Não existe um consenso na literatura se as novas ocorrências ou os tumores múltiplos são metástases de uma formação original ou não (SEGUIN et al., 2001), por isso definiu-se como recidiva e não metástase as novas ocorrências em locais diferentes da original.

Este capítulo foi dividido de acordo com a divisão proposta nos resultados.

6.1 CASOS CLÍNICOS

Foram selecionados 81 cães que preenchiam os critérios acima citados. Na totalidade obtivemos 148 formações de localizações variadas, com a maioria dos animais apresentando formação única (60,5%) e 39,5% com múltiplas formações, incidência esta maior que a descrita pela literatura de 3 a 14% (MACY, 1985; O'KEEFE, 1990; SIMOES et al., 1994). A localização mais comum foi em membros pélvicos (36,5%), seguida pela região de tórax (16,14%) e flanco (11,5%), bolsa escrotal (7,5%), cervical (6,1%) e poucos exemplares em região de cabeça e períneo (4,7% cada), lombar (2,7%), abdome (2%) e dígito (1,3%), contrapondo os dados de literatura que citam que os locais mais comuns são tronco e períneo, seguido das extremidades e depois por cabeça e pescoço (O'KEEFE, 1990; FOX, 1998). Isto pode ter ocorrido devido a seleção dos casos clínicos, onde os animais deveriam estar aptos a intervenção cirúrgica, excluindo alguns cães que já apresentavam maior comprometimento de linfonodos e não tinham indicação para o procedimento cirúrgico. Portanto, a porcentagem da casuística do trabalho não reflete a realidade da incidência deste tumor no referido hospital.

As raças mais acometidas foram os Boxers (39,5%), fato este que é previsto pela literatura, que relata uma predisposição hereditária para os animais originários dos Bulldogs (O'KEEFE, 1990; SIMOES et al., 1994; LEMARIÉ et al., 1995; FOX, 1998; LONDON; SEGUIN, 2003; MISDORP, 2004; COSTA et al., 2007; STREFEZZI, 2007; COSTA-CASAGRANDE et al., 2008). Houve uma grande proporção de cães sem raça definida (16,05%) diagnosticados como portadores de mastocitoma. Os animais sem raça definida são pouco citados na literatura e, tal achado, no presente estudo, pode ser explicado pela predominância de mestiços na casuística do Serviço de Cirurgia de Pequenos Animais – HOVET. Quanto à avaliação do prognóstico, a raça do animal não foi observada como um bom indicador, diferente do que muitos autores citam, onde indicam menor índice de óbito e predisposição a recidiva para raças como boxer e outros braquicefálicos, pois estes animais tendem a desenvolver tumores de grau I ou II (BOSTOCK et al., 1973). Outros autores também citam uma maior predisposição a óbito e recidiva de raças como golden retriever, labradores e shar-peis, pois estes animais tendem a desenvolver tumores múltiplos e de mais alto

grau histopatológico (BOSTOCK et al., 1973). Contudo, não pudemos observar esta relação em nosso trabalho, que não classificou nenhuma raça como mais predisposta a ter má evolução dos mastocitomas. Dividimos as raças para análise de sobrevida em raças que possuem Bulldogs como ancestrais e não descendentes de Bulldogs, o que pode ter sido o motivo pelo qual não encontramos relação com a indicação do prognóstico. Costa et al. (2007) também não correlacionam a raça com o prognóstico destes animais, tendo realizado a mesma divisão das raças.

Não foi verificada predisposição sexual relacionada à ocorrência do mastocitoma em cães, fato esse, também relatado por outros pesquisadores (O'KEEFE, 1990; SIMOES et al., 1994; GOVIER, 2003; LONDON; SEGUIM, 2003; PREZIOSI et al., 2007; COSTA-CASAGRANDE et al., 2008). Porém, alguns autores verificaram uma maior susceptibilidade em cães machos e fêmeas ovariectomizadas a desenvolverem tumores viscerais, sugerindo alguma influência hormonal (TAKAHASHI et al., 2000), entretanto a dosagem de progesterona e estrógeno não confirmaram maior expressão destes hormônios nos tumores viscerais ou cutâneos (GERRITSEN et al., 1998). Outros pesquisadores verificaram esta maior predisposição em fêmeas ao aparecimento de mastocitomas cutâneos (SIMOES et al., 1994).

Uma ampla faixa etária acometida foi diagnosticada neste estudo, porém com uma maior incidência em animais idosos, o que também foi observado por O'Keefe (1990). A faixa etária variou entre três a 17 anos, a mesma relatada por Thamm e Vail (2007), que diagnosticaram essa afecção em cães de 3 semanas a 19 anos de idade. A maior incidência ficou entre sete e nove anos de idade (43,2%), semelhante ao intervalo proposto por Macy (1985) e London e Seguin (2003) que foi de 8 a 9 anos.

As variáveis sexo, localização, raça e quantidade de formações não foram associados aos eventos combinados óbito e tempo livre de recidiva, o que corrobora com os achados de Cahalane et al. (2004), que citam que não há piora de prognósticos em tumores localizados em região inguinal e perineal. Stamclift e Gilson (2008) também não encontraram associação da localização com a piora da sobrevida e maior taxa de recidiva. Porém, a literatura cita uma maior malignidade dos tumores localizados nesta região, as neoplasias localizadas em membros e região do tronco (O'KEEFE, 1990; FOX, 1998), assim como em tumores localizados

em região de cabeça e pescoço e região de bolsa escrotal, que referem possuir menor tempo de sobrevida e uma maior predisposição a recidiva e metástase (GIEGER et al., 2003; KIUPEL et al., 2005), assim como os tumores localizados em regiões de junção muco-cutânea (THAMM; TUREK; VAIL, 2006). Sfiligoi et al. (2005) observaram que o intervalo de tempo livre de doença foi de 9,6 meses para os animais com tumores localizados em região inguinal e períneo e de 33,9 meses para os localizados em outras regiões na pele, portanto estes autores sugerem que quando existirem tumores nas regiões inguinais e perineais deve-se considerar um prognóstico mais reservado. Já Kiupel et al. (2005) encontraram uma piora da sobrevida e maior taxa de recidiva para os tumores localizados na cabeça e pescoço, porém não de forma independente, segundo análise multivariada. Há grande quantidade de locais citados como mais predispostos ou com piora do prognóstico, porém a grande maioria dos trabalhos, quando encontram associação da localização com o prognóstico, não descreve o mesmo local, o que dificulta a interpretação dos resultados e a reprodutibilidade das informações.

Al-Sarraf et al. (1996) testaram as variáveis idade, sexo, raça, localização e número de procedimentos cirúrgicos em relação ao período de sobrevida dos animais, mas não obtiveram diferenças estatísticas significantes, o que corrobora com os achados desta pesquisa. Porém, Kiupel et al. (2005) relataram tendências de animais idosos, da raça Boxer, apresentarem recidiva à distância, e de machos idosos tiveram sobrevidas menores. A diferença entre as outras raças pode não ter sido observada devido ao baixo número de representantes das demais raças, o que foi descrito por Simoes et al. (1994). Cahalane et al. (2004) também observaram uma piora na sobrevida de animais idosos, confirmado em nosso estudo, onde os pacientes mais idosos (acima de 10 anos) apresentaram maior taxa de recidiva e óbito. Porém não é um evento independente, portanto não se pode afirmar que cães idosos terão uma evolução ruim, sem que haja associação com outras variáveis.

6.2 – EVOLUÇÃO DOS CASOS CLÍNICOS

Os animais selecionados para esta pesquisa foram acompanhados por no mínimo 12 meses, sendo alguns deles tiveram mais de 40 meses de seguimento. Estabelecemos este critério mínimo de acompanhamento, pois muitos estudos anteriores fixaram este período como suficiente para obtenção de informações a respeito da evolução desta neoplasia (DAVIES et al., 2004; KIUPEL et al., 2005; TRUMEL et al., 2005; THAMM et al., 2006; OZAKI et al., 2007; PREZIOSI et al., 2007). No entanto, sugerimos que o período de seguimento, quando possível seja maior, pois muitos animais ainda se encontram vivos e sem recidiva neste período, com evolução mais tardia. O tempo de sobrevida média global foi de 18,32 meses, portanto maior que o período de seguimento mínimo estabelecido. Em nosso trabalho a maioria dos animais teve período de seguimento superior a 18 meses, sendo apenas 15 animais com período menor (entre os animais que se encontraram vivos após este período), o que, na opinião dos autores, valida ainda mais os dados. Muitos dos animais não apresentaram recidiva neste período de acompanhamento, o que faz pensar que o tempo seja curto para detectar a recidiva em todos os pacientes.

A abrangência das formações também não demonstrou correspondência estatística com a taxa de recidiva e óbito, corroborando com os achados de Kiupel et al. (2005) não encontraram diferenças de sobrevida na diferentes formas de apresentação do mastocitoma. Isso não corresponde com o estudo realizado por Newman et al. (2007) que observaram um prognóstico mais favorável para os tumores localizados no tecido subcutâneo comparado aos localizados na derme. Este autor também cita que nestes tumores subcutâneos não houve aumento da taxa de recidiva dos tumores incompletamente excisados, que permaneceram com margens cirúrgicas contaminadas. Simpson et al. (2004) sugerem que não há necessidade de terapia complementar para a maioria (89%) dos tumores localizados no subcutâneo, pois nenhuma recorrência ou metástase foi observada por estes autores nos 21 cães estudados em 603 dias de acompanhamento médio. Apesar de não termos encontrado significância estatística nesta variável, observamos que 71%

dos animais que possuíam mastocitoma dérmico evoluíram para óbito ou recidiva, enquanto apenas 50% dos tumores subcutâneos tiveram esta evolução.

Em nossa pesquisa também não encontramos piora de prognóstico em animais que permaneceram com margens cirúrgicas contaminadas. As margens encontraram-se livres em 56,8% dos casos avaliados, no entanto dos 35 tumores com margens estreitas ou comprometidas, apenas 17 apresentaram recidiva e 22 evoluíram para óbito. O tempo de seguimento para avaliar recidiva das formações pode ter sido muito curto, pois Michels et al. (2002) afirmaram que a frequência de recorrência nos casos com margens completamente excisadas foi significativamente menor comparado aos animais com margens comprometidas, por um período de 24 meses, o dobro do tempo de acompanhamento realizado neste estudo. Porém, Ozaki et al., (2007) realizaram um estudo prognóstico ao longo de mais de 36 meses com animais apresentando mastocitoma grau II com margens livres ou contaminadas, não observaram diferença estatística na taxa de mortalidade entre estes animais. Stanclift e Gilson (2008) também realizaram um estudo prospectivo, com acompanhamento mínimo de 24 meses e não encontraram associação das margens comprometidas ou estreitas com maior taxa de recidiva e óbito. Em estudo anterior, onde analisou o prognóstico de mastocitomas em região inguinal e perineal, Cahalane et al. (2004) também não encontraram essa associação com a sobrevida e a taxa de recorrência. Murphy et al. (2004) demonstraram que na maioria dos cães com grau intermediário ou bem diferenciado de tumor a falha de uma excisão definitiva das margens da neoplasia não teve efeito na sobrevida e sugeriram que as margens limpas não são pré-requisito para um bom prognóstico destes tumores. Porém, alguns autores encontram esta relação de maior recorrência e metástase, quando comparada aos tumores com excisões completas (SEGUIN et al., 2001; OZAKI et al., 2007).

Existe muita controvérsia sobre a taxa de recorrência local após a excisão de mastocitomas. Esta taxa varia de 10% a 50% na literatura (BOSTOCK, 1973) e para o grau II isto é reportado como sendo maior que 50% (MACY, 1984; AL-SARRAF et al., 1996), mas o status das margens cirúrgicas não é descrito na maioria destes estudos. Não há consenso se as formações em locais diferentes do original fazem parte de um novo evento, são parte da doença sistêmica ou representam metástases da formação original, porém o fato de poucas destas formações

evoluírem para metástase visceral, segundo Davies et al. (2004), e que os tumores múltiplos não possuem pior prognóstico, a maior probabilidade é de que estes sejam novas ocorrências de tumores primários e não doença metastática. Também observamos que não existe uma definição objetiva do que são margens comprometidas na literatura, sendo discutida por muitos patologistas esta definição. Existe uma hipótese de que células normais de mastócitos são recrutadas ou proliferam na periferia do tumor, como resultado da degranulação de citocinas pelas células de mastócitos neoplásicos (MURPHY et al., 2004). Isto pode sugerir que o sistema imune está querendo atacar a doença microscopicamente (MISDORP, 1987) e isto ser responsável pela limpeza das células neoplásicas residuais após a intervenção cirúrgica (PREZIOSI et al., 2007).

O volume tumoral apresenta significado prognóstico no momento do diagnóstico. Isto pode ser explicado por maior dificuldade de excisão de toda formação (O'KEEFE, 1990; LONDON; SÉGUIN, 2003). Este fato foi observado no presente trabalho, que encontrou correlação significativa entre o volume do tumor e o seu prognóstico, portanto os animais que apresentam mastocitomas de grandes volumes podem ter uma maior taxa de recidiva e óbito, porém não pode ser avaliado de forma independente. Esta associação pode ocorrer por estes tumores serem mais infiltrativos e pela dificuldade de remoção destes grandes volumes, não garantindo sua remoção completa.

No entanto, quando comparamos os eventos combinados tempo livre de recidiva e óbito com o diâmetro do tumor (maior ou menor que três centímetros) não encontramos associação, o que corrobora com os achados de Thamm, Turek e Vail (2006), porém discorda de Hahn, King e Carreras (2004) que associaram o tamanho do tumor com o prognóstico. Porém encontramos associação desta dimensão tumoral com a taxa de óbito, mas não com a recidiva. Portanto, o diâmetro do tumor acima de 3 cm tem influência no tempo de sobrevida destes animais acometidos. Isto era esperado, visto que o volume tumoral total (V_{ref}) tem significância estatística com o prognóstico, apesar dos métodos de avaliação serem diferentes, sendo o diâmetro mensurado com paquímetro, enquanto o volume foi estimado pelo peso tumoral dividido pela densidade específica do tumor.

O tempo de evolução das neoplasias também não foi demonstrado como um bom indicador de prognóstico na presente pesquisa, diferentemente do relatado por

outros autores que indicam que tumores com mais de 28 semanas de evolução possuem uma sobrevida maior aos com menor tempo de desenvolvimento (BOSTOCK, 1973; LONDON; SÉGUIN, 2003). Porém, este fato pode ser mal interpretado, pois proprietários que são mais cuidadosos podem trazer seus animais antes para atendimento, não deixando o desenvolvimento das formações. Isto pode ter influenciado na interpretação estatística dos resultados.

Foi testada a influência de algumas características da formação como indicadores de prognóstico. Pode-se observar que a presença de alopecia, sensibilidade ou hiperpigmentação, e base de inserção séssil ou pedunculada do tumor não exercem influência estatística no prognóstico dos mastocitomas caninos. Fato este não descrito na literatura. Os diferentes padrões de formato e consistência fizeram com que Welle et al. (2008) chamassem o mastocitoma de “o grande mentiroso”, pela sua capacidade de se assemelhar na aparência com várias neoplasias. Porém, outras características como a presença de sangramento, consistência macia ou firme, velocidade de crescimento, presença de aderência a planos profundos, eritema, aumento de temperatura e presença de ulceração, tiveram uma forte associação estatística com o intervalo livre de neoplasia e óbito dos animais com mastocitoma. A velocidade de crescimento mostrou-se indicador prognóstico importante, com 79% de óbito ou recidiva nos tumores com crescimento rápido, 61% nos estáveis e 59% nos de crescimento lento. Bostock (1973) e Preziosi et al. (2007) descreveram fato semelhante, sendo os tumores com crescimento mais lento com melhor prognóstico, enquanto os que apresentavam crescimento mais acelerado determinaram menor tempo de sobrevida livre de recidiva.

Os tumores com crescimento mais rápido, aderidos, eritematosos, com temperatura superficial aumentada e ulcerado apresentaram-se com um pior prognóstico. Porém, em uma análise multivariada, estas variáveis não se demonstraram como fator associado independente, sendo sugerida a avaliação sempre em conjunto com outras variáveis.

A taxa de crescimento tumoral também foi estudada por Bostock (1973) sendo encontrada associação positiva entre esta taxa e o tempo de sobrevida livre de tumor, porém não encontramos os mesmos valores neste estudo. Dividimos o volume do tumor pelo tempo de evolução da neoplasia, que foi o período desde a observação do tumor até a intervenção cirúrgica e depois reagrupamos estes valores

em três grupos: menor que 0,5 cm ao mês, entre 0,5 e 1,0 cm ao mês e maior que 1 cm ao mês. Quando observada a avaliação da taxa de óbito com esta variável, notou-se que quase existiu uma associação ($p=0,054$). Este fato pode ter ocorrido por alguma variação na subdivisão realizada. Também não foi encontrado associação desta taxa de crescimento com a recidiva do tumor.

O fato da presença de aderência dos tumores estar relacionada à pior prognóstico é provavelmente porque estes tumores têm maior dificuldade de remoção por completo e geralmente são tumores mais infiltrativos, piorando o prognóstico (THAMM; VAIL, 2007). A consistência mais macia está associada a tumores com maior quantidade de colágeno, enquanto os tumores mais firmes possuem maior concentração de mastócitos, o que pode piorar o prognóstico. Porém esta associação não foi pesquisada, ficando a sugestão para busca desta interpretação. Não foram encontrados dados na literatura que justifiquem esta hipótese. Os tumores com superfície irregular foram associados a pior prognóstico. Acreditamos que pode estar relacionado ao crescimento mais desorganizado do tumor e a maior proliferação celular. Também não foram encontrados dados que sustentem esta hipótese.

Os tumores inflamados geralmente estão associados a eritema e aumento de temperatura local. A inflamação é um sinal sistêmico da evolução da formação, que também está associado ao prognóstico mais pobre. A ulceração pode ocorrer por excesso de degranulação de histamina e enzimas proteolíticas, provocando prurido local e conseqüentemente o animal passa a lamben ou coçar o local da formação, provocando ulceração, sem ter relação com o crescimento real do tumor. O desenvolvimento acelerado da neoplasia também pode provocar necrose e ulceração, que pode ser observado nos exames de histopatologia (LEMARIÉ et al., 1995; THAMM; VAIL, 2007). Mullins et al. (2006) e Welle et al. (2008) também descrevem piora de prognóstico nos tumores com presença de ulceração, eritema e prurido. A maioria das variáveis com significância estatística encontradas neste trabalho são resultado da degranulação dos mastócitos, levando a síndromes paraneoplásicas como a presença de sangramento, eritema, ulceração, aumento de temperatura. Existe associação entre tumores que apresentam maior degranulação com a malignidade. Os mastocitomas mais agressivos contêm 25 a 50 vezes mais histamina plasmática que os menos agressivos. Além disso, cães com mastocitoma

possuem níveis de histamina plasmática mais alta e concentração de gastrina mais baixa a cães sem este tipo de neoplasia. A histamina plasmática e a concentração de gastrina foram associadas ao estadiamento do tumor, grau histopatológico e tamanho do tumor (FOX et al., 1990; ISHIGURO et al., 2003; WELLE et al., 2008).

Os sinais clínicos sistêmicos são inespecíficos e podem estar associados aos mastocitomas viscerais, onde é mais comum encontrarmos pacientes com envolvimento gastrointestinal (TAKAHASHI et al., 2000). A presença de doença sistêmica, como anorexia, vômito, ulceração gastrointestinal e melena, geralmente é associada a neoplasias mais agressivas, que cursam com uma maior taxa de recidiva e óbito (THAMM; VAIL, 2007). Estes dados foram encontrados neste trabalho, onde houve associação de uma maior taxa de recidiva e óbito com a presença de sinais clínicos sistêmicos. A análise multivariada mostrou a independência da variável, podendo-se afirmar que quando o animal apresenta sintomatologia sistêmica em decorrência do mastocitoma é provável que venha a apresentar recidiva das formações e/ou óbito, independente do resultado das outras informações coletadas.

O estadiamento clínico estabelecido pela Organização Mundial de Saúde classifica os tumores em cinco estádios, com subdivisões de acordo com a sintomatologia clínica, indicando um pior prognóstico conforme aumenta o estágio do tumor (THAMM; VAIL, 2007). Em nosso estudo também encontramos associação do estadiamento clínico dos pacientes com o prognóstico dos animais através do tempo livre de recidiva e óbito, mas não correspondendo a um evento independente, quando submetido à análise multivariada. Porém, Séguin et al. (2001) contestam a eficácia do estadiamento clínico, pois observaram que não há evidência de que animais com formações múltiplas de mastocitoma possuem pior prognóstico a tumores estadiados em 1 e 2. Estes autores também contestam o fato de que apenas a citologia dos linfonodos ou órgãos abdominais possam significar envolvimento tumoral e seja suficiente para caracterizar uma metástase, pois tanto os linfonodos como o fígado, baço e outros órgãos possuem mastócitos circulantes normalmente. Os critérios de inclusão dos tumores nos respectivos estádios não são muito bem definidos.

A presença de múltiplos nódulos está relacionada com piores prognósticos (LONDON; SEGUIN, 2003; KIUPEL et al., 2005; PREZIOSI et al., 2007), fato este

não confirmado pelos estudos estatísticos deste trabalho, que não encontraram piora do prognóstico, através da análise de sobrevida livre de recidiva. Corroborando com os achados de Murphy et al. (2006) e Newman et al. (2007), que não atribuem prognósticos mais reservados aos animais com múltiplos nódulos e concorda com a afirmação de Séguin et al. (2001) que refere não haver bons critérios para estabelecimento do estadiamento, que leva em consideração o número de formações e a presença de linfonodos comprometidos, além da abrangência. Mas talvez o conjunto dos critérios consiga ajustar as variáveis e obter um bom indicador, que não é independente de outros eventos. Porém Kiupel et al. (2005) encontraram piora do prognóstico em animais com múltiplas formações, discordando dos achados acima. Estes autores também observaram uma maior quantidade de animais da raça Boxer desenvolvendo múltiplos mastocitomas, além do Boxer, os animais idosos também tendem ao mastocitoma multicêntrico, porém ambos não associados o pior prognóstico. Estes autores explicam esta mais alta tendência à multiplicidade de formações com maior presença de mutações no DNA genômico destes animais, sendo mais fácil o desenvolvimento de câncer em geral, porém a análise destas mutações não foi realizada para confirmar esta hipótese. Welle et al. (2008) sugerem que se realize uma nova categorização do estadiamento clínico do mastocitoma cutâneo, porém ainda não existe consenso sobre os procedimentos de estadiamento e vários autores utilizam seus critérios próprios para interpretação.

Não encontramos diferenças significativas de prognósticos entre os animais que apresentavam linfonodos comprometidos antes da cirurgia e os que estavam com linfonodos normais. A citologia e a simples inspeção não são taxativas, para afirmarem se o que está ocorrendo é metástase, assim não se deve utilizar este fator como indicador de prognóstico, porém ele deve ser investigado (SÉGUIN et al., 2001). Krick et al. (2009) discorda dos autores anteriores, afirmando que a citologia dos linfonodos tem boa associação com a evolução clínica e o grau histopatológico. Langenbach et al. (2001) encontraram uma sensibilidade de 93% entre a palpação de linfonodos alterados e a presença de metástase, fazendo com que Davies et al. (2004) considerassem qualquer linfonodo alterado como suspeito para metástase. Já Marconato et al. (2008) utilizaram a morfometria para avaliar micrometástase nos linfonodos e correlacionaram a presença destas micrometástases com a piora do prognóstico destes animais. Cahalane et al. (2004) também não encontraram

relação do linfonodo aumentado com piora na sobrevida livre de recidiva na análise multivariada, porém positiva na análise univariada. A presença destes linfonodos alterados não influenciou a recorrência dos tumores, segundos estes mesmos autores, sendo este dado semelhante ao que encontramos neste trabalho, onde existe associação do linfonodo aumentado com o óbito, porém sem relação com a taxa de recidiva. Isto pode ser explicado pelo fato de o comprometimento do linfonodo ser devido a metástase local ou regional destes tumores, entretanto não implica em novas ocorrências de mastocitoma na pele.

A metástase e os tumores recorrentes apresentam um prognóstico pior quando comparados com tumores primários (CAHALANE et al., 2004; STEFANELLO et al., 2009), necessitando de uma terapia mais agressiva (THAMM; VAIL, 2007). Encontramos associação entre o óbito e o tempo livre de neoplasia para os animais que apresentavam metástase, significando que a presença de metástase está associada a piora de prognóstico, sendo também um evento independente. Stefanello et al. (2009) também observaram que mastócitos infiltrados em baço e/ou fígado têm redução no tempo de sobrevida livre de óbito. No entanto a definição de metástase é difícil de estabelecer, pois a punção por agulha fina sozinha não pode avaliar se há ou não a presença de mastócitos nos linfonodos, baço ou fígado. Nenhum dos animais apresentou metástase para os pulmões ou tórax, o que corrobora com os dados de literatura que afirmam que os principais locais de metástase dos mastocitomas são os linfonodos regionais e distantes, baço e fígado (MACY, 1985; O'KEEFE, 1990; FOX, 1998; THAMM; VAIL, 1998; GIEGER et al., 2005; STEFANELLO et al., 2009).

O real potencial de metástase do mastocitoma é desconhecido, porém sabe-se que tumores com grande infiltração local e tumores indiferenciados têm maior chance de ocorrer metástase, 55 a 96% de chance, levando a menos tempo de sobrevida.

O tratamento com cirurgia isolada ou em combinação com a quimioterapia não influenciou o tempo de sobrevida livre de recidivas dos animais deste estudo. Alguns autores referem que a cirurgia completa, isoladamente garante o sucesso do tratamento de tumores de baixa graduação histopatológica, na maioria dos mastocitomas subcutâneos e localizados em região inguinal e perineal (SEGUIN et al., 2001; CAHALANE et al., 2004; NEWMAN et al., 2007; STAMCLIFT; GILSON,

2008). Kodre et al. (2009) indicam a eletroquimioterapia como tratamento efetivo para mastocitomas pequenos, principalmente os localizados em áreas de difícil acesso cirúrgico. Porém para tumores alto grau histopatológico e de grau intermediário com alto risco (linfonodo positivo ou em membrana mucosa) geralmente somente a terapia local não é suficiente para o ótimo controle da neoplasia (THAMM; TUREK; VAIL, 2006; COOPER et al., 2009; TAYLOR et al., 2009).

Os animais que receberam quimioterapia no pós-operatório não demonstraram menores taxas significativas de óbito e recidiva das formações no presente estudo. Cahalane et al. (2004) relataram não haver diferenças estatísticas de sobrevida e tempo livre de neoplasia entre os animais que foram tratados apenas com cirurgia, os animais tratados com cirurgia e radioterapia, e os animais tratados com cirurgia e quimioterapia adjuvante. Os autores indicam que a quimioterapia deva ter seu uso restrito aos animais com neoplasias sistêmicas ou inoperáveis, e mastocitomas grau III, pois a toxicidade sistêmica pode reduzir o tempo de sobrevida dos animais. Já Thamm; Turek; Vail (2006) e Webster et al. (2008) encontraram incremento no prognóstico dos animais que receberam vimblastina associada a prednisona como tratamento adjunto à intervenção cirúrgica, assim como nos animais que receberam radiação nos linfonodos alterados, também melhorando seu tempo de sobrevida livre de óbito. O que corrobora com Davies et al. (2004) que encontraram menores taxas de recorrência no período entre 12 e 24 meses de pós-operatório em pacientes com tumores incompletamente excisados seguidos de quimioterapia com prednisona e vimblastina aos que não receberam esta terapia adjunta. Porém estes autores afirmam que as recorrências distantes do local original não são evitadas com a quimioterapia, tendo 25% de recorrência à distância nos casos que foram submetidos a quimioterapia com vimblastina e prednisona, apesar de ter reduzido a recorrência local. Os principais efeitos colaterais observados, neutropenia, gastroenterite e hepatotoxicidade também são relatados por outros autores (LONDON; SEGUIN, 2003; CAHALANE et al., 2004; DAVIES et al., 2004; GIEGER et al., 2005; TUREK et al., 2005; THAMM; VAIL, 2007). Cahalane et al. (2004) referem piora do tempo de sobrevida dos animais que receberam quimioterapia com lomustina, principalmente relacionado aos efeitos colaterais deste quimioterápico, como a mielossupressão e hepatotoxicidade, tendo a indicação de

uso apenas para os casos mais avançados da doença e restringindo seu uso por curto período, a fim de evitar as toxicidades. Cooper et al. (2009) utilizaram a vimblastina em combinação com a lomustina em dose mais baixa (50 a 60 mg/m²) e referem ter havido aumento do tempo de sobrevida livre de óbito, com baixa toxicidade, indicando seu uso para os tumores mais avançados.

6.3 GRADUAÇÃO HISTOPATOLÓGICA

No processo de caracterização dos mastocitomas por técnicas mais avançadas como morfometria e técnicas moleculares, trouxe a realidade que muitos fatores estão envolvidos no prognóstico (PREZIOSI et al., 2004). Várias tentativas de previsão já foram realizadas, como estadiamento clínico (VAIL et al., 1996), taxa de crescimento tumoral (BOSTOCK, 1973); atividade proliferativa (SIMOES et al., 1994; ABADIE et al., 1999); morfometria (STREFEZZI et al., 2003; MAIOLINO et al., 2005) angiogênese intratumoral (PREZIOSI et al., 2004), avaliação de mutação do *c-kit* (RIVA et al., 2005). Entretanto, a graduação histopatológica permanece sendo o critério prognóstico mais frequentemente utilizado na rotina clínica, por ser consistentemente efetivo como valor prognóstico, por sua facilidade de ser realizado em simples lâminas de H&E, e por seu baixo custo de realização do exame. Apesar das contradições sobre a graduação histopatológica como indicador de prognóstico, este método tradicional ainda é o mais amplamente utilizado pela maioria dos autores e na prática clínica (MACY, 1985; THAMM & VAIL, 2001; STREFEZZI et al., 2003; MISDORP, 2004). Porém alguns parâmetros subjetivos interferem na interpretação dos resultados entre os observadores. Isso muitas vezes pode levar a não aplicação de um tratamento exato.

A graduação histopatológica das lesões ainda encontra desafios na avaliação de situações limítrofes entre os diferentes graus. Com relação aos mastocitomas, observa-se que parte dos tumores de grau II comporta-se como mastocitomas grau I, enquanto outros como grau III. Isto significa que alguns tumores têm seus potenciais de agressividade subestimados e outros recebem tratamentos

potencialmente tóxicos de maneira desnecessária. Northrup et al. (2005) sugeriram que uma nova classificação, em mastocitomas de alto ou baixo-grau seria mais consistente e de maior significado prognóstico. Já Preziosi et al. (2007) demonstrou que a avaliação individual de parâmetros do critério histológico, como o grau de invasão e número de figuras mitóticas, mostraram grande sensibilidade com o prognóstico e consequentemente pode ser usado para a previsão da evolução dos animais com mastocitoma, além de parâmetros mais subjetivos como diferenciação celular, morfologia nuclear e padrão de coloração das células tumorais. Thamm, Turek e Vail (2006) observaram que a maioria dos pacientes com tumores de grau intermediário de alto risco conseguiram longo tempo de controle tumoral com cirurgia associada a quimioterapia, sugerindo que o grau deve ser fator prognóstico mais efetivo que a localização ou a presença de linfonodos comprometidos. Isto corrobora com nossos achados de que linfonodos alterados e a localização não influenciaram no tempo de sobrevida livre de recidiva.

A mortalidade relacionada ao tumor foi de 33,33% dentro do grau I (5/15), 49% no grau II (25/51) e maior para os mastocitomas de grau III (86,66%, 13/15). Como relatado por outros autores, houve associação estatística do grau histológico com o tempo livre de tumor e óbito (STREFEZZI et al., 2003; MISDORP, 2004; SCASE et al., 2006; THAMM; TUREK; VAIL, 2006; WEBSTER et al., 2007; STAMCLIFT; GILSON., 2008), contudo contrariando com os autores que contestam a eficácia do método para predição do prognóstico (SIMOES et al., 1994; KIUPEL et al., 2005; NORTHROP et al., 2005). Em nosso trabalho encontramos a graduação histopatológica como valor preditivo independente para óbito e recidiva separadamente, na análise multivariada, porém sem diferença de risco do grau II para o grau I e com 3,369 vezes mais risco de recidiva e 3,057 vezes mais risco de óbito dos tumores de grau III em relação ao I. Porém não encontramos uma boa interpretação para o grau II, que permanece sendo o maior desafio.

A porcentagem de recidiva identificada para os animais de grau II foi dentro do esperado para este grau histopatológico (48%), corroborando com o relatado pela literatura (16 a 53,6%) (SEGUIN et al., 2001; SEGUIN et al., 2006; STAMCLIFT et al., 2008). A taxa de recorrência e óbito pode estar aumentada em estudos prospectivos, pois os proprietários destes animais são mais assíduos e

disponibilizam mais informações aos médicos veterinários (STAMCLIFT; GILSON, 2008).

As análises histológicas foram realizadas pelo Serviço de Patologia Animal - HOVET - FMVZ/USP, geralmente pelo mesmo profissional, minimizando que houvesse diferenças de interpretação inter-observadores. Porém, uma maior quantidade de tumores classificados como grau II (62,97%) foi observada, o mesmo ocorrido com outros autores (STAMCLIFT; GILSON, 2008). Kiupel e colaboradores (2005) não consideram a profundidade das lesões como fator importante à graduação, quando analisada individualmente, porém sugere que outros parâmetros menos subjetivos sejam incluídos nas avaliações, como a mensuração de núcleo por morfometria e contagem de mitoses, que também foi observado por Strefezzi et al. (2003); Misdorp (2004); Maiolino et al. (2005) e Strefezzi (2007).

6.4 PROCEDIMENTOS ESTEREOLÓGICOS

A estereologia é uma ferramenta que nos fornece dados quantitativos e de fácil reprodutibilidade, porém alguns erros (Bias) podem ocorrer, só que de forma calculada (LADERKARL; JENSEN; NIELSEN, 1997). A intenção maior do uso destas técnicas para interpretação do prognóstico foi de encontrar variáveis mais objetivas, que poderiam ser mensuradas, minimizando a subjetividade de outras técnicas. Outra vantagem desta ferramenta é que ela fornece dados do tumor por inteiro e não apenas de uma secção, portanto a interpretação dos resultados vem de todo o conteúdo neoplásico de forma tridimensional (GUNDERSEN et al., 1988). Alguns pesquisadores já utilizaram a estereologia para interpretação de prognóstico de outras neoplasias, principalmente em humanos (LADERKARL; JENSEN; NIELSEN, 1997; LADERKARL, 2004; MATTFELDT et al., 2004; NEDERGAARD et al., 2007; NEDERGAARD et al., 2008). Os estudos quantitativos têm demonstrado grande valor patoanatomia dos tumores e em estudo metodológicos e experimentais. Alguns parâmetros já estudados são a contagem e figuras de mitose, volume de núcleo, número total de células neoplásicas, densidade de células,

número total de vasos, para avaliação da angiogênese (LADERKARL; JENSEN; NIELSEN, 1997; LADERKARL, 2004; MATTFELDT et al., 2004; NEDERGAARD et al., 2007; NEDERGAARD et al., 2008). Nenhum estudo anterior avaliou o mastocitoma por ferramentas estereológicas, não havendo parâmetro de comparação direta.

A associação do volume tumoral com o prognóstico já foi discutido anteriormente neste capítulo, tendo sido encontrada associação entre o volume dos tumores, que foi estimado pela divisão do peso do tumor pela densidade específica, calculada pelo Princípio de Cavallieri (GUNDERSEN et al., 1988). Este é um parâmetro de fácil obtenção, pois depende apenas da pesagem do tumor, depois de retirada da pele e da cápsula, tendo facilidade de ser realizada e reproduzida. Observamos que os tumores acima de 10000 mm^3 apresentaram recidiva ou óbito em 4,67 meses em média, já os com volume entre 1000 e 10000 mm^3 em 14 meses e os menores de 1000 mm^3 leva 22,2 meses para recidivar ou apresentar óbito, sendo esta uma diferença estatisticamente significativa. O volume total do tumor pode ser associado à graduação histopatológica para ajudar a interpretar o prognóstico, pois apresentou associação com os graus de Patnaik, Ehler e MacEwen (1984), onde o grau I tem valores menores de volume em relação a grau II e III.

A densidade numérica não apresentou associação com a taxa de recidiva e óbito como eventos combinados, nem quando avaliados separadamente, porém possui associação com a distribuição de medianas com os graus histopatológicos, onde o grau I tem valores menores de densidade numérica em relação ao grau II e III. A densidade numérica foi estimada pelo método do *disector* óptico, com a contagem de mastócitos neoplásicos dentro dos campos pré-determinados (GUNDERSEN et al., 1988; LADERKARL; JENSEN; NIELSEN, 1997; LADERKARL, 2004). A combinação da densidade numérica, estimada por *disector* óptico, com o volume total do tumor nos forneceu o número total de mastócitos neoplásicos (GUNDERSEN et al., 1988; LADERKARL; JENSEN; NIELSEN, 1997; LADERKARL, 2004) que se mostrou associado ao prognóstico, tendo diminuição da sobrevida e aumento da taxa de recidiva para os tumores com mais de 10 milhões de mastócitos na sua totalidade. Esta associação também foi encontrada quando avaliados em separados o óbito e a recidiva. Portanto o número total de células neoplásicas pode

ser coligado a outros parâmetros para a interpretação do prognóstico dos animais portadores de mastocitoma. Também foi encontrada associação da distribuição da quantidade de mastócitos com o grau histopatológico, e os testes de quantificação demonstram que há menor quantidade de células nos tumores de grau I, quando comparadas aos de grau II e III. A quantificação de células neoplásicas já foi realizada em estudos de câncer de mama e próstata em humanos, sendo observada associação positiva do número de células com a evolução das neoplasias.

Estas quantificações também podem ser para o número de núcleos em mitose, células imunomarcadas, determinados tipo de células (por exemplo, eosinófilos) para ajudar na interpretação da evolução destes pacientes (LADERKARL; JENSEN; NIELSEN, 1997; LADERKARL, 2004; MATTFELDT et al., 2004; NEDERGAARD et al., 2007; NEDERGAARD et al., 2008). As contagens do número total de células, densidade numérica e volume total do tumor foram considerados dados importantes, por serem quantitativos, para a interpretação do prognóstico dos animais com mastocitoma, podendo também ajudar na subdivisão dos mastocitomas de grau intermediário, principalmente com o parâmetro número total de células. Em um trabalho comparativo de técnicas bi e tridimensionais para estimar o número total de núcleos em mitose e o volume destas células e de seus núcleos, Laderkarl (2004) não encontrou diferenças entre as duas técnicas para estimar o número total de células em mitose, no câncer de mama. Porém, refere diferenças entre as técnicas para estimar volumes, recomendando a utilização do *disector* óptico.

O volume do mastócito e do seu núcleo pela técnica do *rotator* planar vertical não demonstrou associação com a evolução dos casos clínicos do mastocitoma, mesmo quando avaliado de forma separada o óbito e a recidiva. Também não foi encontrado associação com a graduação histopatológica, não tendo distribuição diferenciada de acordo com os graus. Estes dados foram obtidos pelo rotator planar vertical, sendo descritos por Vedel-Jensen e Gundersen (1993) e Laderkarl (2004). Os mesmos resultados foram encontrados na estimativa do volume do núcleo pela técnica do PSI (GUNDERSEN; JENSEN, 1985; GUNDERSEN et al., 1988; LADERKARL, 2004), onde uma menor quantidade de núcleos era estimada, porém houve correspondência dos dados com os volumes estimados pelo rotator. Outros estudos que estimaram o volume do núcleo, conseguiram associá-los na predição

de categorias, através dos scores de núcleos (MATTFELDT et al., 2004), porém não foi realizado o teste para avaliação da associação com o tempo de sobrevida livre de recidiva. Uma das possibilidades de não termos encontrado relação dos volumes de núcleo e célula com o prognóstico é pelo número restrito de animais avaliados (20), sabendo-se que esta neoplasia possui grande pleomorfismo de células e de núcleo, o que pode ter influenciado nos resultados.

Utilizando métodos citomorfométricos, Strefezzi et al. (2003); Maiolino et al. (2005) e Strefezzi (2007) encontraram associação entre a área do núcleo e os graus histopatológicos, e foi relacionado ao prognóstico. Porém a comparação dos métodos não é possível, pois são técnicas muito diferentes. No entanto, Laderkarl (2004) encontrou associação entre o volume estimado do núcleo pelo PSI com a área do núcleo nos cortes bidimensionais em tumores de mama, ambos em cortes histológicos. Mais estudos são necessários para a comparação das técnicas de morfometria e estereologia para indicação de prognóstico para o mastocitoma.

6.5 MARCADORES IMUNOISTOQUÍMICOS

A atividade proliferativa é um recurso útil para distinguir entre neoplasias mais agressivas de potencialmente malignas e mais agressivas (SAKAI et al., 2002). Consideramos positivas mesmo as marcações tênues com Ki-67. Houve uma maior porcentagem de óbito relacionado ao tumor entre os animais que apresentavam mastocitoma com Ki-67 $\geq 6,0$ (59%, 20/34), havendo uma associação das células marcadas com Ki-67 com o tempo livre de recidiva e óbito (ABADIE et al., 1999; SAKAI et al., 2002; SCASE et al., 2006; NEWMAN et al., 2007). Também observamos que os animais com altas contagens de núcleos marcados com ki-67 evoluíram para óbito mais precocemente, comparado aos tumores com quantidade de núcleos marcados mais baixa. Portanto, a taxa de ki-67 também indica um óbito mais precoce dos animais acometidos por mastocitoma. O número de óbitos e recidivas não foi considerado evento independente, portando dependendo de outros fatores associados para previsão do prognóstico.

Segundo Ozaki et al. (2007) o índice de Ki-67 isolado não pode ser considerado fator prognóstico para recorrência local e metástase em tumores incompletamente excisados de grau II, sugerindo uma combinação de fatores cinéticos para prever a recorrência, como o uso em conjunto do Ki-67 com o PCNA. Contrariando Ozaki et al. (2007), Abadie et al. (1999) consideraram a imunomarcagem com ki-67 uma boa ferramenta para diferenciar a agressividade dos tumores de grau II, pela diferença nas taxas de sobrevida, incluindo os tumores que permaneceram com bordo contaminados. Scase et al. (2006), confirmado por Meglanon et al. (2008) encontraram resultados semelhantes, afirmando que a avaliação de ki-67 pode ser útil, principalmente, na subdivisão dos mastocitomas de grau II quanto à agressividade. Em nosso estudo também encontramos associação entre o grau histopatológico e a quantidade de núcleos imunomarcados com ki-67, confirmando o achado dos autores anteriores, sendo também confirmado por Costa et al. (2007). Webster et al. (2007) consideram que a proliferação celular não deve ser avaliada como fator prognóstico único para os mastocitomas caninos, devendo-se observar um conjunto de outros marcadores de prognósticos como grau histopatológico, mutações no *c-Kit*, e localização aberrante do *c-kit*. Eles consideram que nenhum marcador prognóstico deve ser avaliado sozinho, para que a melhor terapêutica possa ser estabelecida. Para os tumores subcutâneos também não foi encontrada associação da marcação com ki-67, com PCNA e *c-kit* com o prognóstico, sugerindo que estes tumores sejam outra variável de mastocitoma, devendo ser sub-categorizado (NEWMAN et al., 2007).

Devido a excelente associação da taxa de marcação positiva para ki-67 com o prognóstico e com o grau histopatológico, também consideramos este um dos melhores marcadores para mastocitoma, reforçando o achado de Sakai et al. (2002) que consideraram o ki-67 o padrão ouro de marcação de proliferação celular, dispensando outras marcações, como BrDU, PCNA, AgNOR ou *c-kit*. O agrupamento em escores maiores ou menores que 6,0%, valor escolhido entre a média e a mediana do total de casos, resultou em indicadores confiáveis para a mortalidade em função da doença ($p=0,024$), assim como para a sobrevida pós-operatória ($p=0,014$). Estes resultados corroboram com os obtidos por outros em relação às análises de ki-67 (ABADIE et al., 1999; SAKAI et al., 2002; SCASE et al.,

2006; COSTA et al., 2007; OZAKI et al., 2007;MEGLANON et al., 2008; WEBSTER et al., 2008; WELLE et al., 2008).

O oncogene *c-kit* tem sido amplamente investigado por inúmeros pesquisadores (REGUERA et al., 2000; ZENKE et al., 2002; KIUPEL et al., 2004; RIVA et al., 2005; COSTA et al., 2007; NEWMAN et al., 2007; WEBSTER et al., 2007; LETARD et al., 2008). A ativação constitutiva do receptor do gene leva a uma proliferação descontrolada das células, além de perdas de capacidade de apoptose, que pode indicar um potencial mais agressivo das células neoplásicas. Esta ativação ainda não está completamente elucidada, porém acredita-se que uma das causas esteja relacionada com a mutação destes genes (ZENKE et al., 2002). Um trabalho recente não encontrou mutação em todos os tumores que apresentavam localização aberrante do KIT, não havendo sempre a correlação da localização com a mutação (WEBSTER et al., 2006). Letard et al. (2008) provou que existe ganho de função dos mastócitos que apresentam mutação, não necessitando do ligante para que continuem proliferando, possuindo uma ativação constitutiva. Observaram que a presença destas mutações estão associadas a piora do tempo de sobrevida e aumento da taxa de recidiva. Em um trabalho com cultura de células, Ohmori et al. (2008) verificou a existência de mastócitos que sofrem mutação no *c-kit*, mas sem estar associado à proliferação celular e neoplasia.

Webster et al. (2006) não encontraram diferenciação da localização do KIT no citoplasma (KIT II e III), porém propõem que, distinguindo a localização do KIT, as mais profundas (KIT III) estariam envolvidas com a tumorigênese do tumor, talvez pelo ganho de função, correlacionando estes tumores com KIT no citoplasma com ativação da proliferação celular mediante ativação do *c-kit*. No entanto, o aumento da proliferação celular não é suficiente para a transformação neoplásica, isto pode contribuir para um fenótipo maligno pelo aumento do risco de mutações espontâneas (WEBSTER et al., 2006; LETARD et al., 2008).

Foi proposto que um aumento da expressão destes genes estaria relacionado com um aumento da graduação histopatológica, surgindo a proposta de uma nova classificação, de acordo com padrão de marcação nas células, que corresponderia a maior agressividade do tumor e consequentemente ao menor tempo de sobrevida dos animais (REGUERA et al., 2000; KIUPEL et al., 2004). No entanto, Newman et al. (2007) e Strefezzi (2007) não encontraram associação da classificação do KIT

com a sobrevida dos animais e com o grau histopatológico. Reguera et al. (2000) também não encontrou associação da localização do KIT e o grau histopatológico dos mastocitomas, o mesmo ocorrido neste trabalho, onde não verificamos associação da localização do KIT com o grau histopatológico. Diferente dos autores anteriores, Webster et al. (2006) encontraram associação da localização do KIT com o grau histopatológico, a presença de necrose e ulceração tumoral, onde ele propõe que a associação da necrose estaria relacionado a maior proliferação celular, não acompanhada de angiogênese e a ulceração associada a tumores mais agressivos, com maior liberação de histamina e serotonina, que causam prurido local. Para confirmar maior proliferação celular também encontraram associação do KIT com maior quantidade de núcleos marcados com ki-67. Em um trabalho recente, Webster et al. (2008) confirmaram a eficiência da marcação com KIT e ki-67, a presença de mutação no *c-kit* e a marcação com AgNOR como indicadores de prognóstico para mastocitoma, inclusive para avaliação de tratamento.

Em nosso trabalho, não encontramos associação dos padrões de marcação do KIT com o tempo livre de neoplasia e óbito. Também não houve relação dos padrões de morfológicos de marcação com o grau histológico, tendo sido encontrados padrões KIT III de marcação em mastocitomas grau I. Da mesma forma que não observamos associação do KIT com a marcação com ki-67. Nossos resultados se contrapõem aos obtidos por Kiupel et al. (2004), Webster et al. (2007) e Webster et al. (2008). Isto pode ser justificado por diferenças de interpretação de resultados, que são semi-quantitativas, classificando como KIT I, II ou III pelo maior padrão presente em pelo menos 100 mastócitos aleatórios, que pode levar a variações interobservadores, obtendo diferentes interpretações. Com base em dados de outros pesquisadores que também não encontraram relação da imunomarcação do KIT com o prognóstico, o grau histopatológico e ki-67, não podemos considerar esta marcação como bom padrão para avaliação do mastocitoma, pela dificuldade de reprodutibilidade dos resultados. No entanto, consideramos que este é um bom marcador para diferenciação do mastocitoma de outras neoplasias de células redondas.

6.6 EXPRESSÃO GÊNICA DO KIT POR PCR EM TEMPO REAL

Turin et al. (2006) realizaram uma avaliação da expressão do *c-kit* nos mastocitomas caninos sendo constatado que este é um método eficaz de detecção quantitativa e sensível da expressão do gene *c-kit* nos tecidos neoplásicos, porém não observou correlação da expressão do gene com o prognóstico. Em nosso estudo verificamos um resultado semelhante ao encontrado por estes autores. Conseguimos detectar a expressão do gene no tecido tumoral, porém não foi possível a sua associação com o tempo livre de tumor e óbito. Também avaliamos a expressão do ligante do *c-kit*, que poderia estar aumentado, conforme houvesse uma redução da expressão do gene anterior, porém a expressão do ligante geralmente acompanhou a expressão do *c-kit*. Além disso, encontramos associação do prognóstico com a expressão do ligante do *c-kit*, verificando que se a expressão fosse menor que 18, valor obtido pela média de expressão do ligante, os animais apresentavam 91% de chance de recidiva, enquanto quando a expressão era maior que 18 a chance de recidiva foi de 27%. A menor expressão do ligante também aumentou a chance de ocorrer os eventos de recidiva, porém o óbito não foi significativo quando interpretado isoladamente. Não foram encontrados dados na literatura para comparar com os nossos resultados observados para o ligante. Não encontramos associação da expressão gênica do *c-kit* e do seu ligante com a graduação histopatológica, com a imunomarcagem de KIT e ki-67. Poucos autores analisaram a expressão dos genes de maneira quantitativa através da técnica de PCR em tempo real. A quantidade de neoplasias avaliadas por este método em nosso trabalho foi menor em relação aos outros parâmetros, pois alguns tecidos não puderam ser coletados no momento da cirurgia e outros não tiveram seus RNAs viáveis após a extração, sendo descartados da avaliação.

Segundo Turin et al. (2006) é possível que os mastocitomas expressem uma grande quantidade do mRNA do *c-kit*, porém os níveis de proteína KIT podem estar muito baixos para serem diagnosticados pela técnica de imunohistoquímica. Ao mesmo tempo, é possível que as vias de transcrição não estejam intactas e a síntese de proteína esteja sendo interrompida precocemente.

Verifica-se a necessidade de associação dos dados de expressão gênica do *c-kit* e do seu ligante com a presença de mutações no seu DNA, para avaliar se esta diferença de expressão está relacionada com presença ou não de mutações nestes genes. A análise das mutações também pode ajudar na indicação dos novos tratamentos para mastocitoma, que envolvem a utilização de inibidores de tirosino quinase, como o citado por Gleixner et al. (2006); Gleixner et al. (2007); Letard et al. (2008) ; Hahn et al. (2008) ; Walker et al. (2008); Khanna e Gordon (2009); London et al. (2009), que têm provado reduzir a proliferação celular.

6.7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O objetivo maior deste trabalho foi identificar novos marcadores de prognóstico e testar outros já utilizados e citados na literatura consultada. Um dos resultados surpreendentes foi a correlação dos dados da anamnese e exame clínico, como a idade, velocidade de crescimento, presença de eritema, sangramento, aumento de temperatura, dimensões, ulceração e abrangência com a taxa de recidiva das neoplasias. Estes dados são interessantes, pois são de fácil obtenção e correlação com outros marcadores de prognóstico. Verificou-se a importância em estabelecer o estadiamento da neoplasia, para que possamos oferecer uma terapia mais apropriada para cada caso. O estadiamento é dependente de dados clínicos, portanto não é um método oneroso, além de oferecer um bom valor preditivo.

Na literatura inúmeras contradições são apresentadas quanto a graduação histológica, mas na nossa pesquisa ela demonstrou mais uma vez sua eficácia na indicação da evolução dos casos. O grande problema permanece sendo o grau II, porém algumas das variáveis testadas tiveram associação com o grau histológico. Isso nos leva a propor uma subdivisão dentro deste grau intermediário baseado nos resultados de contagens de variáveis como volume tumoral, número total de mastócitos neoplásicos, número de núcleos marcados com ki-67, associar a parâmetros clínicos, entre outros. Melhorando assim a abordagem destes pacientes. Apesar da grande quantidade de animais de grau II, a graduação histopatológica e a

marcação dos núcleos com ki-67 tiveram forte associação com o prognóstico, mostrando que há muita relevância nos dois métodos.

A associação da metástase e dos sinais clínicos com a diminuição da sobrevida e maior risco de recidiva já é um dado esperado, pois dá indícios da progressão da neoplasia e da presença de síndromes paraneoplásicas, que ocorre nos tumores mais agressivos. O interesse em prever fatores de prognóstico é para que possamos evitar que a doença evolua para a metástase e posterior óbito, entrando com uma terapia mais adequada.

A obtenção do número total de células e do volume tumoral por estereologia também pode ser associado aos mastocitomas de grau intermediário para ajudar na interpretação. Estes dois parâmetros não são difíceis de serem obtidos, podendo ser, adquirido inclusive por técnicas bidimensionais, segundo estudo de Laderkarl (2004).

Apesar das marcações com KIT não serem associadas com o prognóstico, este tipo de marcador imunoistoquímico é muito útil para diferenciar o mastocitoma de outras neoplasias de células redondas. Para que seja mais bem correlacionado com a sobrevida o mecanismo de síntese das proteínas do KIT têm que ser mais bem elucidado. Para isso tentamos realizar a correlação com a expressão dos genes no *c-kit* e do seu ligante. Porém, provavelmente devido a um baixo número de animais testados não conseguimos correlacionar o prognóstico e com as marcações do KIT com a expressão do *c-kit*. No entanto, os tumores com menor expressão do ligante do *c-kit*, também conhecido como fator de crescimento do mastócito, foi associado com a sobrevida livre de recidiva. Este dado deve ser melhor estudado e associado a outros dados como a presença de mutação do receptor e do ligante e aos estudos do mecanismo de funcionamento do KIT, pois desta maneira estaríamos avaliando mais possibilidades de alterações no gene que justificam a progressão da neoplasia.

A importância de entendimento do mecanismo de funcionamento do receptor de tirosino quinase se dá pelas futuras possibilidades de tratamento com os inibidores deste receptor, pois geralmente são medicações com menor efeito colateral, por terem ação mais específica, e elas podem ajudar a melhorar a sobrevida destes animais.

Outros fatores que interferem no desenvolvimento dos tumores, como o fator de vascularização do endotélio (VEGF), prostaglandina E2 (PGE-2), a mutação do *c-kit*, também poderão ser avaliado e correlacionado com os parâmetros testados neste trabalho, assim como outras técnicas biomoleculares. Outros parâmetros que podem ser relacionados são as técnicas de morfometria e as técnicas de estereologia, e a comparação das técnicas bidimensionais com as tridimensionais na estimativa do número total de células. Outra possibilidade de trabalho futuro é a associação do número de mitoses com as técnicas de marcação para proliferação celular, quantificadas com ferramentas estereológicas.

Para que os indicadores de prognóstico sejam empregados na rotina clínica, esses devem ser de fácil realização e baixo custo, para que sejam viáveis. Por isso, a interpretação dos parâmetros clínicos e outros mais simples como a estimação do volume do tumor e a possibilidade de contagem do número de células por técnicas bidimensionais são importantes, assim como os marcadores de proliferação celular, como o ki-67, que pode, inclusive, ajudar a separar a malignidade do mastocitoma grau II. As técnicas biomoleculares que ainda podem ser estudadas são muito importantes para guiar os tratamentos futuros, com terapias gênicas.

CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

Diante dos resultados expostos podemos concluir que:

- ✓ os parâmetros clínicos: idade, velocidade de crescimento, presença de eritema, sangramento, aumento de temperatura, dimensões, ulceração e abrangência mostraram-se eficazes para indicação de prognóstico, mas não de forma independente;
- ✓ a presença de metástase e sinais clínicos sistêmicos se apresentaram como indicadores preditivos independentes para sobrevida livre de recidiva e para óbito e recidiva;
- ✓ o estadiamento clínico do tumor foi relacionado com o tempo de sobrevida livre de recidiva;
- ✓ o grau histológico e a quantidade de núcleos marcados por Ki-67 foram associados ao prognóstico, sendo a graduação um parâmetro preditivo independente para óbito e recidiva;
- ✓ os dados estereológicos, como volume total do tumor e número total e células, resultaram em bons indicadores de prognóstico e foram bem relacionados com os graus histopatológicos;
- ✓ a marcação com ki-67 teve forte associação com a graduação histopatológica e com a previsão de evolução do mastocitoma;
- ✓ os padrões de marcação do KIT não puderam ser correlacionados com o prognóstico;
- ✓ a expressão gênica de *c-kit* não se mostrou eficaz para a predição de óbito e recidiva, porém a diminuição da expressão gênica do ligante de *c-kit* foi associada a menor tempo de sobrevida livre de recidiva.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ABADIE, J. J.; AMARDEILH, M. A.; DELVERDIER, M. E. Immunohistochemical detection of proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 in mast cell tumors from dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 215, n. 11, p. 1629-1634, 1999.

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. **Cellular and molecular immunology**. 4. ed. London: W.B. Saunders, 2000. 553 p.

AL-SARRAF, R.; MAULDIN, G. N.; PATNAIK, A. K.; MELEO, K. A. A prospective study of radiation therapy for the treatment of grade 2 mast cell tumors em 32 Dogs. **Journal of the Veterinary Internal Medicine**, v. 10, n. 6, p. 376-378, 1996.

BALDI, A.; COLLOCA, E.; SPUGININI, E. P. Lomustine for the Treatment of Gastrointestinal Mast Cell Tumours in a Dog. **Journal of the Small Animal Practice**, v. 47, n. 8, p. 465-467, 2006.

BEDDELEY, A. J.; GUNDERSEN, H. J. G.; CRUZ-ORIVE, H. J. G. Estimation of surface area from vertical sections. **Journal of Microscopy**, v. 142, n. 3, p. 259-276, 1986.

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

BOSTOCK, D. E. The prognosis following surgical removal of mastocytomas in dogs. **Journal of Small Animal Practice**, v. 14, n. 1, p. 27-41, 1973.

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

CAHALANE, A. K.; PAYNE, S.; BARBER, L. G.; DUDA, L. E.; HENRY, C. J.; MAULDIN, G. E.; FRIMBERGER, A. E.; COTTER, S. M.; MOORE, A. S. Prognostic factors for survival of dogs with inguinal and perineal mast cell tumors treated surgically with or without adjunctive treatment: 68 cases (1994-2002). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 225, n. 3, p. 401-408, 2004.

- CAMPS-PALAU, M. A.; LEIBMAM, N. F.; ELMSLIE, R.; LANA, S. E.; PLAZA, S.; McKNIGHT, J.A.; RISBON, R.; BERGMAN, P.J. Treatment of canine mast-cell tumours with vinblastine, cyclophosphamide and prednisone: 35 cases (1997-2004). **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 5, n. 3, p. 156-167, 2007.
- CHAFFIN, K.; THRALL, D. E. Results of radiation therapy in 19 dogs with cutaneous mast cell tumor and regional lymph node metastasis. **Veterinary Radiology and Ultrasound**, v. 43, n. 4, p. 392-395, 2002.
- COOPER, M.; TSAI, X.; BENETT, P. Combination CCNU and vinblastine chemotherapy for canine mast cell tumours: 57 cases. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 7, n. 3, p. 196-206, 2009.
- COSTA, R. M. G.; MATOS, E.; REMA, A.; LOPES, C.; PIRES, M. A.; GÄTNER, F. CD117 immunoexpression in canine mast cell tumours: correlations with pathological variables and proliferation markers. **BMC Veterinary Research**, v. 3, n. 19, p. 1-7, 2007.
- COSTA-CASAGRANDE, T. A.; 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. 206-213, 2008.
- CULLEN, J. M.; PAGE, R.; MISDORP, W. An overview of cancer pathogenesis, diagnosis, and management. In: MEUTEN, D. J. **Tumors in domestic animals**. 4. ed. Iowa: Iowa State Press, 2002. p. 3-27.
- 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. 124-130, 2004.
- DOBSON, J. M.; SCASE, J. Advances in the diagnosis and management of cutaneous mast cell tumours in dogs. **Journal of Small Animal Practice**, v. 48, n. 8, p. 424-431, 2007.
- ELLING, H.; UNGEMACH, F.R. Sexual hormone receptors in canine mast cell tumor cytosol. **Journal of Comparative Oncology**, v. 92, n. 4, p. 629-630, 1982.

ELSTON, L. B.; SUEIRO, F. A. R.; CAVALCANTI, J. N.; METZE, K. The importance of mitotic index as a prognostic factor for survival of canine cutaneous mast cell tumors: a validation study. **Veterinary Pathology**, v. 46, n. 2, p. 362-365, 2009.

FOX, E. L. Mast Cell Tumors. In: MORRISON, B.W. Cancer in dogs and cats medical and surgical management. 1. ed. Philadelphia: Williams & Wilkins, 1998. p. 479-488.

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.

FRIEMBERG, A. E.; MOORE, A. S.; LARUE, S. M.; GLIATTO, J. M.; BENGSTON, A. E. Radiotherapy of incompletely resected, moderately differentiated mast cell tumor in the dog: 37 dogs (1989-1993). **Journal of American Animal Hospital Association**, v. 33, n. 4, p. 320-324, 1997.

GERRITSEN, R. J.; TESKE, E.; KRAUS, J. S.; RUTTEMAN, G. R. Multi-agent chemotherapy for mast cell tumours in the dog. **The Veterinary Quarterly**, v. 10, n. 1, p. 28-31, 1998.

GIEGER, T.; NORTHRUP, N.; WALL, M. Clinical management of mast cell tumors in dogs. **Compendium on Continuing Education of the Practicing Veterinarian**, v. 27, n. 1, p. 56-67, 2005.

GILFILLAN, A. M.; TKACZYK, C. Integrated signaling pathways for mast-cell activation. **Nature reviews. Immunology**, v. 6, n. 3, p. 218-203, Mar. 2006.

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

GLEIXNER, K. V.; MAYERHOFER, M.; AICHBERGER, K. J.; DERDAK, S.; SONNECK, K.; BÖHM, A.; GRUZE, A.; SAMORAPOOMPICHIT, P.; MANLEY, P. W.; FABBRO, D.; PICKL, W. F.; SILLABER, C.; VALENT, P. PKC412 inhibits in vitro growth of neoplastic human mast cells expressing the D816V-mutated variant of KIT: comparison with AMN107, imatinib, and cladribine (2CdA) and evaluation of cooperative drug effects. **Blood**, v. 107, n. 2, p. 752-759, 2006.

GLEIXNER, K. V.; REBUZZI, L.; MAYERHOFER, M.; GRUZE, A.; HADZIJUSUFOVIC, E.; SONNECK, K.; VALES, A.; KNEIDINGER, M.; SAMORAPOOMPICHIT, P.; THAIWONG, T.; PICKL, W. F.; YUZBASIYAN-GURKAN, V.; SILLABER, C.; WILLMANN, M.; VALENT, P. Synergistic antiproliferative effects of KIT tyrosine kinase inhibitors on neoplastic canine mast cells. **Experimental Hematology**, v. 35, n. 10, p. 1510–1521, 2007.

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.

GOVIER, S. M. Principles of treatment for mast cell tumors. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**, v. 18, n. 2, p.103-106, 2003.

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

GUNDERSEN, H. J. G.; BAGGER, P.; BENDTSEN, T.; EVANS, S. M.; KORBO, L.; MARCUSSEN, N.; MOLER, A.; NIELSEN, K.; NYENGAARD, J. R.; PAKKENBERG, B.; SORENSEN, F. B.; VESTERBY, A.; WEST, M. J. The new stereological tools:disector, fractionator, nucleator and point sample intercepts and their use in pathological research and diagnosis. **APMIS**, v. 96, n. 10, p. 857-881, 1988.

GUNDERSEN, H. J.; JENSEN, E. B. Stereological estimation of the volume-weighted mean volume of arbitrary particles observed on random sections. **Journal of Microscopy**, v. 138, n. pt2, p. 127-142, 1985.

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

HOSOYA, K.; KISSEBERTH, W. C.; ALVAREZ, F. J.; LARA-GARCIA, A.; BEAMER, G.; STROMBERG, P. C.; COUTO, G. C. Adjuvant CCNU (Lomustine) and prednisone chemotherapy for dogs with incompletely excised grade 2 mast cell tumors. **Journal of American Animal Hospital Association**, v. 45, n. 1, p. 14-18, 2009.

HOWARD, C. V.; REED, M. G. **Unbiased Stereology. Three-dimensional measurement in microscopy**. Oxford Bios Scientific Publishers, 2005.

ISHIGURO, T.; KADOSAWA, T.; MORI, K.; TAKAGI, S.; OKUMURA, M.; FUJINAGA, T. Establishment and characterization of a new canine mast cell tumor cell line. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 63, n. 9, p. 1031-1034, Sep. 2001.

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 of Veterinary Internal Medicine**, v. 22, n. 4, p. 985-988, 2008.

JAFFE, M. H.; HOSGOOD, G.; TAYLOR, H. W. Immunohistochemical and clinical evaluation of P53 in canine cutaneous mast cell tumors. **Veterinary Pathology**, v. 37, n. 1, p. 37-40, 2000.

JOHNSON, T. O.; SCHULMAN, F. Y.; LIPSCOMB, T. P.; YANTIS, L. D. Histopathology and biologic behavior of pleomorphic cutaneous mast cell tumors in fifteen cats. **Veterinary Pathology**, v. 39, n. 4, p. 452-457. Jul. 2002.

JUNG, D-I.; KIM, H – J.; PARK, C.; KIM, J –W.; KANG, B-T.; LIM, G. Y.; PARK, E – H.; SUR, J-H.; SEO, M-H.; HAHM, D-H.; PARK, H –M. Long-term chemotherapy with lomustine of intracranial meningioma occurring in a miniature Schnauzer. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 68, n. 4, p. 383-386, Apr. 2006.

KHANNA, C.; GORDON, I. Catching cancer by the tail: new perspectives on the use of kinase inhibitors. **Clinica Cancer Research**, v. 15, n. 11, p. 3645-3647, 2009.

KIUPEL, M.; WEBSTER, J. D.; 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. 371-377, 2004.

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

KIUPEL, M.; WEBSTER, J. D.; MILLER, R. A.; KANEENE, J. B. Impact of tumors depth, tumors location and multiple synchronous masses on the prognosis of canine

cutaneous mast cell tumors. **Journal of Veterinary Medicine Series A. Physiology, Pathology and Clinical Medicine**, v. 52, n. 6, p. 280-286, aug., 2005.

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. 239-241, 2007.

KODRE, V.; CEMAZAR, M.; PECAR, J.; SERSA, G.; CÖR, A.; TOZON, N. Eletrochemotherapy Compared to Surgery for Treatment of Canine Mast Cell Tumours. **In Vivo**, v. 23, n.1, p. 55-62, 2009.

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. 130–138, 2009.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. **Robbins e cotran – patologia – bases patológicas das doenças**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. p. 1592.

LADEKARL, M. Choice of methodology for quantifying cancer structures in tissue sections. A comparison of 2- and 3-dimensional estimators of mitotic activity, cellularity and nuclear size in breast cancer. **Analytical and Quantitative Cytology and Histology**, v. 26, n. 2, p. 97-104, 2004.

LADEKARL, M.; JENSEN, V.; NIELSEN, B. Total number of cancer cell nuclei and mitoses in breast tumors estimated by optical disector-analytical and quantitative. **Analytical and Quantitative Cytology and Histology**, v. 19, n. 4, p. 329-337, 1997.

LANGENBACH, A.; McMANUS, P. M.; HENDRICK, M. J.; SHOFER, F. S.; SONREMO, K. U. Sensitivity and specificity of methods for assessing the regional lymph nodes in dogs and cats with solid tumors. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 218, n. 9, p. 1424-1428, 2001.

LANGFORD, L. A.; COOKSLEY, C. S.; DEMONTE, F. Comparasion of MIB-1 (Ki-67) antigen and bromodeoxyuridine proliferation indices in meningiomas. **Human Pathology**, v. 27, n. 4, p. 350-354, 1996.

LAVALLE, G. E.; ARAÚJO, R. B.; CARNEIRO, R. A. Tratamento clínico e cirúrgico de mastocitomas em cães. **A Hora Veterinária**, v. 22, p. 06-14. 2003.

LAVALLE, G. E.; CARNEIRO, R. A.; PEREIRA, L. C. Punção aspirativa por agulha fina para diagnóstico de mastocitoma em cães. **Arquivos Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 55, n. 4, p. 500-502, Aug. 2003.

LEMARIÉ, R.; LEMARIÉ, S.; HEDLUND, C. Mast cell tumors: clinical management. **Compendium on Continuing Education of the Practicing Veterinarian**, v. 17, p. 1085-1101, 1995.

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

LEVINE, R. A.; FLEISCHLI, M. A. Inactivation of p53 and retinoblastoma family pathways in canine osteosarcoma lines. **Veterinary Pathology**, v. 37, n. 1, p. 54-61, 2000.

LIN, T. Y.; BEAR, M.; DU, Z.; FOLEY, K. P.; YING, W.; BARSOUM, J.; LONDON, C. The novel HSP90 inhibitor STA-9090 exhibits activity against Kit-dependent and -independent malignant mast cell tumors. **Experimental Hematology**, v. 36, n. 10, p. 1266-1277, 2008.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEIN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the 2(-Delta DeltaC(T)) method. **Methods**, v. 4, n. 25, p. 402-408, Dec. 2001.

LONDON, C. A.; GALLI, S. J.; YUUKI, T.; HU, Z. Q.; HELFAND, S. C.; GEISLER, E. N. Spontaneous canine mast cell lines. **Veterinary Pathology**, v. 27, p. 689-697, 1999.

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

LONDON, C. A.; HANNAH, A. L.; ZADOVOSKAYA, R.; CHIEN, M. B.; KOLLIAS-BAKER, C.; ROSENBERG, M.; DOWNING, S.; POST, G.; BOUCHER, J.; SHENOY, N.; MENDEL, D.B.; MCMAHON, G.; CHERRINGTON, J.M. Phase I Dose-Escalating Study of SU11654, a Small Molecule Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor, in Dogs with Spontaneous Malignancies. **Clinical Cancer Research**, v. 9, n. 7, p. 2755-2768, Jul. 2003.

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 cell from spontaneous canine mast cell tumors. **Journal of Comparative Pathology**, v. 115, n. 4, p. 399-414, 1996.

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. 3856-3865, 2009.

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

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

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

MAIOLINO, P.; CATALDI, M.; PACIELLO, O.; RESTUCCI, B.; DE VICO, G. Nucleomorphometric analysis of canine cutaneous mast cell tumours. **Journal of Comparative Pathology**, v. 133, n. 2-3, p. 209-211, 2005.

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 of Veterinary Internal Medicine**, v. 22 , n. 22, p. 1001-1007, 2008.

MARCONATO, L.; MARCHETTI, V.; FRANCIONE, D.; MASSERDOTTI, C.; GREGORI, M.; LEOTTA, R.; ABRAMO, F. Morphometrical approach for predicting

regional lymph node micrometastatic load in canine mast cell tumours: preliminary results. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 6, n. 3, p. 167-170, 2008.

MATSUDA, K.; SAKAGUCHI, K.; KOBAYASHI, S.; TOMINAGA, M.; HIRAYAMA, K.; KADOSAWA, T.; TANIYAMA, H. Systemic candidiasis and mesenteric mast cell tumor with multiple metastases in a dog. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 71, n. 2, p. 229-232, 2009.

MATTFELDT, T.; TRIJIC, D.; GOTTFRIED, H. W.; KESTLER, H. A. Incidental carcinoma of the prostate: clinicopathological, stereological and immunohistochemical findings studied with regression and self-organizing feature maps. **BJU International**, v. 93, n. 3, p. 284-290, 2004.

MAYER, A. N. Radiation therapy for canine mast cell tumors. **Canadian Veterinary Journal**, v. 47, n. 3, p. 263-265, 2006.

MAYHEW, T. M.; GUNDERSEN, H. J. G. "If you assume, you can make an ass out of u and me": a decade of the disector for stereological counting of particles in 3D space. **Journal of Anatomy**, v. 188, n. pt1, p. 1-15, 1996.

MAYHEW, T. M.; OLSEN, D. R. Magnetic resonance imaging (MRI) and model-free estimates of brain volume determined using the Cavalieri principle. **Journal of Anatomy**, v. 178, p. 133-144, 1991.

McCAW, D. L.; MILLER, M. A.; BERGMAN, P. L.; WITHROW, S. T.; MOORE, A. S.; KNAPP, D. W.; FOWLER, D.; JOHNSON, J. C. Vincristine therapy for canine mast cell tumor: 41 cases (1992-1997). **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 11, n. 6, p. 375-378, 1997.

MICHELS, G. M.; KNAPP, D. W.; DENICOLA, D. B.; GLICKMAN, N.; BOONEY, P. Prognosis following surgical excision of canine cutaneous mast cell tumors with histopathologically tumor-free versus nontumor-free margins: a retrospective study of 31 cases. **Journal of American Animal Hospital Association**, n. 38, n. 5, p. 458-466, Sep-Oct. 2002.

MISDORP, W. Mast cell and canine mast cell tumours. A review. **The Veterinary Quarterly**, v. 26, n. 4, p. 156-169, Dec. 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 Science**, v. 64, n. 6, p. 531-533, 2002.

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

MURPHY, S; SPARKES, A. H.; BLUNDEN, A. S.; BREARLEY, M. J.; SMITH K. C. Effects of stage and number of tumors on prognosis of dogs with cutaneous mast cell tumours. **Veterinary Records**, v. 158, n. 4, p. 287-291, 2006.

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

NASIR, L.; BURR, P. D.; McFARLANE, S. T.; GAULT, E.; THOMPSON, H.; ARGYLE, D. J. Cloning sequence analysis and expression of the cDNAs encoding the canine and equine homologues of the mouse double minute 2 (mdm2) proto-oncogene. **Cancer Letters**, v. 152, n.1, p. 9-13, 2000.

NASIR, L.; RUTTERMAN, G.R.; REID, S.W.J.; SCHULZE, Ch.; ARGYLE, D.J. Analysis of P53 mutational events and mdm2 amplification in canine soft-tissue sarcomas. **Cancer Letters**, v.174, n.1, p. 83-89, 2001.

NEDERGAARD, B. S.; LADEKARL, M.; NYENGAARD, J. R.; NIELSEN, K. A comparative study of cellular immune response in patients with stage IB cervical carcinoma squamous cell carcinoma. Low numbers of several immune cell subtypes are strongly associated with relapse of disease within 5 years. **Gynecology Oncology**, v. 8, n. 1, p. 106-111, 2008.

NEDERGAARD, B. S.; LADEKARL, M.; THOMSEN, H. F.; NYENGAARD, J. R.; NIELSEN, K. Low density of CD3+, CD4+ and CD8+ cells is associated with increased risk of relapse in squamous cell cervical cancer. **British Journal of Cancer**, v. 97, n. 8, p. 1135-1138. 2007.

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

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

O'BRATE, A.; GIANNAKAKOU, P. The importance of P53 location:nuclear or cytoplasmic zip code? **Drug Resistance Updates**, v. 6, n. 6, p. 561-564, 2005.

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 cell. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 126, n. 1-2, p. 43-53, 2008.

OGILVIE, G. K.; MOORE, A. S. Mast Cell Tumors. In: OGILVIE, G. K.; MOORE, A. S. **Managing the Veterinay Cancer Patient: A Practice Manual**. 1. ed. New Jersey: Veterinary Learning Systems, 1995. p. 503-510.

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.

ORDEIX, L.; FONDEVILA, D.; DE MORA, F.; FONDATI, A.; FERRER, L. Assessment of proliferative activity of canine dermal mast cells by Bromodeoxyridine and proliferating cell nuclear antigen labelling. **Veterinary Dermatology**, v. 12, n. 6, p. 321-325, Dec. 2001.

OZAKI, K.; YAMAGAMI, T.; NOMURA, K.; NARAMA, I. Mast cell tumors of the gastrointestinal tract in 39 dogs. **Veterinary Pathology**, v. 39, n. 5, p. 557-564, 2002.

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

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

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, Nov. 2004.

PREZIOSI, R.; SARLI, G.; PALTRINIERI, M. Multivariate survival analysis of histological parameters and clinical presentation in canine cutaneous mast cell tumours. **Veterinary Research Communications**, v. 31, n. 3, p. 287-296, 2007.

PRYER, N.; LEE, L. B.; ZADOVASKAYA, R.; YU, X.; SUKBUNTHERN, J.; CHERRINGTON, J. M.; LONDON, C. A. Proof of target for SU11654: inhibition of KIT phosphorylation in canine mast cell tumors. **Clinical Cancer Research**, v. 9, n. 15, p. 5729-5734, 2003.

PULLEY, L. T.; STANNARD, A. A. Skin and soft tissues. In: MOULTON, J. E. **Tumors in domestic animals**. 3. ed. Los Angeles: University of California Press, 1990. p. 38-44.

QUINN, C. M.; WRIGTH, N. A. The clinical assessment of proliferation and growth in human tumors: evaluation of methods and application as prognostic variables. **Journal of Pathology**, v. 160, n. 2, p. 93-102, 1990.

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

RASSNICK, K. M.; MOORE, A. S.; WILLIAMS, L. E.; LONDON, C. A.; KINTZER, P. P.; ENGLER, S. J.; COTTER, S. N. Treatment of canine mast cell tumors with CCNU (Lomustine). **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 13, n. 6, p. 601-605, 1999.

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

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

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.

ROMANSKI, 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. 335-341, 2007.

SAKAI, H.; NODA, A.; SHIRAI, N.; IIDAKA, T.; YANAI, T.; MASEGI, T. Proliferative activity of canine mast cell tumors evaluated by bromodeoxyuridine incorporation and Ki-67 expression. **Journal of Comparative Pathology**, v. 127, n. 4, p. 233-238, 2002.

SCASE, T.; 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. 115-158, 2006.

SÉGUIN, B.; LEIBMAN, N. F.; BREGAZZI, V. S.; OGILVE, G. K.; POWERS, B. E.; DERNELL, W. S. D.; 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 Veterinary Medicine Association**, v. 218, n. 7, p. 1120-1123, 2001.

SETOGUSHI, A.; OKUDA, M.; NISHIDA, E.; YAZAWA, M.; ISHIZAKA, T.; HONGS, S.H.; HISASUE, M.; NISHIURA, R.; YOSHIKAWA, Y. MASUDA, K.; OHNO, K.; TSUJIMOTO, H. Results of hyperamplification of centrosomes in naturally developing tumors of dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 62, n.7, p. 1134-1141, 2001.

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

SIMPSON, A. M.; LUDWIG, L. L.; NEWMAN, S. J.; BERGMAN, P. J.; HOTTINGER, H. A.; PATNAIK, A. K.. Evaluation of surgical margins required for complete excision of cutaneous mast cell tumors in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 224, n. 2, p. 236-240, 2004.

STEFANELLO, D.; VALENTI, P.; FAVERZANI, S.; BRONZO, V.; FIORBIANCO, V.; PINTO DA CUNHA, N.; ROMUSSI, S.; CANTATORE, M.; CANIATTI, M. Ultrasound-

guided cytology of spleen and liver: a prognostic tool in canine cutaneous mast cell tumor. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 23, n. 5, p. 1051-1057, 2009.

STERIO, D. C. The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using the disector. **Journal of Neuroscience Research**, v. 69, p. 745-749, 2007.

SFILIGOI, G.; RASSNICK, K. M.; SCARLETT, J. M.; NORTHRUP, N. C.; GIEGER, T. L. Outcome of dogs with mast cell tumors in the inguinal or perineal region versus other cutaneous location: 124 cases (1990-2001). **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 226, n. 8, p. 1368-1374, 2005.

STREFEZZI, R. F.; XAVIER, J. G.; CATÃO-DIAS, J. L. Morphometry of cutaneous mast cell tumors. **Veterinary Pathology**, v. 40, n. 3, p. 268-275, 2003.

STREFEZZI, R. F. S. **Indicadores de prognóstico para mastocitomas: Estudo morfométrico e imunoistoquímico**. 2007. 93 f. Tese de Doutorado (Doutorado em Patologia Experimental e Comparada) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

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 .

TAKAHASHI, T.; KADOSAWA, T.; NAGASE, M.; MATSUNAGA, S.; MACHIZUKI, M.; NISHIMURA, R.; SASAKI, N. Visceral mast cell tumors in dogs: 10 cases (1982-1997). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 216, n.2, p. 222-226, 2000.

TAYLOR, F.; GEAR, R.; HOATHER, T.; DOBSON, J. Chlorambucil and prednisolone chemotherapy for dogs with inoperable mast cell tumours: 21 cases. **Journal of Small Animal Practice**, v. 50, n. 6, p. 284-289, 2009.

THAMM, D. H.; MAULDIN, E. A.; VAIL, D. M. Prednisone and vinblastine chemotherapy canine mast cell tumour: 41 cases (1992-1997). **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 13, n. 5, p. 491-497, 1999.

THAMM, D. H.; TUREK, M. M.; VAIL, D. M. Outcome and prognostic factors following adjuvant prednisone/vinblastine chemotherapy for highrisk canine mast cell tumors: 61 cases. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 68, p. 581-587, 2006.

- THAMM, D. H.; VAIL, D. M. Mast cell tumors. In: WITHROW, S. J.; MacEWEN'S, E. G. **Small animal clinical oncology**. 4. ed. St. Louis, MO: Saunders Elsevier, 2007. p. 402-424.
- TIZARD, I. R. Cómo se Activa la Inflamación. TIZARD, I. R. **Introducción a La Inmunología Veterinaria**. 8. ed. Barcelona: Elsevier Saunders. 2009. p. 11-27.
- 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, Jul. 2006.
- VEDEL-JENSEN, E. B.; GUNDERSEN, H. J. G. The rotator. **Journal of Microscopy**, v. 170, p. 35-44, 1993.
- 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. 111-119, 2008.
- WALTER, J. H. Cytokeratins in the canine epidermis. **Veterinary Dermatology**, v. 12, n. 2, p. 81-87, 2001.
- WEBSTER, J. D.; KIUPEL, M.; YUZHASIYAN-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.; YUZHASIYAN-GURKAN, V.; KANEENE, J. B.; MILLER, R. A.; RESAU, J. H.; KIUPEL, M. The role of c-KIT in tumorigenesis: evaluation in canine cutaneous mast cell tumors. **Neoplasia**, v. 8, n. 2, p. 104-111, 2006.
- WEBSTER, J. D., YUZHASIYAN-GURKAN, V.; MILLER, R. A.; KANEENE, 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., YUZHASIYAN-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. **Journal of Veterinary Oncology**, v. 19, n. 6, p. 321-339, 2008.

WU, H.; HAYASHI, T.; INOUE, M. Immunohistochemical expression of p27 and p21 in canine cutaneous mast cell tumors and histiocytomas. **Veterinary Pathology**, v. 41, n. 3, p. 296-299, 2004.

ZAVODOVSKAYA, R.; CHIEN, M. B.; LONDON, C. A. Use of kit internal tandem duplications to establish mast cell tumor cClonality in 2 dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 18, n. 6, p. 915-917, 2004.

ZEMKE, D.; YAMINI, B.; YUZBASİYAN-GURKAN, Y. Mutations in the juxtamembrane domain of c-Kit are associates with higher grade mast cell tumors in dogs. **Veterinary Pathology**, v. 39, n. 5, p. 529-535, 2002.

APÊNDICE

APÊNDICE A

Tabela 14 - Distribuição dos casos de mastocitoma em função da raça, idade, sexo, localização e número de formações, atendidos no Serviço de Cirurgia de Pequenos Animais – HOVET - FMVZ/USP - São Paulo, 2006-2010 (continua)

Cão número	Prontuário	Raça	Idade (anos)	Sexo	Localização	Número de Formações
1	68115	Boxer	12	Macho	F, C	2
2	86699	Pinscher	14	Fêmea	C, T	3
3	96788	Boxer	9	Macho	L, I, M	3
4	116729	Boxer	7	Macho	T, B	2
5	121101	SRD	7	Fêmea	AL	1
6	121599	Labrador	10	Macho	B	1
7	125250	Boxer	5	Fêmea	L	1
8	125576	Boxer	7	Macho	I, B	2
9	127024	Boxer	9	Macho	M	1
10	135105	Boxer	7	Macho	AL, B	4
11	148662	Pug	7	Fêmea	T, B	2
12	151626	Boxer	7	Macho	M	1
13	156092	Labrador	8	Macho	I	1
14	158376	Boxer	9	Fêmea	I, M	4
15	165483	SRD	11	Macho	AL	1
16	165802	Husky	7	Macho	T	1
17	170840	Boxer	9	Fêmea	M	1
18	171469	Boxer	9	Fêmea	L, M	2
19	173495	Boxer	8	Macho	T	1
20	174600	Labrador	4	Macho	I	1
21	174995	Boxer	4	Fêmea	AL	1
22	176371	Fila Brasileiro	3	Fêmea	M	1
23	176794	Labrador	9	Macho	M, T	2
24	176974	Daschund	11	Fêmea	M	1
25	178062	Boxer	7	Macho	AL, T	2
26	178316	Boxer	7	Fêmea	M	2
27	178403	Boxer	5	Fêmea	M	1
28	178675	Rottweiler	8	Fêmea	T	1
29	179082	SRD	7	Fêmea	M	1
30	180541	SRD	5	Fêmea	M	1
31	180661	Dog Alemão	6	Fêmea	C	1
32	180833	Dachshund	7	Fêmea	I, M	3
33	181328	Fox	11	Fêmea	M	1
		Paulistinha				
34	181476	Boxer	10	Macho	M, T	2
35	181648	Boxer	10	Fêmea	AL, C, M, T	9
36	181697	Boxer	6	Fêmea	M	1
37	181712	SRD	9	Fêmea	C	1
38	181948	Maltês	4	Fêmea	M	1
39	182142	Schnauzer	10	Macho	M	1
40	182329	Labrador	9	Fêmea	M	1
41	182413	SRD	5	Macho	M	1
42	182644	Boxer	9	Macho	B	1
43	183431	SRD	5	Macho	C	1
44	183432	Pinscher	12	Fêmea	Di	1
45	185034	Boxer	4	Fêmea	AL, M	2

Cão número	Prontuário	Raça	Idade (anos)	Sexo	Localização	Número de Formações
46	185122	SRD	9	Macho	I, L, M	4
47	185471	SRD	17	Macho	M	1
48	185736	Pinscher	9	Fêmea	M	2
49	166793	Labrador	5	Fêmea	C, T	3
50	171888	Doberman	11	Fêmea	T	1
51	162739	Shar-pei	14	Macho	T	1
52	159858	SRD	13	Macho	T	1
53	161447	Pinscher	8	Macho	M	1
54	166646	Labrador	8	Macho	B	1
55	169159	Boxer	5	Fêmea	C	2
56	175409	SRD	13	Macho	M, T	3
57	142003	Doberman	7	Fêmea	C, T	2
58	162916	Boxer	6	Macho	M	2
59	165162	Cocker	5	Fêmea	M	1
60	120754	Labrador	13	Macho	T	2
61	136959	Boxer	6	Macho	M	4
62	162916	Boxer	6	Macho	M	1
63	196883	Labrador	9	Fêmea	M	1
64	169526	American Staffordshire	11	Fêmea	AL, M	2
65	198906	Boxer	10	Fêmea	M	1
66	105888	Bull terrier	11	Macho	M, T	2
67	198861	Boxer	9	Macho	M	1
68	199869	Boxer	7	Macho	B, C, M, T	12
69	148667	Cocker	11	Fêmea	C	1
70	200356	Labrador	9	Macho	M	1
71	116976	Labrador	10	Macho	Di, M	2
72	156473	Dachshund	13	Macho	B	1
73	200793	Boxer	9	Fêmea	I	1
74	199514	Boxer	11	Fêmea	M	3
75	173127	Boxer	4	Fêmea	M	1
76	199574	Golden Retriever	5	Macho	T	1
77	183303	Boxer	11	Fêmea	AL, M	2
78	197574	Cocker	8	Fêmea	M	1
79	198841	SRD	9	Macho	B, I, T	5
80	195689	SRD	12	Fêmea	M	1
81	177674	Dachshund	11	Macho	C	1

B= Bolsa escrotal; AL= Abdome lateral; C= Cabeça/Pescoço; Di= Dígito; I/P= Inguinal/Perineal; L= Lombar; M= Membros; T= Torácica; SRD= Sem Raça Definida

APÊNDICE B

Tabela 15 - Distribuição dos casos de mastocitoma em função dos linfonodos acometidos observados durante o exame clínico, tempo de evolução, intervalo para recidiva, óbito, e tempo de sobrevida, atendidos no Serviço de Cirurgia de Pequenos Animais – HOVET - FMVZ/USP - São Paulo, 2006-2010 (continua)

Cão número	Linfonodo	Tempo de Evolução (meses)	Intervalo para Recidiva (meses)	Óbito (meses)	Tempo Sobrevida (meses)
1	Não	2	Não	12 – NR	12
2	Não	7	8	12 – R	12
3	Não	4	Não	43 – NR	43
4	Não	2	Não	Não	29 – vivo
5	Não	8	8	Não	29 – vivo
6	Inguinal	1	Não	25 – R	25
7	Não	4	Não	Não	31 – vivo
8	Não	1	12	32 – R	32
9	Não	1	15	20 – R	20
10	Não	24	4	Não	34 – vivo
11	Não	24	Não	31 – R	31
12	Não	30	12	30 – R	30
13	Não	2	20	25 – R	25
14	Não	6	12	33 – R	33
15	Não	6	7	8 – NR	8
16	Não	3	24	28 – R	28
17	Não	2	Não	Não	34 – vivo
18	Não	2	5	Não	28 – vivo
19	Não	12	5	8 – R	8
20	Inguinal	24	8	10 – R	10
21	Não	12	Não	Não	28 – vivo
22	Não	4	30	35 – R	35
23	Não	6	28	30 – R	30
24	Poplíteo	24	10	12 – R	12
25	Não	6	Não	Não	35 – vivo
26	Não	4	11	12 – R	12
27	Não	1	12	23 – R	23
28	Não	4	14	15 – R	15
29	Não	24	Não	Não	20 – vivo
30	Não	5	Não	Não	24 – vivo
31	Não	6	10	26 – R	26
32	Não	24	Não	Não	31 – vivo
33	Poplíteo	1	Não	Não	28 – vivo
34	Axilar, Poplíteo	6	2	3 – R	3
35	Submandibular	24	Não	12 – NR	12
36	Não	4	Não	Não	32 – vivo
37	Não	12	14	18 – R	18
38	Não	1	Não	Não	3 – vivo
39	Poplíteos	1	12	15 – R	15

Cão número	Linfonodo	Tempo de Evolução (meses)	Intervalo para recidiva	Óbito (meses)	Tempo Sobrevida (meses)
40	Axilar	7	Não	7 – NR	7
41	Poplíteo	12	Não	Não	32 – vivo
42	Inguinal	3	1	4 – R	4
43	Pré-escapular	1	4	7 – R	7
44	Axilar, pré-escapular	3	6	8 – R	8
45	Não	4	5	6 – R	6
46	Poplíteo, inguinal	24	Não	15 – R	15
47	Pré-escapular	3	5	7 – R	7
48	Axilar	6	7	14 – R	14
49	Não	2	Não	22 – R	22
50	Não	30	2	7 – R	7
51	Inguinal, sub-lombar	2	2	2 – R	2
52	Mediastínico	6	4	5 – R	5
53	Não	8	21	23 – R	23
54	Não	1	Não	Não	26 – vivo
55	Não	24	Não	Não	24 – vivo
56	Inguinal	24	1	6 – R	6
57	Pré-escapular	1	Não	4 – R	4
58	Não	24	Não	Não	24 – vivo
59	Não	2	22	28 – R	28
60	Pré-escapular	6	Não	3 – R	3
61	Pré-escapular	8	Não	22 – R	22
62	Não	24	Não	Não	27 – vivo
63	Não	3	Não	Não	14 – vivo
64	Não	2	Não	Não	16 – vivo
65	Não	4	Não	Não	16 – vivo
66	Não	6	Não	Não	14 – vivo
67	Não	5	Não	10 – R	10
68	Poplíteo	8	Não	Não	12 – vivo
69	Não	6	5	Não	12 – vivo
70	Não	4	8	10 – R	10
71	Não	3	Não	Não	12 – vivo
72	Não	1	2	4 – R	4
73	Não	2	5	9 – R	9
74	Não	9	Não	Não	12 – vivo
75	Não	2	Não	Não	12 – vivo
76	Não	2	Não	Não	13 – vivo
77	Não	7	6	10 – R	10
78	Não	3	Não	Não	12 – vivo
79	Não	5	Não	Não	14 – vivo
80	Não	4	13	Não	16 – vivo
81	Não	3	3	Não	12 – vivo

NR – Óbito Não Relacionado ao tumor; R – Óbito Relacionado ao tumor