UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

KARINE GERMANO CADROBBI

**Estudo do valor prognóstico de índices proliferativos e apoptóticos
em mastocitomas cutâneos caninos**

Pirassununga

2016

KARINE GERMANO CADROBBI

**Estudo do valor prognóstico de índices proliferativos e apoptóticos em
mastocitomas cutâneos caninos**

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Biociência Animal

Orientador: Prof. Dr. Ricardo de Francisco Strefezzi

Pirassununga

2016

Ficha catalográfica elaborada pelo
Serviço de Biblioteca e Informação, FZEA/USP,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

C126e Cadrobbi, Karine Germano
Estudo do valor prognóstico de índices
proliferativos e apoptóticos em mastocitomas cutâneos
caninos / Karine Germano Cadrobbi ; orientador
Ricardo de Francisco Strefezzi. -- Pirassununga,
2016.
70 f.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação
em Biociência Animal) -- Faculdade de Zootecnia e
Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo.

1. Mastocitoma canino. 2. Neoplasias cutâneas. 3.
Apoptose. I. Strefezzi, Ricardo de Francisco,
orient. II. Título.

Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte - o autor

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos
Seção de Apoio Acadêmico

Ofício SCAPACAD/CEP/FZEA/06/2016

DSM/aas

Pirassununga, 15 de junho de 2016.

Senhor Pesquisador,

De acordo com documento encaminhado na data de 24 de março de 2016, este Comitê aprova a alteração de título do projeto referente ao processo nº: **14.1.1422.74.5** sob responsabilidade do Prof. Dr. Ricardo de Francisco Strefezzi, para: **"Estudo do valor prognóstico de índices proliferativos e opoptóticos em mastocitomas cutâneos caninos"**, considerando que não houve alterações no manejo e no protocolo previamente submetidos.

Respeitosamente,

Profa. Dra. Daniele dos Santos Martins
Presidente do CEP FZEA/USP
junho/15 – junho/17

Professor Doutor Ricardo de Francisco Strefezzi
MD Representante Docente do ZMV - FZEA

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: CADROBBI, Karine Germano

Título: Estudo do valor prognóstico de índices proliferativos e apoptóticos em mastocitomas cutâneos caninos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos- Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu marido Tiago, por toda paciência, companherismo e compreensão em todos os momentos de nossas vidas e à minha família por sempre me ensinar os valores e princípios e por muitas vezes abdicarem de seus sonhos para que eu pudesse realizar os meus... A vocês, minha eterna gratidão.

Dedico também aos nossos tão amados e respeitados pacientes e a todos os animais que me motivam e me inspiram a sempre buscar o melhor. Obrigada por me trazer plena realização...

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Professor Dr. Ricardo de Francisco Strefezzi. Agradeço pela oportunidade, por todo apoio, dedicação, paciência ao me mostrar um mundo de novas experiências que me introduziram a patologia e principalmente por todo ensinamento.

A Lidia, Camila e Thiago que com tanta paciência e carinho me ajudaram com práticas laboratoriais, compartilhando toda experiência, trazendo ideias e palavras amigas. Vocês foram fundamentais.

Aos funcionários Nilton Pedro dos Santos, Sandra Oliveira e Arina Rochetti agradeço por compartilharem seus conhecimentos e por todo auxílio.

A minha amiga e companheira de mestrado Greice Cestari. Foi muito bom poder viver tudo isso com você. Obrigada por todo apoio, por me ouvir quando precisei e principalmente por sempre estar ao meu lado... Nossa amizade só cresceu e fico muito feliz com isso.

Ao amigo Rodrigo Ubukata por sempre me incentivar e por ser parte essencial em meu caminho na oncologia.

Aos meus amigos do Provet... Alessandra Rinah, Julina Cirillo, Karen Batschinski, Thiago Cadrobbi. Obrigada por tantas ideias, por compartilharem experiências comigo e principalmente por me ensinarem todos os dias. Não poderia escolher equipe melhor para minha vida!

A minha amiga Fernanda Malatesta que, mesmo à distância, sempre me ajuda em todos os momentos. Obrigada por ser uma pessoa que posso sempre contar!

Agradeço a todos os membros do LOCT que, mesmo à distância, com nosso grupo de emails, compartilharam suas experiências e conhecimentos.

Aos amigos Carolina Gonçalves, Daniel Sanches e aos colaboradores Adriana Nishiya e todo equipe do Hospital Veterinário da Faculdade Anhembi-Morumbi, José Guilherme Xavier, Silvia Regina Kleeb, Fabrizio Grandi do Hospital Público ANCLIVEPA- SP.

RESUMO

CADROBBI, K.G. **Estudo do valor prognóstico de índices proliferativos e apoptóticos em mastocitomas cutâneos caninos.** (Prognostic value of proliferative and apoptotic indexes in canine cutaneous mast cell tumors). 71f. Dissertação (Mestrado em Biociência Animal)- Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Mastocitoma é uma das principais neoplasias cutâneas em cães, caracterizada por uma multiplicação anormal de mastócitos, com comportamento biológico muito variável. Os principais fatores prognósticos incluem grau histopatológico, marcadores de proliferação, como índice mitótico, Ki67 e AgNOR, além de estadiamento clínico. Diversos estudos concentram-se na avaliação da relação da apoptose com a oncogênese e seu papel no prognóstico. Em condições fisiológicas, a apoptose ocorre na maturação e senescência celular, mantendo a homeostasia dos diferentes tecidos, removendo do organismo células que tenham sofrido alguma mutação. A genética da apoptose pode ser interrompida frente à ocorrência de mutações, levando à perda do controle na proliferação celular, o que resulta no desenvolvimento de uma neoplasia. O presente estudo avaliou a ocorrência de apoptose por meio de ensaio TUNEL em mastocitomas cutâneos caninos, com o objetivo de testar sua relação com as graduações histopatológicas e o valor prognóstico quanto à sobrevida pós-cirúrgica, assim como compará-lo à expressão imuno-histoquímica de caspase 3 e Ki67. Quarenta e quatro mastocitomas cutâneos caninos, provenientes de 36 cães, foram submetidos à avaliação histopatológica para graduação quanto à diferenciação tumoral, à análise imuno-histoquímica para avaliação das expressões de Ki67 e caspase 3. A marcação positiva para TUNEL não mostrou relação com grau histopatológico, nem foi um bom indicador para sobrevida ou mortalidade em função da doença. Apesar disso, houve correlação positiva entre os índices apoptóticos.

Palavras-chave: mastocitoma, proliferação, apoptose, cães.

ABSTRACT

CADROBBI, K.G. **Prognostic value of proliferative and apoptotic indexes in canine cutaneous mast cell tumors** (Estudo do valor prognóstico de índices proliferativos e apoptóticos em mastocitomas cutâneos caninos). 76f. Dissertação (Mestrado em Biociência Animal)- Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Mast cell tumor is a very common neoplasm in dogs and characterized by an abnormal proliferation of mast cells, with variable biological behavior. The main prognostic factors include histological grade, proliferation markers, such as mitotic index, Ki67 and AgNOR, and clinical staging. Several studies focus in the relation of apoptosis and oncogenesis and its role in prognostication. In physiological conditions, apoptosis occurs due to aging and cell senescence, maintaining the homeostasis of different tissues by removing mutated cells. The genetics of apoptosis can be interrupted by mutations, leading to loss of control in cellular proliferation, and resulting in cancer development. This study evaluated the occurrence of apoptosis by TUNEL assay in canine cutaneous mast cell tumors, compared it with histopathological grading and the immunohistochemical expressions of caspase-3 and Ki67, as well as tested its prognostic value for post-surgical survival. Forty-four canine cutaneous mast cell tumors, from 36 dogs were submitted to histopathologic and immunohistochemical analyses. Positive staining for TUNEL showed no relation with histological grade, and was not considered a good indicator for survival or mortality. Nevertheless, a positive correlation between the apoptotic indexes was found.

Keywords: mast cell tumor, proliferation, apoptosis, dogs.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Vias de ativação da apoptose.....	38
Figura 2 - Via extrínseca da apoptose	39
Figura 3 - Ativação da via intrínseca da apoptose	40
Figura 4 - Marcação positiva por ensaio TUNEL em mastocitoma cutâneo canino...	49
Figura 5 - Distribuição das raças dos animais incluídos no estudo	51
Figura 6 - Distribuição das contagens de células positivas por campo em ensaio TUNEL em função da graduação histopatológica segundo Patnaik et al. (1984).....	54
Figura 7 - Distribuição das contagens de células positivas por campo em ensaio TUNEL em função da graduação histopatológica segundo Kiupel et al. (2011).....	55
Figura 8 - Distribuição das contagens de células positivas em ensaio TUNEL para animais com óbito em função da neoplasia e animais censurados	55
Figura 9 - Correlação entre imunomarcação de caspase 3 e células positivas em ensaio TUNEL	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Resumo dos critérios para graduação histopatológica de mastocitomas cutâneos caninos propostos por Patnaik, Ehler e Macewen (1984).....	23
Tabela 2 -	Classificação histopatológica de mastocitomas subcutâneos segundo Thompson et al. (2011).....	25
Tabela 3 -	Estadiamento clínico para mastocitomas segundo a OMS (WELLE et al., 2008).....	26
Tabela 4 -	Distribuição do índice mitótico proposto por Romansik et al., 2007.....	28
Tabela 5 -	Classificação das proteínas do grupo Bcl-2 de acordo com seu domínio e estímulo.....	41
Tabela 6 -	Distribuição em relação a localização anatômica.....	52
Tabela 7 -	Distribuição dos casos analisados em função da graduação histopatológica segundo Patnaik et al. (1984) e marcação positiva em TUNEL (média do número de células positivas em 5 campos <i>hot spots</i>).....	53
Tabela 8 -	Distribuição dos casos analisados em função da graduação histopatológica segundo Kiupel et al. (2011) e marcação positiva em TUNEL (média do número de células positivas em 5 campos <i>hot spots</i>).....	54

SUMÁRIO

1. Introdução e Objetivos	16
2. Revisão de Literatura	18
2.1. Mastócitos	18
2.2. Mastocitomas caninos.....	19
2.2.1. Incidência e Etiopatogenia	19
2.2.2. Comportamento biológico e Sinais clínicos.....	20
2.2.3. Diagnóstico e Características histopatológicas.....	21
2.2.4. Imuno-histoquímica	25
2.2.5. Fatores prognósticos.....	25
2.2.5.1. Receptor KIT	27
2.2.5.2. Marcadores de proliferação.....	28
2.2.5.3. Índice mitótico (MI).....	28
2.2.5.4. Contagem de células positivas para Ki67	29
2.2.5.5. Contagem de células positivas para PCNA	30
2.2.5.6. Contagem de AgNORs.....	30
2.2.6. Tratamento	31

2.2.6.1. Cirurgia.....	31
2.2.6.2. Radioterapia	32
2.2.6.3. Quimioterapia	32
2.2.6.4. Inibidores de receptores tirosinoquinase.....	34
2.2.6.5. Crioterapia	35
2.2.6.6. Eletroquimioterapia	36
2.3. Apoptose	36
2.3.1. Via extrínseca.....	37
2.3.2. Via intrínseca.....	39
2.3.3. Via Perforina/ granzima.....	42
2.3.4. Relação entre apoptose e câncer	42
3. Materiais e métodos	44
3.1. Origem do material e dados clínicos	44
3.2. Critérios de inclusão.....	45
3.3. Processamento histopatológico	45
3.4. Graduação histopatológica.....	45
3.5. Processamento imuno-histoquímico	45

3.6. Avaliações imuno-histoquímicas	46
3.7. Ensaio TUNEL.....	47
3.8. Análise TUNEL.....	47
3.9. Análises estatísticas.....	48
4. Resultados e discussão	50
4.1. Estudo clínico	50
4.2. Estudo laboratorial	52
5. Conclusões.....	59
Referências bibliográficas	60

Introdução e Objetivos

Mastocitoma é a neoplasia cutânea mais comum em cães. Pode representar até 21% das neoplasias de pele nesta espécie (FINNIE; BOSTOCK, 1979). Ocorrem preferencialmente animais de meia idade e idosos, porém animais jovens também podem ser acometidos (BLACKWOOD et al., 2012). A incidência mais elevada em determinadas raças sugere influências genéticas (LONDON; THAMM; VAIL, 2013), mas a etiologia não é bem definida, apesar de alterações inflamatórias crônicas serem consideradas um fator de risco (THAMM; VAIL, 2007). Receptores KIT são responsáveis pela proliferação de mastócitos. Alterações genéticas relacionadas ao proto-oncogene *KIT*, que codifica este receptor, desempenham papel importante na tumorigênese dos mastocitomas (LONDON et al., 1999).

Clinicamente mastocitomas apresentam-se como nódulos únicos, por vezes são ulcerados, alopecicos, pruriginosos, macios a firmes (TAMS; MACY, 1981; NORTH; BANKS, 2009). Localizam-se principalmente em membros, região torácica e perineal (WELLE et al., 2008).

Mastócitos, sejam normais ou neoplásicos, caracterizam-se pela presença de grânulos citoplasmáticos compostos por substâncias vasoativas como histamina, heparina, citocinas, fator de necrose tumoral e enzimas proteolíticas. A liberação destes grânulos, conhecida como desgranulação, leva ao aparecimento de sinais clínicos sistêmicos, como emese, hematoquesia, dor abdominal, hipotensão arterial, retardo na cicatrização (BLACKWOOD et al., 2012). Metástases podem ocorrer principalmente para linfonodo sentinela, baço, fígado e raramente para pulmões (THAMM; VAIL, 2007).

O comportamento biológico dos mastocitomas caninos é extremamente variável e está relacionado com a graduação histopatológica, que é considerada o principal indicador prognóstico para esta neoplasia. Atualmente duas propostas para graduação são mais utilizadas: a primeira divide os mastocitomas em 3 graus, considerando morfologia celular e nuclear, índice mitótico, celularidade, envolvimento tecidual e a reação estromal (PATNAIK et al., 1984); e a segunda os divide em baixo e alto grau baseando-se em presença de cariomegalia e/ou contagem de figuras de mitose, de células multinucleadas e de núcleos bizarros (KIUPEL et al., 2011). Apesar disso, a graduação histopatológica não pode ser considerada como critério preditivo isoladamente, necessitando de complementação

por outros fatores prognósticos, como a ocorrência de recidiva, a presença de sinais sistêmicos paraneoplásicos, raça, presença de mutação do gene *KIT* e quantificação de marcadores de proliferação, principalmente de Ki67 (BOSTOCK et al., 2012).

As modalidades terapêuticas para o tratamento do mastocitoma incluem cirurgia, quimioterapia, radioterapia, eletroquimioterapia e inibidores tirosinoquinase. A escolha do melhor tratamento deve ser baseada no estadiamento clínico associado aos fatores prognósticos (BLACKWOOD et al., 2012; WITHROW et al., 2013).

A capacidade de sobrevivência das células neoplásicas pode ser aumentada por diminuição na sinalização da apoptose, ou por mecanismos de resistência à morte celular programada. Isto pode ocorrer por desequilíbrio entre proteínas pró e anti-apoptóticas, por redução na função de moléculas efetoras da cascata de apoptose, as caspases, ou por falhas na sinalização dos receptores de morte celular (WONG, 2011). Ao mesmo tempo, uma neoplasia pode persistir e crescer graças às altas taxas de proliferação celular. Poucos estudos em medicina veterinária demonstram uma associação entre mecanismos apoptóticos, índices de proliferação e prognóstico da doença.

Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a ocorrência de apoptose por meio de ensaio TUNEL em mastocitomas cutâneos caninos, testar sua relação com as graduações histopatológicas e seu valor prognóstico quanto à sobrevida pós-cirúrgica, assim como compará-lo à expressão imuno-histoquímica de caspase 3 e Ki67.

2. Revisão de Literatura

2.1 Mastócitos

Mastócitos são originários de células hematopoiéticas progenitoras. Ainda imaturos, são liberados para a corrente sanguínea, migrando para os demais tecidos como tecido conjuntivo, derme, pulmões e mucosas, onde passam por maturação, momento em que ocorre a formação dos grânulos citoplasmáticos. Dois tipos de mastócitos são descritos por apresentarem diferenças estruturais e bioquímicas, além de sua localização: mastócitos de mucosa, encontrados predominantemente em intestinos e pulmões, e mastócitos de tecido conjuntivo, predominantes na pele e tecido subcutâneo (KRISHNASWANY; AJITAWI; CHI, 2006).

A presença de grânulos citoplasmáticos é a característica principal destas células. São compostos por substâncias vasoativas como heparina, histamina, citocinas, fator de necrose tumoral, enzimas proteolíticas e fator de crescimento de fibroblastos. A liberação dos grânulos pode acontecer por exocitose, secundária à interação entre receptores de IgE, presentes na superfície celular, e um antígeno. Este processo, chamado de desgranulação, promove inflamação, remodelamento e angiogênese (KRISHNASWANY; AJITAWI; CHI, 2006; KIERSZENBAUM, 2008; KUMAR; SHARMA, 2010). Quando corados com corantes azuis, como o azul de toluidina, os grânulos assumem coloração púrpura-avermelhada, características denominada como metacromasia (YONG et al.; 2007).

Mastócitos também expressam em sua superfície receptores tirosinoquinase KIT. Estes receptores, quando ativados pelo fator de célula-tronco (SCF), promovem a proliferação, diferenciação e maturação celular, atuando como determinante no desenvolvimento de mastócitos normais e neoplásicos (GALLI; ZSEBO; GEISLER, 1994). A expressão do receptor KIT, permite a identificação de mastócitos por imuno-histoquímica (WALLS et al., 1990).

2.2 Mastocitomas caninos

2.2.1 Incidência e etiopatogenia

Neoplasias cutâneas e subcutâneas são as mais prevalentes em cães, representando cerca de 30% de todas as neoplasias. Entre elas, o mastocitoma cutâneo é o mais comum, representando de 16 a 21% das neoplasias de pele nesta espécie (FINNIE; BOSTOCK, 1979; BOSTOCK, 1986; ROTHWELL et al., 1987, WEBSTER, 2015).

Animais acima de sete anos são mais frequentemente afetados, embora animais jovens, entre três a sete anos, possam ser acometidos (BLACKWOOD et al, 2012; MULLINS et al, 2006). Não há evidências consistentes quanto a predisposição por gênero, embora o estudo realizado por White et al. (2011) sugira que fêmeas castradas apresentem risco maior para o desenvolvimento de mastocitomas (HOWARD et al., 1969; PATNAIK; EHLER; MACEWEN, 1984; CAHALANE-GABB; HUNT; FRANCE., 2003; THAMM; VAIL, 2007).

A etiologia ainda não é bem definida, sendo que as dermatopatias inflamatórias crônicas uma hipótese a ser considerada (THAMM; VAIL, 2007). Lombard e Monoley (1959) consideraram a hipótese de etiologia viral através de estudos realizados *in vitro*, porém esta possibilidade não pode, até o momento, ser confirmada por estudos epidemiológicos.

Algumas raça são relatadas como predispostas, dentre elas Buldogue e seus descendentes como Boxer, Boston Terrier, Buldogue Inglês e Pug. Dependendo da região do estudo, Labrador, Golden Retriever, Cocker Spaniel, Schnauzer, Beagle, Rhodesian Rigebacks, Weimaraner, Sharpei também são citados. No entanto, os mecanismos moleculares genéticos e etiopatogenia envolvidos no desenvolvimento e progressão da doença ainda não foram elucidados (LONDON; THAMM; VAIL, 2013; PATNAIK; EHLER; MACEWEN, 1984; ROTHWELL et al., 1987; WHITE et al., 2011). Mutações relacionadas ao cromossomo X, associadas principalmente à raça Boxer, foram demonstradas. Apesar disso, sabe-se que cães desta raça apresentam um prognóstico mais favorável (MISDORP, 1996; WU, HAYASH, INOUE, 2006).

A expressão do receptor KIT em mastocitomas caninos foi identificada por London et al. (1999), propondo que este receptor tem um importante papel na etiologia desta neoplasia. Esta é a alteração genética melhor estudada para a

neoplasia. O proto-oncogene *KIT* codifica o receptor tirosinoquinase KIT (CD117), responsável por desencadear a proliferação de mastócitos. Dentro do domínio justamembrana do gene *KIT*, nos exons 11 e 12, e do domínio extracelular, nos exons 8 e 9, diversas anormalidades foram identificadas, como mutações pontuais, deleções e duplicações. Tais alterações resultam na ativação do receptor KIT de forma constitutiva, ou seja, independente da sua ligação com SCF. Desta forma, há perda da regulação da transdução de sinais do receptor KIT, levando à proliferação e sobrevivência anormal dos mastócitos, favorecendo assim o desenvolvimento da neoplasia (LONDON et al., 1999; DOWNING et al., 2002; PREZIOSI et al., 2004; LETARD et al., 2008).

2.2.2 Comportamento biológico e sinais clínicos

O comportamento biológico dos mastocitomas caninos é extremamente variável, mas está relacionado ao grau de diferenciação celular na maioria dos casos. Tumores bem diferenciados apresentam-se na forma de pequenas lesões com evolução lenta. Já os tumores pouco diferenciados apresentam-se, por vezes como lesões ulceradas associadas a inflamação local, com histórico de evolução rápida. No entanto, não se pode definir um padrão para características clínicas dos mastocitomas. Podem se apresentar como formações alopecicas, eritematosas, com edema peritumoral, pruriginosas e de consistência macia a firme, mimetizando outras alterações cutâneas, neoplásicas ou não (TAMS; MACY, 1981; NORTH; BANKS, 2009; BLACKWOOD et al., 2012). Geralmente, são nódulos únicos, contudo, lesões múltiplas são relatadas em 5 a 25% dos casos (WELLE et al., 2008). Em estudo realizado por McNiel et al. (2006) observou-se uma tendência de cães da raça Pug ao desenvolvimento de lesões múltiplas, contudo o comportamento da neoplasia nestas situações foi favorável.

Mastocitomas acometem principalmente a derme e o tecido subcutâneo. Cerca de 50% dos casos localizam-se no tronco e região perineal, 40% em membros e aproximadamente 10% em região de cabeça e pescoço, apesar de existirem relatos desta neoplasia em conjuntiva, nasofaringe, laringe, glândula salivar, cavidade oral, ureter e medula espinhal (PATNAIK; EHLER; MACEWEN, 1984; MACY, 1985; O'KEEFE, 1990; SIMÕES; SCHONING; BUTINE, 1994; IWATA et al., 2000; DOBSON; SCASE, 2007; WELLE et al., 2008;).

Os sinais clínicos dos mastocitomas estão intimamente relacionados à desgranulação dos mastócitos. Este evento leva à liberação massiva dos grânulos de histamina e heparina para circulação sistêmica, além da ativação de enzimas proteolíticas. A hiper-histaminemia estimula as células parietais gástricas, através dos receptores H₂, aumentando a secreção de ácido clorídrico, o que pode ocasionar emese e úlceras gastrointestinais, com consequentes hematoquesia, melena e dor abdominal. Em casos mais graves, a elevação dos níveis séricos de histamina pode levar à hipotensão arterial, choque e óbito. A hiper-heparinemia pode ocasionar coagulopatias, e o retardo na cicatrização pode ocorrer pela ação das enzimas proteolíticas. A desgranulação pode ocorrer espontaneamente ou ainda secundária a estímulos mecânicos, como manipulação do tumor, realização de citologia para fim diagnóstico ou, ainda, durante o procedimento cirúrgico. A desgranulação também pode se apresentar com efeitos locais, conhecidos como “Sinal de Darier”, caracterizado por eritema e edema peritumoral (FOX et al., 1990; BLACKWOOD et al., 2012).

Metástases ocorrem principalmente para os linfonodos regionais, baço e fígado. Eventualmente, mastócitos neoplásicos podem ser observados na medula óssea, ou no sangue periférico, quando ocorre disseminação sistêmica da doença. Metástase pulmonar raramente ocorre (THAMM; VAIL, 2007). O potencial metastático varia conforme a graduação histopatológica e os índices de proliferação da neoplasia. Nos mastocitomas de grau I, a metástase ocorre em 10% dos casos (THAMM; VAIL, 2007). Já nos mastocitomas de grau II a ocorrência de metástase aumenta para 5 a 22% dos casos (SEGUIN et al., 2001; WEISSE; SHOFER; SORENMO, 2002), e nos de grau III pode variar entre 55 a 96% (HUME et al., 2011).

2.2.3 Diagnóstico e características histopatológicas

A citologia por agulha fina (CAF) é considerada o exame de escolha para triagem no diagnóstico desta neoplasia, uma vez que, assim como outras neoplasias de células redondas, esfoliam com facilidade durante a coleta. Com uma acurácia de 92 a 96% dos casos, a citologia é considerada uma técnica simples e de baixo custo (THAMM; VAIL, 2007). Os grânulos intracitoplasmáticos são característicos de mastócitos. Podem ser evidenciados pela coloração de Romanowsky, onde adquirem uma coloração púrpura. Porém, outras colorações como o Azul de

Toluidina e Giemsa podem ser necessárias principalmente em casos de mastocitomas pouco diferenciados, uma vez que a coloração varia de acordo com a quantidade e tamanho dos grânulos, o que está diretamente relacionado com o grau de diferenciação da neoplasia (CANNAS et al., 1994; BAKER-GABB; HUNT; FRANCE, 2003; BLACKWOOD et al., 2012). Como descrito por Strefezzi et al. (2003), a avaliação morfométrica nuclear na citopatologia também pode ser um importante indicador no grau de diferenciação desta neoplasia. A CAF é uma excelente ferramenta, pois possibilita o diagnóstico previamente à cirurgia, direcionando assim a extensão de suas margens de segurança (STREFEZZI et al., 2003).

O exame histopatológico se faz necessário para uma graduação precisa, sendo o padrão-ouro para o diagnóstico final e também para graduação quanto à diferenciação tumoral (BLACKWOOD et al., 2012).

Scarpa et al. (2014) avaliaram 50 amostras citológicas obtidas antes da cirurgia de mastocitomas, comparando-as com a graduação histopatológica segundo Kiupel et al. (2011), utilizando critérios como número de mitoses, células multinucleadas, presença de núcleos bizarros e cariomegalia. A acurácia da citograduação foi considerada 94% com sensibilidade de 84,6% e especificidade de 97,3% utilizando os valores de corte proposto por Kiupel et al. (2011).

Três sistemas de classificação histopatológica para mastocitomas cutâneos foram descritos na literatura. No primeiro, proposto por Bostock (1973), foram considerados a razão entre núcleo e citoplasma, o número de figuras de mitose, o pleomorfismo celular, a celularidade e a metacromasia dos grânulos. Mastocitomas bem diferenciados eram classificados como grau III, moderadamente diferenciados como grau II, e pouco diferenciados como grau I.

O segundo sistema, proposto por Patnaik et al. (1984) é o mais amplamente utilizado. Baseou-se na morfologia celular e nuclear, índice mitótico, celularidade, envolvimento tecidual e a reação estromal para determinar a graduação histológica (Tabela 1). Este sistema também classificava os mastocitomas em três diferentes graus, sendo os de grau I os mastocitomas bem diferenciados, grau II os mastocitomas moderadamente diferenciados, e grau III os pouco diferenciados (PATNAIK et al., 1984).

Os tumores classificados como pouco diferenciados, em ambos os sistemas, foram associados à menor sobrevida (BOSTOCK, 1973; PATNAIK; EHLER; MACEWEN, 1984).

Tabela 1 – Resumo dos critérios para graduação histopatológica de mastocitomas cutâneos caninos propostos por Patnaik, Ehler e Macewen (1984)

Características histopatológicas	
Grau I	Mastócitos monomórficos, bem diferenciados restritos à derme
	Ausência de figuras de mitose
	Ausência de reação estromal e/ou necrose
Grau II	Mastócitos moderadamente pleomórficos
	Distribuídos na derme e subcutâneo
	0-2 figuras de mitose/campo à objetiva de 40x
Grau III	Edema, necrose, estroma fibrocolagenoso
	Mastócitos pleomórficos
	Dispostos em lençóis que substituem os tecidos subcutâneo e adjacentes
	3-6 figuras de mitose/campo à objetiva de 40x
	Hemorragia, necrose, edema, colágeno hialinizado

A classificação proposta por Patnaik et al. (1984) foi amplamente utilizada por patologistas na Europa, Estados Unidos e também no Brasil (STREFEZZI et al., 2003; MISDORP, 2004; BLACKWOOD et al., 2012). Um grande número de estudos confirmaram sua relação com a sobrevida. Embora a classificação histopatológica tenha importante valor prognóstico, diversos trabalhos demonstraram variações entre observadores, principalmente em tumores classificados como grau II, os quais representam cerca de 40% dos casos. Isto ocorre uma vez que alguns critérios de avaliação são subjetivos (ABADIE; AMARDEILH; DELVERDIER, 1999; GINN et al., 2000; MAGNOL; STREFEZZI et al., 2003; MULLINS et al., 2006; KIUPEL et al., 2005).

Segundo Northrup et al. (2005), a concordância absoluta entre 10 patologistas que avaliaram sessenta casos de mastocitomas foi de apenas 7%. A subjetividade

de alguns critérios propostos por Patnaik et al. (1984), e até mesmo a heterogeneidade de diferentes áreas presentes em um único tumor, são fatores que devem ser considerados nesta avaliação.

Com o objetivo de reduzir a variação entre observadores e melhorar a acurácia da avaliação histopatológica como valor prognóstico, foi proposta uma nova classificação, na qual os mastocitomas foram distribuídos em apenas baixo grau e alto grau, excluindo-se a graduação intermediária (KIUPEL et al., 2011). São considerados tumores de alto grau aqueles que apresentam qualquer das seguintes características, em 10 campos à objetiva de 40x:

- cariomegalia em pelo 10% das células;
- 7 figuras de mitose ou mais;
- 3 células multinucleadas ou mais;
- 3 núcleos bizarros ou mais.

Segundo Kiupel et al. (2011) a principal variação na concordância entre os patologistas que participaram do estudo ocorreu entre os mastocitomas de graus I e II, embora não houvesse diferença no tempo de sobrevida entre os dois grupos. Portanto, os tumores classificados como graus II foram reclassificados como baixo grau ou alto grau de malignidade. A concordância na graduação dos mastocitomas neste estudo foi de 99,3% entre os 28 patologistas envolvidos.

Outros estudos realizados para comparar os sistemas de graduação propostos por Patnaik et al. (1984) e Kiupel et al. (2011) também mostraram maior concordância nos diagnósticos quando os mastocitomas são classificados em apenas dois grupos, além de demonstrar um valor prognóstico superior quando comparado a classificação em três graus distintos (TAKEUCHI et al., 2013; SABATTINI et al., 2015).

Os mastocitomas subcutâneos não seguem as classificações descritas anteriormente. Estes podem ser classificados de acordo com as características descritas por Thompson et al. (2011) (Tabela 2).

Embora a graduação histopatológica tenha valor prognóstico, ainda está sujeita a variações e, por este motivo, não deve ser considerada isoladamente como um critério preditivo quanto ao comportamento biológico dos mastocitomas. Desse

modo, análises complementares devem ser realizadas com o objetivo de se obter um prognóstico preciso.

Tabela 2 - Classificação histopatológica de mastocitomas subcutâneos segundo Thompson et al. (2011)

Tipo	Características Histopatológicas
Circunscritos	Bem delimitados Altamente celulares Crescimento expansivo
Combinado	Nódulos solitários Células arrançadas em fileiras, agregados densos Células isoladas, abundante tecido fibrocolagenoso
Infiltrativo	Células arrançadas semelhantes ao combinado, porém sem demarcação com o tecido adjacente normal

2.2.4 Imuno-histoquímica

A reação imuno-histoquímica pode ser uma ferramenta útil na confirmação do diagnóstico, principalmente para mastocitomas pouco diferenciados. É também utilizada para fornecer informações sobre o prognóstico dos mastocitomas. A técnica permite a identificação de epítomos no tecido em estudo através da reação entre antígeno e anticorpo (LONDON et al., 1996).

2.2.5 Fatores prognósticos

Dentre os fatores prognósticos de maior relevância para mastocitomas cutâneos, destacam-se a graduação histopatológica, o estadiamento clínico, a localização das lesões, ocorrência de recidivas, presença de sinais sistêmicos, raça do animal, marcadores de proliferação e presença de mutação no gene *KIT*. Porém, estes devem ser considerados e avaliados em conjunto para melhor previsão do comportamento biológico dos mastocitomas caninos (BOSTOCK et al., 2012). Dentre eles, o grau histopatológico é considerado o fator prognóstico de maior impacto na sobrevida de cães com esta doença (KIUPEL et al., 2005).

O estadiamento clínico instituído pela Organização Mundial de Saúde (OMS) tem um importante valor prognóstico em diversas neoplasias em humanos e em animais (Tabela 3), porém deve ser utilizado em associação a outros fatores prognósticos (LONDON; THAMM; VAIL, 2013).

Tabela 3- Estadiamento clínico para mastocitomas segundo a OMS (WELLE et al., 2008).

Estadio	Características
0	Nódulo único Restrito à derme Sem envolvimento de linfonodo regional
I	Nódulo único Restrito à derme Sem envolvimento de linfonodo regional
II	Nódulo único Restrito à derme Com envolvimento de linfonodo regional
III	Múltiplos nódulos na derme ou Grande neoplasia infiltrativa Com ou sem envolvimento de linfonodo regional
IV	Presença de metástase à distância ou Presença de recidiva

Quanto à localização anatômica, ainda não existe um consenso quanto ao seu valor prognóstico. Alguns autores sugerem que mastocitomas em leito ungueal, cavidade oral, nariz, região inguinal e perineal, prepúcio e junções mucocutâneas estão relacionados prognósticos piores (GIEGER et al., 2003; GOVIER, 2003; LONDON; THAMM; VAIL, 2013; MULLINS et al., 2006; O'KEEFE, 1990). Contudo, dados de outros autores não corroboram estas informações (CAHALANE et al., 2004; SFILIGOI et al., 2005).

A recidiva confere um pior prognóstico nos mastocitomas cutâneos. A sobrevida em animais que apresentam recidiva é significativamente menor quando comparada a animais que não apresentaram recorrência. Tratamentos adjuvantes,

como a quimioterapia, podem beneficiar os pacientes após cirurgia com margens comprometidas, pois diminuem o risco de recidiva (FOX et al., 1998; THAMM, 1999).

2.2.5.1 Receptor KIT

KIT é um receptor de membrana tirosinoquinase, codificado pelo gene *KIT*. O gene *KIT* (ou c-kit) é um proto-oncogene, descrito em 1987 por Axel Ullrich como um homólogo do oncogene v-kit. É considerado um potencial marcador de mastócitos caninos, sendo útil portanto para o diagnóstico (WALLS et al., 1990; YANG et al., 2000; YARDEN et al., 1987).

Estudos mostram que cerca de 15 a 40% dos cães acometidos por mastocitoma apresentam mutações principalmente no domínio justamembrana do gene *KIT* e estas alterações estão associadas à progressão da doença, aumento no risco de recidiva, menor sobrevida e pior prognóstico (KIUPEL et al., 2004; TAKEUCHI et al., 2012; AMAGAI et al., 2013). Os tumores de alto grau de malignidade estão frequentemente associados a mutações do *KIT*, considerado um marcador prognóstico para mastocitomas caninos (ZEMKE; YAMINI; YUZHASIYANGURKAN, 2002; LONDON; SEGUIN, 2003; WEBSTER et al., 2004; WELLE et al., 2008).

Três padrões distintos de localização desta proteína foram descritos: membranoso, citoplasmático focal e citoplasmático difuso (PREZIOSI et al., 2007). Mastócitos caninos não-neoplásicos têm expressão exclusivamente membranoso (KIUPEL et al., 2004). Segundo Preziosi e colaboradores (2007), o padrão de distribuição do receptor KIT tem relação com a graduação histológica e, conseqüentemente, com o comportamento biológico da neoplasia. A importância do padrão de distribuição de KIT ainda não é bem definida. Alguns autores demonstram uma associação entre a expressão citoplasmática com o aumento nos índices de proliferação, recidiva e menor sobrevida (KIUPEL et al., 2004; WEBSTER et al., 2007).

Casagrande et al. (2013) não encontraram relação entre os padrões de marcação de KIT com tempo de sobrevida. Segundo WEBSTER et al. (2006), a localização aberrante da proteína em questão e mutações em KIT estão associadas com o aumento da expressão de marcadores de proliferação celular e com pior prognóstico.

2.2.5.2 Marcadores de proliferação

Os marcadores de proliferação são indicadores considerados menos subjetivos ao serem capazes de predizer o prognóstico da doença e a resposta à terapia. Os mais utilizados são índice mitótico (MI), expressão da proteína Ki67 e do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA), além de contagem de Regiões Organizadoras Nucleolares com afinidade por prata (AgNOR) (MAGLENNON et al., 2008; SCASE et al., 2006; SIMÕES et al., 1994; STREFEZZI et al., 2010; VASCELLARI et al., 2013; WEBSTER et al., 2007;).

2.2.5.3 Índice Mitótico (MI)

O MI é a contagem do número de figuras de mitose presentes em dez campos à objetiva de 40 aumentos (ELSTON et al., 2009; MAIOLINO et al., 2005; VASCELLARI et al., 2013). Embora tecnicamente simples, esta avaliação pode não ser fielmente reproduzida por não ser possível selecionar os mesmos campos, além de representar apenas a fase de mitose do ciclo celular (QUINN; WRIGHT, 1990).

Segundo Romansik et al. (2007) o MI correlaciona-se diretamente com o grau histológico (Tabela 4). Tumores com alto MI apresentam maior risco de metástase e menor tempo de sobrevida, sendo considerado um bom marcador preditivo.

Tabela 4- Distribuição do índice mitótico proposto por Romansik et al., 2007

Figuras de mitoses em 10 campos à objetiva de 40x	
Grupo 1	≤ 5
Grupo 2	6-9
Grupo 3	10-29
Grupo 4	≥30

Considerando os 4 grupos descritos na Tabela 4, não houve diferença em tempo médio de sobrevida entre os grupos 2, 3 e 4, o que gerou uma nova análise, separando as amostras em 2 grupos considerando 5 figuras de mitose em 10 campos à objetiva de 40x como valor de corte, comparando-o o grau histológico. Demonstrou-se que mastocitomas grau II com MI>5 tiveram menor tempo de

sobrevida (3 meses) quando comparado com tumores que apresentaram MI<5 (80 meses). Concluiu-se que o MI pode ser considerado como preditivo de comportamento biológico, sendo um bom indicador prognóstico para mastocitomas caninos.

2.2.5.4 Contagem de células positivas para Ki67

Ki67 é uma proteína nuclear expressa em todas as fases do ciclo celular, exceto nas células que não estão mitoticamente ativas, ou seja, determina o número de células que estão no ciclo celular de G1 à fase M. Sua localização e sua expressão são reguladas durante o ciclo celular e a inibição desta proteína leva à parada do ciclo (LAPRIE et al., 1998; QUINN; WRIGHT, 1990; ROELS et al., 1999; SCASE et al., 2006; WEBSTER et al., 2007).

Sua detecção é feita por imuno-histoquímica e, por possuir meia-vida muito curta, sendo degradada cerca de uma hora após a mitose, mesmo marcações fracas podem ser consideradas positivas. A expressão de Ki67 em células neoplásicas está intimamente relacionada ao prognóstico para diversas neoplasias caninas, incluindo mastocitomas (LABELLE et al., 2004; LAPRIE et al., 2001; PEÑA et al., 1998; PHILLIPS et al., 2000; VASCELLARI et al., 2012).

Diferentes métodos de contagem para avaliação do Ki67 são descritos. A primeira forma descrita foi pela porcentagem de núcleos positivos em 1000 núcleos ao acaso, em 10 campos randomizados (ABADIE et al., 1990; SAKAI et al., 2002). STREFEZZI et al. (2010) utilizou uma forma semelhante à descrita anteriormente, contudo os campos escolhidos para contagem foram os de maior frequência de marcação (*“hot spots”*). Outra forma de avaliação foi descrita por Webster et al. (2007) onde a contagem de células positivas foi feita com auxílio de um retículo de 1 cm³ em 5 *hot spots*.

A alta expressão desta proteína em mastocitomas caninos está associada a maiores taxas de mortalidade, recorrência local e metástases. Esta relação independe do grau histológico e, em tumores classificados como grau II, a imunomarcação de Ki67 é mais precisa quanto a previsão do comportamento biológico em comparação ao grau histológico (ABADIE et al., 1999; SCASE et al., 2006, STREFEZZI et al., 2010; WEBSTER et al., 2007).

2.2.5.5 Contagem de células positivas para PCNA

PCNA é uma proteína auxiliar na replicação e no reparo do DNA. Sua maior expressão é identificada principalmente na fase de síntese (fase S), porém pode também ser detectada em G1 até a transição G2-M (SIMÕES et al., 1994; WEBSTER et al., 2007).

Em estudo realizado por Simões e colaboradores (1994) foi observado que a alta expressão de PCNA está relacionada com maior índice de metástase e recorrência local. Contudo, outros autores não confirmaram esta observação e não consideram o PCNA como um marcador prognóstico relevante (ABADIE et al., 1990; SIMÕES; SCHONING, 1994; SCASE et al., 2006; WELLE et al., 2008). Uma das possibilidades que explica esta discordância é, por apresentar uma meia-vida longa, termina por marcar células que já completaram a mitose e, portanto não estão em proliferação (WEBSTER et al., 2007).

2.2.5.6 Contagem de AgNORs

A técnica foi utilizada pela primeira vez em mastocitomas caninos por Bostock et al. (1989). AgNORs são regiões organizadoras envolvidas na transcrição do RNA ribossomal que apresentam afinidade pela prata. São marcadores da atividade metabólica tumoral que se ligam a moléculas de prata permitindo a visualização do nucléolo para que assim, seja feita avaliação do tamanho e do número de pontos corados pela prata (PLOTON et al., 1986). Altos índices de AgNOR correlacionam-se ao aumento a mortalidade, metástase e reciva local em cães com mastocitomas (BOSTOCK et al., 1989; SIMÕES et al., 1994).

Quando utilizado isoladamente AgNOR não pode ser considerado um bom marcador preditivo, principalmente pela ausência de padronização do protocolo histoquímico e consequentemente de seu escore para avaliação. A correlação com sobrevida é mais precisa quando utiliza-se avaliação de Ki67 (SCASE et al., 2006).

2.2.6 Tratamento

Diversas são as opções terapêuticas para o tratamento do mastocitoma cutâneo canino. A escolha da melhor opção de tratamento deve se basear em critérios relevantes, como apresentação e estadiamento clínico além dos fatores prognósticos. Como principais opções de tratamento podemos citar a cirurgia, quimioterapia, inibidores de tirosinoquinase, eletroquimioterapia e radioterapia. Estas podem ser utilizadas como tratamento único ou ainda em associações (BLACKWOOD et al., 2012; LONDON; THAMM; VAIL, 2013; WELLE et al., 2008).

2.2.6.1 Cirurgia

Cirurgia com amplas margens é o tratamento de escolha para o mastocitoma cutâneo canino localizado, não metastático. Segundo Thamm e Vail (2003) margens cirúrgicas de 3 cm em lateralidade e ao menos um plano tecidual em profundidade seriam adequadas para o controle local da doença. Segundo Simpsom et al. (2004) e Fulcher et al. (2006), margens de 2 cm já seriam suficientes no tratamento dos mastocitomas cutâneos. Mais recentemente, Schultheiss et al. (2011) sugere que mastocitomas de 2 a 3,1 cm, de graus I e II segundo Patnaik et al. (1984), são adequadamente controlados com apenas 1 cm de margem em lateralidade e 4 mm de profundidade. No entanto, esta segurança não se aplica para tumores grau III que são mais localmente mais invasivos. Para estes, as margens cirúrgicas de 3 cm são fortemente indicadas e, ainda assim, o risco de recorrência local parece ser alto (THAMM; VAIL, 2007).

Em regiões anatômicas que impossibilitam a exérese cirúrgica com amplas margens, como membros, região perineal e face a associação de outras modalidades terapêuticas se faz necessária (BLACKWOOD et al., 2012; LONDON; THAMM; VAIL, 2013; WELLE et al., 2008).

Margens cirúrgicas devem ser consideradas comprometidas quando na avaliação histopatológica forem detectados grupos de mastócitos com características neoplásicas. Mastócitos isolados e esparsos podem estar presentes na pele normal, sem apresentar-se necessariamente comprometida pela neoplasia (FULCHER et al., 2006).

Em situações de margens cirúrgicas comprometidas, mesmo sem sinais de recidiva, o tratamento local complementar deve ser instituído, seja através de um segundo procedimento cirúrgico, ou radioterapia (SEGUIN et al., 2005; WELLE et al., 2008). Embora o risco de recidiva após exérese incompleta seja variável entres os diversos estudos, é consenso entre eles que as margens comprometidas são um elemento prognóstico negativo, levando à redução do tempo de sobrevida (BOSTOCK et al., 1989; THAMM; MAULDIN; VAIL, 1999; MURPHY et al., 2004).

2.2.6.2 Radioterapia

Geralmente utilizada como tratamento adjuvante para margens comprometidas, a radioterapia demonstra-se como uma eficaz modalidade terapêutica para o tratamento de mastocitomas caninos, promovendo controle local da doença por 2 anos em até 95% dos casos de mastocitomas de I e II (AL-SARRAF et al., 1996; LaDUE et al., 1998; POIRIER et al., 2006).

Pode ser utilizada também como tratamento de escolha para nódulos únicos e pequenos de grau I e II. Contudo, deve-se considerar o risco de desgranulação de mastócitos e de radorresistência celular em tumores muito volumosos (BLACKWOOD et al., 2012). Segundo DOBSON et al. (2004) a radioterapia se mostra eficaz para tratamento de tumores inoperáveis, levando a um intervalo de 1031 dias livres de progressão da doença, quando associada ao uso de prednisolona.

Radioterapia também pode ser aplicada em linfonodos regionais de forma profilática em casos de mastocitomas de alto grau (HAHN; KING; CARRERAS, 2004; THAMM; TUREK; VAIL, 2006).

2.2.6.3 Quimioterapia

Em mastocitoma cutâneo canino a quimioterapia pode ser praticada em três situações distintas. De forma neoadjuvante, antecedendo à cirurgia, com o principal objetivo de reduzir o volume tumoral e, assim, facilitar a exérese cirúrgica com margens livres. Embora seja possível observar evidências clínicas da citorredução, ainda não existe nenhum estudo que comprove o benefício desta modalidade

considerando avaliações histopatológicas, índice de recidiva e tempo livre de doença (BLACKWOOD et al., 2012; LONDON; THAMM; VAIL, 2013).

De forma adjuvante, após a cirurgia, é recomendada para mastocitomas de alto grau (grau III), para mastocitomas moderadamente diferenciados associados a fatores prognósticos negativos, ou ainda quando se confirma a presença de metástase em linfonodo regional. O objetivo da quimioterapia adjuvante é a prevenção de metástases para sítios distantes (BLACKWOOD et al., 2012).

Por último, a quimioterapia pode ser empregada para tratamento de doença residual microscópica, quando nova intervenção cirúrgica não for possível, ou na ausência de outras modalidades como radioterapia e eletroquimioterapia (BLACKWOOD et al., 2012).

Alguns protocolos quimioterápicos são descritos na literatura, porém a escolha do agente antineoplásico deve ser realizada individualmente, considerando taxa de resposta associada ao risco de toxicidade e comorbidades pré-existentes em cada paciente (WITHROW et al., 2013).

A prednisona pode ser utilizada como agente único, porém a resposta nesta situação é baixa, em torno de 20%, e de curta duração (DOBSON et al., 2004; McCaw et al., 1994; STANCLIFF T; GILSON, 2008; THAMM et al., 1999). Os corticosteroides inibem a proliferação de mastócitos e induzem a apoptose das células neoplásicas *in vitro* (TAKAHASHI et al., 2000). Contudo, a resposta terapêutica dos mastocitomas frente a este fármaco é dependente da expressão de receptores de glicocorticoides nas células neoplásicas (MATSUDA et al., 2011).

O fármaco antineoplásico mais empregado no tratamento dos mastocitomas caninos é a vimblastina, um alcaloide da vinca que geralmente é utilizado associado à prednisona (LONDON; THAMM; VAIL, 2013). Cães com mastocitomas pouco diferenciados tratados exclusivamente por cirurgia apresentaram sobrevida de 278 dias (MURPHY et al., 2004), enquanto a associação de cirurgia e quimioterapia com vimblastina e prednisona promoveu uma sobrevida de 2 anos para 70% dos cães com mastocitoma de alto grau (HAYES et al., 2007). Além disso, cães com mastocitoma de alto grau tratados com a associação de cirurgia, radioterapia e quimioterapia com vimblastina e prednisona tiveram uma sobrevida de 1374 dias (THAMM et al., 2006).

A maioria dos estudos que envolvem a vimblastina utilizam a dose de 2 mg/m², Alguns autores sugerem que doses mais altas, até 3,5 mg/m² podem

aumentar a taxa de resposta, tendo como principais toxicidades mielossupressão e alterações gastrointestinais (CAMPS-PALAU et al., 2007; HAYES et al., 2007; RASSNICK et al., 2008; VICKERY et al., 2008).

O segundo agente antineoplásico mais empregado no tratamento dos mastocitomas é a lomustina, um alquilante de administração oral que pode ser utilizado como agente único ou associado ao protocolo de vimblastina e prednisona. Quando associado, a taxa de resposta e sua duração são maiores (COOPER et al., 2009; RASSNICK et al., 2010). A dose da lomustina pode variar entre 60 a 90 mg/m². Mielossupressão e hepatotoxicidade são os principais efeitos adversos relatados com a utilização deste fármaco (RASSNICK et al., 1999; COOPER et al., 2009; RASSNICK et al., 2010; BLACKWOOD et al., 2012).

Outro agente alquilante também utilizado no tratamento dos mastocitomas caninos é o clorambucil. Seu uso, até o momento, é indicado para neoplasias inoperáveis em associação com prednisona, onde mostrou ser eficaz para manter a doença estável em 43% dos casos, sem efeitos adversos atribuídos ao uso do quimioterápico (TAYLOR et al., 2009).

Estudos com outros agentes antineoplásicos como vincristina, vinorelbina e doxorubicina foram realizados, contudo sem comprovação clínica dos benefícios (GRANT et al., 2008; McCRAW et al., 1997; O'KEEFE, 1990).

2.2.6.4 Inibidores de receptores tirosinoquinase

O tratamento de mastocitoma canino com inibidores de receptores com atividade tirosinoquinase foi reportado pela primeira vez em 2008, por Hahn et al., e no ano seguinte por London et al. (2009).

Receptores tirosinoquinase são moléculas de membrana responsáveis pela ativação, proliferação, diferenciação e sobrevivência da célula frente a estímulo enviado por seu ligante. Além disso, estão envolvidos na angiogênese e no desenvolvimento de metástase. Disfunções nestes receptores estão associadas ao desenvolvimento de diversos tipos de neoplasia, dentre elas, o mastocitoma (MARTIN; ARGYLE, 2013).

Masitinib e toceranib são os inibidores de receptores tirosinoquinase mais utilizados no tratamento dos mastocitomas caninos. São pequenas moléculas que atuam bloqueando a atividade dos receptores de tirosinoquinase competindo pelo

sítio de ligação do ATP. Esta inibição causa bloqueio das reações bioquímicas que atuam diretamente na proliferação, angiogênese e apoptose (HAHN et al., 2008; KIUPEL et al., 2004; LONDON et al., 2009; MARTIN; ARGYLE, 2013). Masitinib mostrou-se eficaz no aumento do tempo livre de doença quando comparado ao grupo placebo. Promoveu também aumento global da sobrevida nos animais que desenvolveram mastocitomas com mutação do gene *KIT*. Os efeitos adversos mais frequentes foram emese e diarreia, porém foi considerado como um tratamento bem tolerado (HAHN et al., 2008). Toceranib também demonstrou eficácia no tratamento do mastocitoma canino. Além de bloquear o receptor KIT, demonstrou-se capaz de bloquear o receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGFR) e o receptor do fator de crescimento para endotélio vascular (VEGFR), ambos tirosinoquinase. Melhora na taxa de resposta objetiva pode ser observada em animais submetidos a esta terapia. Efeitos adversos foram relatados (emese, diarreia, neutropenia, perda de peso) e passíveis de controle após tratamento suporte e ajuste de dose (LONDON et al., 2009). Associação deste inibidor de tirosina quinase com prednisona e radioterapia para mastocitomas metastáticos ou inoperáveis parece oferecer melhor resposta, quando comparado à terapia única (CARLSTEN et al., 2012). A combinação entre toceranib e vimblastina provocou resposta objetiva de 71% em cães com mastocitoma, o que sugere um possível sinergismo entre os dois fármacos (ROBAT et al., 2012).

Outro fármaco inibidor de tirosina quinase utilizado em cães é o Imatinib. Em estudo com 21 cães com mastocitomas inoperáveis tratados com este fármaco 48% dos animais mostraram benefícios com o tratamento (ISOTANI et al., 2008). Contudo, ainda não há estudos avaliando a farmacocinética do imatinib na espécie canina (LONDON; THAMM; VAIL, 2013).

2.2.6.5 Crioterapia

Crioterapia pode ser utilizada no tratamento de lesões pequenas, menores que 1cm, contudo pode levar à desgranulação dos mastócitos. A utilização desta modalidade deve ser limitada a mastocitomas em regiões onde ressecção cirúrgica com margens amplas não é possível, como, por exemplo em pálpebras (BLACKWOOD et al., 2012; KRAHWINKE, 1980).

2.2.6.6 Eletroquimioterapia

Eletroquimioterapia é uma modalidade terapêutica que pode ser empregada no tratamento de diversas neoplasias, dentre elas o mastocitoma. Associação de um agente antineoplásico, administrado de forma intravenosa ou intratumoral, à aplicação de pulsos elétricos de alta intensidade, promove a abertura temporária de poros na membrana citoplasmática, tornando-a mais permeável ao fármaco, aumentando seu potencial citotóxico. Os fármacos mais utilizados são bleomicina e cisplatina (MIR, 2006). É indicada principalmente como tratamento adjuvante nas ressecções incompletas e como tratamento único para tumores em que a localização anatômica não permite margens cirúrgicas amplas (KODRE et al., 2009; SPUGNINI et al., 2006).

Em estudo realizado por Spugnini et al. (2011), a eletroquimioterapia foi utilizada como tratamento adjuvante de margens comprometidas (n=37) em animais acompanhados clinicamente por 6 anos. O tempo médio estimado para recidiva local foi de 1200 dias, sendo que em 29 cães não houve recidiva. Estes resultados sugerem que a eletroquimioterapia é uma modalidade eficaz, sendo uma técnica de baixo custo e isenta de efeitos adversos sistêmicos.

2.3 Apoptose

Por muito tempo, a morte celular foi considerada um processo passivo de caráter degenerativo, que ocorre em situações de lesão celular, infecções e ausência de fatores de crescimento. Entretanto, nem todos os eventos de morte celular são processos passivos. Em 1972, Kerr, Wyllie e Currie cunharam o termo apoptose para descrever a morte celular “programada”, quase um século depois da primeira descrição morfológica, feita em 1985 por Flemming (GRIVICICH et al., 2007). Apoptose pode ser induzida por estímulos intra ou extracelulares. Alterações no equilíbrio dos tipos de morte celular estão envolvidos na oncogênese.

Em condições fisiológicas, a apoptose ocorre na maturação e senescência celular, mantendo a homeostasia dos diferentes tecidos, removendo do organismos células que tenham sofrido alguma mutação (YANG et al., 1998).

O início do processo apoptótico ocorre após sinalização bioquímica que desencadeia alterações morfológicas no citoplasma. Após este remodelamento, a

membrana celular forma prolongamentos e ocorre formação de pequenas bolhas que causam a fragmentação celular dando origem aos corpos apoptóticos, que são fragmentos citoplasmáticos compostos por organelas e restos nucleares envoltos por membrana celular. Os corpos apoptóticos são rapidamente fagocitados por macrófagos, sem causar processo inflamatório (HACKER, 2000; KUROSAKA et al., 2003).

A expansão clonal de uma célula transformada depende de um descontrole em sua atividade proliferativa e de sua capacidade de sobrevivência. Embora o câncer apresente características heterogêneas, a resistência à apoptose é evidenciada na maioria dos tumores malignos e está associada a falhas nos tratamentos antineoplásicos (KERR et al. 1994).

O aumento da capacidade de sobrevivência das células neoplásicas pode ser devido a falhas na sinalização da apoptose, ou por mecanismos de resistência à apoptose, que podem ocorrer por desequilíbrio entre proteínas pró e anti-apoptóticas, por redução na função de moléculas efetoras da cascata de apoptose (caspases) ou por uma falha na sinalização dos receptores de morte (WONG, 2011).

Apoptose é constituída por elementos reguladores e efetores e ambos resultam na ativação da cascata de caspases, na chamada Fase de Execução. Os estímulos podem ser externos, através dos receptores de morte celular, pela via extrínseca, ou por sinais intracelulares, pela via intrínseca (HANAHAN; WEINBERG, 2011) (Figura 1). Ambas as vias convergem na ativação da caspase 3 que é a principal molécula efetora no processo apoptótico.

2.3.1 Via extrínseca

A via extrínseca é iniciada após a interação entre receptores específicos de morte com seus ligantes, seguido da ativação de uma proteína sinalizadora, FADD. A maioria destes receptores pertencem a família TNF (Fator de Necrose Tumoral), sendo o TNFR1, seu representante mais expressivo (GRIVICICH et al., 2007; OUYANG et al., 2012).

Figura 1- Vias de ativação da apoptose

Fonte: YUAN et al., 2012

Demonstração esquemática das duas vias de ativação da apoptose. Via extrínseca: iniciada por receptores de morte. Via intrínseca: iniciada pela liberação do citocromo C, formando o complexo apoptossomo (Apaf-1/caspase 9). Ambas convergem para ativação de caspase 3.

As moléculas TNF e Fas ligante ligam-se aos respectivos receptores de membrana para desencadear a cascata apoptótica. Após esta ligação, ocorre a ativação de um domínio da porção intracelular que é recrutado por receptores de morte contendo proteínas adaptadas, como a proteína FADD (Fas Adaptor Death Domain) e TRADD (Tumor Necrosis Factor Receptor- Associated Death Domain protein). O FADD liga-se à pró-caspase 8 que sofre auto-clivagem para formar a caspase 8 ativa que levará à apoptose pela clivagem das caspases executoras (DUNKLE, 2011).

Figura 2- Via extrínseca da apoptose

Fonte: Rao et al, 2006

Esquema representando a sequência de ativação das proteínas ligantes e seus receptores envolvidos na via extrínseca da apoptose, culminando na ativação das caspases executoras.

2.3.2 Via intrínseca

A via intrínseca da apoptose, também referida como via mitocondrial, pode ser desencadeada por estímulos externos como alterações no DNA e radiações. Sua ativação resulta na liberação do citocromo C da mitocôndria para o citoplasma, levando à ativação da cascata de caspases (WONG, 2011). Apoptossomos, estruturas proteicas formadas a partir do APAF1 (Apoptotic Protease Activating Factor-1), pró-caspase 9 e citocromo C exercem um papel fundamental nesta via, sendo ativados em resposta a agentes apoptóticos (Figura 3).

Figura 3- Ativação da via intrínseca da apoptose

Fonte: GRIVICICH, 2007

Legenda: Participação pró-apoptótica da mitocôndria como mediadora na ativação da via intrínseca.

Após ser iniciada pelos apoptossomos, a via intrínseca é regulada por proteínas da família BCL2, que possuem quatro domínios: BH1, BH2, BH3 e BH4. Os componentes da família BCL2 podem ser classificados em três grupos (Tabela 5) (WONG, 2011).

Tabela 5- Classificação das proteínas do grupo Bcl-2 de acordo com seu domínio e estímulo.

	Domínios	Estímulo	Proteínas
Grupo 1	BH1	Anti-apoptótico	BCL2
	BH2		BCL2L1 (Bcl-xL)
	BH3		BCL2L3
	BH4		BCL2L2
Grupo 2	BH3	Pró-apoptótico	BID
			BCL2L11
			BBC3
			PMAIP1
			BAD
			BMF
			HRK
Grupo 3	BH1, BH2, BH3, BH4	Pró-apoptóticos	BIK
			BAX
			BAK
			BOK

A homeostase é alcançada por meio do equilíbrio entre proteínas anti e pró-apoptóticas, sendo BAX, a principal proteína pró-apoptótica e BCL2 a principal proteína anti-apoptótica. Frente a um estímulo de morte, BCL2 deixa de inibir a permeabilidade da membrana mitocondrial por diminuição da atividade de BAX por sequestro ou competição pelo mesmo sítio na mitocôndria, permitindo a formação dos poros (ELMORE, 2007).

Após estímulos das vias iniciadoras da apoptose, ocorre a ativação da via executora da apoptose. Esta via é representada pela família das caspases, que localizam-se no citoplasma, na forma de pró-enzimas, e assumem a forma ativa iniciando o processo de apoptose (OUYANG et al., 2012).

Caspases realizam a clivagem de resíduos de aspartato e externalizam fosfolipídeos para membrana que enviam sinais para que a célula seja fagocitada. Dentre as quatorze caspases descritas, apenas seis são conhecidas por seu papel

na apoptose (caspases 2, 3, 6, 7, 8, 9 e 10). As demais participam do processo de maturação de citocinas. (OYANG et al., 2012).

As caspases iniciadoras, caspases 8 e 9, e as caspases efetoras, como a caspase 3, sofrem ativação na forma de cascata, sendo a caspase 9 a iniciadora do processo (ROSSI et al., 2013). Localizada no citoplasma, esta torna-se ativa após ligação com APAF1. Quando associadas constituem um domínio recrutador que irá interagir com outras caspases (HOFMANN et al., 1997).

A caspase 3 é considerada como uma das mais importantes dentre as efetoras, pois sua ativação se dá por diferentes estímulos, tanto por via extrínseca, através da caspase 8, como intrínseca, através da caspase 9 (WANG et al., 1996). Após ativada, leva à fragmentação do DNA, que caracteriza a apoptose (ROSSI et al., 2013).

2.3.3 Via Perforina/Granzima

Considerada uma via extrínseca “acessória”, a via perforina/granzima é desencadeada por ação de linfócitos T citotóxicos, que possuem efeitos citotóxicos sobre células tumorais e células infectadas por vírus. Este mecanismo envolve a formação de poros na membrana para passagem de grânulos para célula-alvo. Em seguida, a granzima B presente nestes grânulos cliva proteínas com resíduos de aspartato que irão ativar a pró-caspase 10. Russel e Ley (2002) demonstraram que a granzima B é capaz de utilizar a via intrínseca para amplificar a sinalização para apoptose e ainda ativar diretamente a caspase 3. A granzima A também atua via linfócitos T citotóxico e via ativação de caspases, além disso inibe a atividade do complexo proteico SET, responsável pela manutenção e reparo do DNA, contribuindo para apoptose bloqueando a manutenção do DNA e a integridade da estrutura de cromatina.

2.3.4 Relação entre apoptose e câncer

A apoptose é um mecanismo inato de defesa antineoplásica e é induzida por vários agentes citotóxicos. Regulação genética da apoptose pode ser interrompida frente à ocorrência de mutações, levando à perda do controle na proliferação celular,

resultando no desenvolvimento de uma neoplasia (GRIVICICH et al., 2007; THOMPSON, 1995).

TP53 é um dos mais importantes genes envolvidos no desenvolvimento de diversas neoplasias. Sua função principal é manter a integridade do genoma e controlar o crescimento celular. A ativação de *TP53* ocorre em resposta à injúria ao DNA, levando à interrupção do ciclo celular e induzindo a senescência ou a apoptose (STOCKMANN et al., 2011). Superexpressão nuclear de *TP53* foi demonstrada em cães com mastocitoma (Ginn et al., 2000), o que pode ter relação com a tumorigênese desta neoplasia. Estudo realizado por WU et al. (2006) não demonstrou que a expressão de *p53* tivesse influência na tumorigênese ou no grau histológico dos mastocitomas em cães.

São poucos os estudos na medicina veterinária que demonstram uma associação entre mecanismos apoptóticos e prognóstico da doença, que pode ter relação inclusive com possíveis falhas nos tratamentos antineoplásicos. De Las Mulas et al. (1999) estudou a relação entre apoptose e mitose em diferentes tumores cutâneos e subcutâneos em cães. Neste estudo, neoplasias cutâneas e subcutâneas de diferentes tipos histológicos foram incluídas e separadas em 3 grupos: (1) tumores benignos, (2) tumores malignos com alto potencial metastático e (3) tumores localmente invasivos, independente do potencial para metástase. A avaliação da apoptose foi realizada por ensaio TUNEL e a proliferação pelo índice mitótico. Nos 3 grupos a morte celular esteve presente e foi inversamente proporcional ao MI em tumores benignos (grupo 1). Os tumores malignos, exceto fibrossarcoma, apresentaram baixo índice mitótico e alto MI, contudo não houve diferença relevante entre os dois índices.

A relação entre apoptose e proliferação foi avaliada em tumores perianais utilizando PCNA e contagem de corpúsculos apoptóticos. Os índices proliferativos e apoptóticos foram consideravelmente maiores em carcinomas (MARTINS et al., 2008).

Em linfoma canino, avaliou-se a relação entre proliferação (MI, Ki67 e PCNA), e apoptose por meio de ensaio TUNEL, considerando 2 fases distintas da doença: pré-tratamento e após remissão. Foi observado que, quanto maior o MI, menores os tempos livre de doença e de sobrevida. Alta marcação de Ki67 e PCNA estão associadas a tumores de alto grau. O índice apoptótico foi preditivo para tempo de sobrevida em tumores de intermediário a alto grau (PHILIPS et al., 2000).

Em humanos, a desordem de mastócitos mais frequente é mastocitose e sua patogênese não é bem definida. A possibilidade de haver um excesso de mastócitos associado a diversos tipos de mastocitose levou ao estudo da apoptose e proliferação de mastócitos nesta doença. O estudo da apoptose foi realizado por ensaio TUNEL e da proliferação com ki67 e foi demonstrado que o acúmulo de mastócitos na mastocitose cutânea tem relação direta com alterações na proliferação e na apoptose de mastócitos. Menor número de células positivas marcadas no ensaio TUNEL sugere que a inibição da apoptose pode estar associada com a patogenia da doença (HARTMANN et al., 2003).

Estudos específicos e direcionados podem elucidar de forma mais objetiva a relação entre câncer e apoptose nos mastocitomas cutâneos caninos.

3. Materiais e Métodos

3.1 Origem do material e dados clínicos

Foram colhidos 36 amostras de mastocitomas cutâneos caninos previamente diagnosticados por análise citológica durante o período de janeiro de 2013 até setembro de 2014. As amostras coletadas tiveram procedência dos setores de cirurgia dos Hospitais Veterinários da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA-USP), da Universidade Anhembi-Morumbi, do Serviço de Oncologia do PROVET- Instituto Paulista de Especialidades Veterinárias, e do Hospital Público Veterinário da Associação Nacional de Clínicos Veterinários de Pequenos Animais de São Paulo (ANCLIVEPA-SP), de arquivos de histopatologia do Departamento de Patologia Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP (VPT-FMVZ-USP), do setor de Patologia do Hospital Veterinário da Universidade Metodista de São Paulo (UMESP).

O histórico clínico foi investigado por meio das análises dos prontuários, entrevistas telefônicas com os médicos veterinários responsáveis e/ou proprietários dos animais, e acompanhamento em consultas de retorno. As informações colhidas foram: idade ao diagnóstico da neoplasia, sexo, idade, raça, localização da lesão, quantidade de nódulos neoplásicos, recorrência local, tempo de sobrevivência do animal pós-cirurgia e em casos de óbito a causa da morte.

3.2 Critérios de inclusão

Os critérios de inclusão no presente estudo foram: (1) tratamento por biópsia excisional, com objetivo de cura; (2) ausência de outra forma de tratamento adjuvante ou neo-adjuvante (quimioterapia, radioterapia); (3) amostra de tecido em volume e qualidade suficientes para confirmação do diagnóstico, graduação do mastocitoma e realização de provas imuno-histoquímicas; (4) acompanhamento clínico de, no mínimo, 180 dias pós-cirurgia.

3.3 Processamento histopatológico

As amostras foram fixadas em solução de formaldeído a 10% por, no máximo, 48 horas. Após fixação, foram transferidas para solução de álcool a 70% e submetidas a processamento histológico de acordo com as técnicas rotineiras de inclusão em parafina no Laboratório de Patologia da Faculdade de Engenharia de Alimentos e Zootecnia (FZEA- USP). Secções histológicas de aproximadamente 4 µm de espessura foram corados pela técnica de hematoxilina & eosina (HE) (PROPHET et al., 1992).

3.4 Graduação histopatológica

Avaliação histopatológica foi realizada por dois observadores e as amostras graduadas segundo as propostas de classificação de Patnaik, Ehler e MacEwen (1984), em graus I, II ou III, e Kiupel et al. (2011), em baixo ou alto grau. Em casos de discordância entre observadores, o grau histopatológico foi definido por consenso. Em casos com múltiplas lesões, foi considerada a lesão de maior grau para análises estatísticas.

3.5 Processamento imuno-histoquímico

O processamento imuno-histoquímico foi realizado no Laboratório de Patologia do Departamento de Medicina Veterinária da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA/USP) com base no método descrito por Hsu et al. (1981), com adaptações.

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

Posteriormente, os cortes histológicos passaram por processo de recuperação antigênica. Para o anticorpo anti-Caspase 3 (policlonal de coelho anti-caspase 3 humana, Abcam®, cód. ab4051) a recuperação foi realizada em tampão Citrato, pH 6.0, em “steamer” por 20 minutos. Para o anticorpo anti-Ki67 (monoclonal de camundongo, MIB-1, Dako®), o procedimento foi realizado em panela de pressão por 2 minutos. Em seguida, as amostras foram resfriadas por 20 minutos em temperatura ambiente. passaram por 3 banhos de 5 minutos em solução tampão PBS (pH 7.4) para o anti-corpo anti-Ki67 e TBS pH 7,6 para anti-Caspase 3.

As lâminas destinadas ao anticorpo anti-Caspase 3 passaram por bloqueio de peroxidase endógena com solução de peróxido de hidrogênio a 12% diluído em água destilada, por 30 minutos, e solução Protein Block Serum Free, DAKO® por 15 minutos para bloqueio de proteínas inespecíficas. As lâminas destinadas ao anticorpo anti-Ki67 não passaram pelas etapas de bloqueio.

Todos os cortes foram circulados com caneta hidrofóbica e incubados com anticorpos primários nas diluições 1:1500 (anti-caspase 3) e 1:50 (anti-Ki67), em câmara úmida, por 18 horas a 4°C.

Os cortes passaram por 4 banhos de 5 minutos com tampão de lavagem e incubados com anticorpo secundário ADVANCE HRP® (Dako A/S, USA) conforme indicação do fabricante, seguidos de coloração realizada por 3',3'-tetraidrocloroto de diaminobenzidina (DAB) por 1 minuto e banho em água destilada. A contracoloração foi feita por Hematoxilina de Harris, com imersão das lâminas por 1 minuto, seguido de lavagem em água destilada. Por fim, os cortes passaram por desidratação em álcool graduado, e diafanização em xilol para montagem com lamínula.

Os controles negativos foram realizados com IgG do mesmo tipo e espécie do anticorpo primário e processados simultaneamente sob as mesmas condições e diluições dos anticorpos primários.

3.6 Avaliações imuno-histoquímicas

Para avaliação da proteína caspase 3 foram selecionados 5 campos de intensa marcação (*“hot spots”*) à objetiva de 10x, seguido de classificação como proposto por Silva et al. (2007), à objetiva de 40x em: 0, negativa; 1+: para campos com até 1% de células marcadas; e 2+: para campos com mais de 1% de células marcadas. Os resultados obtidos nesta avaliação foram obtidos previamente, conforme BARRA (2015).

A avaliação dos índices de proliferação celular pelo Ki67 foi realizada por meio da seleção de 5 *hot spots* à objetiva de 10x, e contagem de núcleos positivos e negativos à objetiva de 40x para cálculo da porcentagem de células positivas nas imagens capturadas (MAGLENNON et al., 2008; SCASE et al, 2006; VASCELLARI et al., 2013). Ambas análises foram realizadas com microscópio binocular (LEICA® DM500), acoplado a câmera digital (ICC50-HD, Leica®) e sistema de análise de imagens.

3.7 Ensaio TUNEL

Para confirmação das células em apoptose, as amostras foram analisadas por ensaio TUNEL, que consiste em reações enzimáticas, envolvendo a enzima deoxinucleotidil-transferase terminal (TdT), que penetra nas células previamente permeabilizadas por ação proteolítica para reagir com o fluorocromo que marca fragmentos de DNA gerados na apoptose (GRAVIELI et al., 1992).

Para tanto, foi utilizado o kit In Situ Cell Death Detection Kit Fluorescein (Roche®). Cortes histológicos de mastocitomas com aproximadamente 4 μ m de espessura foram aderidos a lâminas silanizadas e desparafinados em estufa a 65°C, seguidos por 4 banhos de xilol 100% por 5 minutos cada, em seguida re-hidratados em álcool absoluto, 95% e 70%, seguido por banho de água corrente destilada. Após secagem, os cortes foram circulados com caneta hidrofóbica. Os cortes foram pré-tratados com proteinase K (20mg/mL, 10 mM, Tris- HCL, pH 7.4), por 22 minutos a 37°C. Em seguida, passaram por 2 banhos de 10 segundos em PBS (pH 7.4) e incubadas em câmara escura com solução enzimática (TdT) associada ao fluorocromo (fluorescein-dUTP) a 37°C por 60 minutos. Para finalizar a reação as amostras foram lavadas com PBS (pH 7.4).

3.8 Análise TUNEL

Avaliação do ensaio foi realizada utilizando microscópio acoplado a sistema de epifluorescência (Zeiss Axioplan 2®, Zeiss®, Alemanha). Cinco “*hot spots*” foram selecionados à objetiva de 10x, e todas as células positivas em cada campo foram contadas à objetiva de 40x.

Figura 4- Marcação positiva por ensaio TUNEL em mastocitoma cutâneo canino

CADROBBI, 2015

Legenda: Células apoptóticas em mastocitomas caninos marcadas por ensaio TUNEL. (A) Baixo número de células positivas. (B) Alta marcação de células positivas.

3.9 Análises Estatísticas

Para análise estatística utilizou-se os softwares GraphPad Prism® (Versão 4.02 para Windows, Graphpad Software, Inc. - San Diego, CA, USA) e Bioestat® (Versão 5.0, Universidade Federal do Pará, Brasil). A contagem de células positivas no ensaio TUNEL foi comparada à classificação histopatológica proposta por Patnaik et al. (1984) por meio de ANOVA/Kruskal-Wallis, seguida de teste de múltiplas comparações de Dunn, e à classificação proposta por Kiupel et al. (2011) por pelo

teste Mann-Whitney. A contagem de células positivas no ensaio TUNEL também foi comparada entre animais censurados pela análise de sobrevida e a aqueles que morreram em função da doença pelo teste Mann-Whitney. As correlações entre a imunexpressão de caspase 3 e a contagem de células positivas pelo ensaio TUNEL, assim como a correlação entre o marcador de proliferação Ki67 e TUNEL foram realizadas pelo teste de Sperman. A associação da marcação por ensaio TUNEL com a mortalidade dos animais em função do tumor foram analisadas pelo Teste de Chi-quadrado. A análise de sobrevida foi realizada através do método de Kaplan-Meier após determinação de valor de corte de 44,8 marcação positiva por ensaio TUNEL, utilizando-se a curva de ROC (Receiver Operating Characteristic). O nível de significância foi estabelecido em 5%. Casos censurados na análise de sobrevida incluíram os animais vivos ao final do acompanhamento ou óbitos não-relacionados ao mastocitoma.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Estudo clínico

Foram incluídos neste estudo 36 animais diagnosticados com mastocitoma cutâneo, sendo 21 machos (58%) e 15 fêmeas (42%). Cães sem raça definida representaram 30% (11/36) do animais, seguidos por 17% (6/36) de cães da raça Boxer e 14% (5/36) de Labradores Retrievers. Outras raças registradas foram Poodle (11%, 4/36), Pitbull (8%, 3/36), Dachshund (5%, 2/36), Dogue Alemão (3%, 1/36), Cocker Spaniel (3%, 1/36), Doberman (3%, 1/36), Fila Brasileiro (3%, 1/36) e Pinscher (3%, 1/36) (Figura 5). Quatro animais apresentaram lesões múltiplas, totalizando 44 amostras incluídas no estudo.

Figura 5- Distribuição das raças dos animais incluídos no estudo

Embora predisposição sexual não seja relatada em grande parte dos estudos (BOSTOCK, 1986; MACY, 1986; LONDON; SEGUIN, 2003), observou-se maior frequência de machos acometidos. Nossos dados não correspondem à casuística de atendimento total, mas sim a um grupo de indivíduos selecionados por vários critérios de inclusão no presente estudo, o que inviabiliza este tipo de comparação. Assim como na maioria dos estudos, a média de idade foi de 9 anos, variando entre

3 e 15 anos de idade (PATNAIK; EHLER; MACEWEN, 1984; MILLER, 1995; THOMSON, 2011; THAMM; VAIL, 2001; MISDORP, 2004; O'CONNELL; THOMSON, 2013; WELLE et al., 2008; KUPFER, 2010).

A incidência de mastocitomas pode ser significativamente maior em cães de raça pura (LEIDIGER et al., 2014). Estudos sobre a frequência de mastocitomas em determinadas raças sofrem influência do local onde foram realizados. Grande número de animais sem raça definida em alguns países como Brasil, assim como a alta popularidade de algumas raças, podem superestimar a frequência desta neoplasia. Neste estudo cães sem raça definida foram os mais prevalentes, seguidos por Boxer e Labrador Retriever, consideradas por vários autores como raças predispostas (McNIEL et al., 2006; BLACKWOOD et al., 2012; SHOOP et al., 2015).

Quanto à distribuição anatômica das lesões (Tabela 6), 75% (33/44) ocorreram em membros e tórax, corroborando descrições em literatura (PATNAIK; EHLER; MACEWEN, 1984; MACY, 1985; O'KEEFE, 1990; SIMÕES; SCHONING; BUTINE, 1994; IWATA et al., 2000; DOBSON; SCASE, 2007; WELLE et al., 2008). Liedinger et al. (2014) observaram maior ocorrência em cabeça e pescoço quando comparado à região inguinal, fato não observado em nosso estudo.

Tabela 6- Distribuição em relação a localização anatômica

Localização Anatômica	Frequência
Membros/ extremidade	39 % (n=17)
Região torácica	37% (n=16)
Região Inguinal	9% (n= 4)
Cabeça/pescoço	4% (n=2)
Não informado	11% (n=5)

Animais com nódulos únicos representaram a grande maioria (89%, 32/36), enquanto animais com mastocitomas multicêntricos representaram 11% (4/36) dos casos, semelhante ao observado em outros estudos que referem uma frequência 3 até 25% dos casos de animais com múltiplas lesões (MULLINS et al., 2006; MURPHY et al., 2006; THAMM; VAIL, 2007).

4.2 Estudo laboratorial

As amostras incluídas neste estudo foram classificadas segundo as propostas de Patnaik et al. (1984) e Kiupel et al. (2011). Nove cães foram diagnosticados com mastocitoma grau I (25%), 21 (59%) cães como grau II e 6 (16%) cães como grau III. Segundo a proposta de Kiupel et al. (2011), 26 mastocitomas foram classificados em baixo grau (72%) e 10 como alto grau (28%). Corroborando estudos anteriores (DOBSON et al. 2004; TAKEUCHI et al. 2013), houve maior incidência de mastocitomas de grau II e baixo grau. Durante o período de acompanhamento, foram registrados um total de 11 óbitos em função da neoplasia, correspondendo a uma taxa de mortalidade de 30,55%. A taxa de mortalidade pode ser considerada alta, porém os animais deste estudo representam um grupo selecionado de pacientes que não receberam qualquer forma tratamento adjuvante à remoção cirúrgica.

Não houve diferenças entre os graus histopatológicos na comparação pelas marcações de TUNEL quando utilizada a proposta de Patnaik et al. (1984) (Tabela 6, Figura 2), embora os tumores classificados como grau III tenham apresentado maior número de células positivas neste ensaio.

Tabela 7 - Distribuição dos casos analisados em função da graduação histopatológica segundo Patnaik et al. (1984) e marcação positiva em TUNEL (média do número de células positivas em 5 campos *hot spots*).

	Grau I	Grau II	Grau III
Número de animais	9	21	6
mínimo	16,8	5,2	28,2
média ± DP	43,98 ± 19,75	53,38 ± 40,65	112,1 ± 77,14
máximo	78,8	182,2	195,8

p= 0,2064, ANOVA/Kruskal Wallis, com p>0,05 entre os graus, pós-testes de Dunn.

Figura 6 – Distribuição das contagens de células positivas por campo em ensaio TUNEL em função da graduação histopatológica segundo Patnaik et al. (1984).

O mesmo observou-se quando comparadas as marcações positivas de TUNEL e a graduação Kiupel et al. (2011). Os tumores classificados como alto grau apresentaram maior número de células positivas em ensaio TUNEL, porém não-significante (Tabela 8, Figura 7).

Tabela 8- Distribuição dos casos analisados em função da graduação histopatológica segundo Kiupel et al. (2011) e marcação positiva em TUNEL (média do número de células positivas em 5 campos *hot spots*).

	Baixo Grau	Alto grau
Número de animais	26	10
mínimo	5,2	28,2
média ± DP	47,06± 27,13	96,61±74,01
máximo	114,4	195,8

p= 0,1161 Mann-Whitney.

Figura 7 - Distribuição das contagens de células positivas por campo em ensaio TUNEL em função da graduação histopatológica segundo Kiupel et al. (2011).

Quando comparados os animais que morreram em função da doença e os animais censurados, não houve diferença no número de células positivas no ensaio TUNEL ($p=0,6429$; Figura 8).

Figura 8 - Distribuição das contagens de células positivas em ensaio TUNEL para animais com óbito em função da neoplasia e animais censurados.

A tumorigênese envolve alterações genéticas complexas como resultado de mutações de proto-oncogenes, de genes supressores tumorais e/ou por alterações nas vias de sinalização da apoptose (OUYANG et al., 2012). O desenvolvimento tumoral depende de um desequilíbrio entre a proliferação e morte celular. Diminuição da apoptose contribui para progressão neoplásica e para o aparecimento de metástases ao possibilitar a sobrevivência celular no microambiente tumoral e nas circulações sanguínea e linfática. Falhas no estímulo à apoptose contribuem também para o desenvolvimento de mecanismos de resistência a diversas formas de tratamento (GUROVA; GUDKOV, 2003).

A ausência no controle da proliferação celular é um importante marcador prognóstico em diversos tipos de neoplasia em humanos e animais, incluindo os mastocitomas. A diminuição na apoptose associada ao aumento da proliferação celular contribuem para o crescimento e evolução tumoral (HARTMANN et al., 2003). A expressão de marcadores de proliferação é uma forma menos subjetiva que pode ser utilizada para prever o comportamento biológico tumoral. A importância da avaliação do marcador de proliferação Ki67 e sua relação com grau histológico e prognóstico já foi demonstrada por diversos estudos (ABADIE et al., 1999; SCASE et al., 2006, STREFEZZI et al., 2010; WEBSTER et al., 2007).

Alterações na expressão de determinados genes podem diminuir a apoptose como, por exemplo, a redução da função das caspases, ou falha na sinalização dos receptores de morte (WONG et al., 2011). Ao mesmo tempo, o aumento na apoptose pode exercer pressão seletiva sobre a população de células tumorais, provocando a sobrevivência das mais adaptadas, levando a neoplasias cada vez mais agressivas (GUROVA e GUDKOV, 2003).

A morte celular por necrose é frequente em neoplasias malignas e pode ocorrer de forma independente ou simultânea à apoptose (ELMORE et al., 2007). No ensaio TUNEL, os fragmentos de DNA de células necróticas também podem ser marcados. Por outro lado, o anticorpo anti-caspase 3 (policlonal de coelho anti-caspase 3 humana, Abcam®, cód. ab4051) utilizado reconhece o segmento de aminoácidos 167 a 175 que compõem o sítio de clivagem desta proteína. Desse modo, a imunomarcagem da caspase 3 indica, provavelmente, a presença da proteína ativa e, portanto, a fase de execução da apoptose em curso nas células positivas. A correlação positiva entre os diferentes métodos para avaliação da

apoptose realizados neste estudo ($p=0,0343$; $r=0,3236$; Figura 9) não é capaz de eliminar a possibilidade de células necróticas terem sido consideradas no ensaio TUNEL, mas dá consistência aos resultados obtidos.

Figura 9- Correlação entre imunomarcção de caspase 3 e células positivas em ensaio TUNEL.

Por outro lado, não houve correlação entre o número de células em proliferação celular (Ki67) e apoptose ($p=0,1096$; $r=0,2568$). A evolução tumoral depende do índice de proliferação celular e do índice apoptótico. Tumores com baixo índice proliferativo e baixo índice apoptótico podem ser tão agressivos quanto tumores que se proliferam rapidamente e apresentam altos índices de apoptose. Portanto a relação entre proliferação e apoptose pode não representar um critério preditivo no prognóstico tumoral. Contudo, a carcinogênese envolve múltiplas mutações genéticas. A inibição da apoptose em células mutadas é um passo fundamental para que esta célula consiga sobreviver e continuar sua replicação, perpetuando as características adquiridas e dando origem a muitas outras novas capacidades (SCASE et al., 2006).

Além de papel essencial da carcinogênese, alguns estudos correlacionam a apoptose à evolução desfavorável, assim como a proliferação celular (DE LAS MULAS et al., 1996), contudo seu papel como fator prognóstico não está totalmente

elucidado. Algumas moléculas, como a survivina, atuam como inibidoras da ação de caspases efetoras e podem estar envolvidas neste processo, como já demonstrado em humanos (AMBROSINI et al., 1997). Nesta espécie, a expressão de survivina em células neoplásicas está associada com prognóstico e com resposta à terapia.

De modo oposto, Gurova e Gudkov (2003) sugerem que a apoptose pode estimular uma rápida renovação celular e com isso pode selecionar células com mutações genéticas, incluindo mutações em TP53, promovendo a progressão tumoral. Esta proposta cria uma nova perspectiva sobre o papel da apoptose no desenvolvimento e prevenção do câncer.

Scase et al. (2006) avaliou a correlação entre marcadores de apoptose e proliferação mastocitomas caninos. Para avaliação da proliferação foram utilizados Ki67, PCNA e AgNOR, e para avaliação da apoptose considerou-se a expressão de survivina. Não foi observada associação entre sobrevida e expressão de survivina, contudo o índice apoptótico mostrou-se maior nos mastocitomas de grau I e II. Neste estudo, a expressão de survivina não mostrou relação com prognóstico quando avaliada isoladamente e sua expressão em mastócitos neoplásicos foi considerada baixa.

A interação entre proliferação e apoptose foi estudada em histiocitoma cutâneo canino, tumor benigno que geralmente apresenta remissão espontânea, na tentativa de demonstrar se a regressão tumoral estava relacionada à diminuição da proliferação ou ao aumento da apoptose. A proliferação foi avaliada por Ki67 e a apoptose por TUNEL. As amostras foram divididas em quatro grupos de acordo com a infiltração de linfócitos, sendo o grupo I a infiltração mínima e o grupo IV com infiltração difusa e menor número de histiócitos. Não houve correlação entre os índices proliferativos e apoptóticos entre os grupos, contudo o índice apoptótico foi maior que o proliferativo na maioria dos casos, exceto no grupo I sugerindo que a regressão deste tipo específico de tumor não ocorre simplesmente por diminuição da proliferação, ao contrário de alguns tumores em humanos (RAZON et al., 1998).

Estudos recentes buscam novas opções terapêuticas onde a indução da apoptose represente o principal alvo (YUAN et al., 2012). A relação entre os índices proliferativos e apoptóticos de determinada neoplasia pode estar relacionado ao seu comportamento biológico, porém novos estudos incluindo expressão de moléculas antiapoptóticas, assim como formas de resistência à apoptose devem ser realizados para cada tipo de neoplasia para que sua relação e com a proliferação neoplásica

possa ser melhor estabelecida.

5. Conclusões

- A marcação positiva em ensaio TUNEL não é um indicador prognóstico para MCTs cutâneos caninos, por não estar associada com grau histopatológico segundo as classificações propostas por Patnaik et al. (1984) e Kiupel et al. (2011), nem com o período de sobrevida pós-cirúrgica ou a mortalidade em função da doença.
- O número de células positivas em ensaio TUNEL apresenta correlação positiva com a imunomarcação de caspase 3 em MCTs cutâneos caninos.
- O número de células positivas em ensaio TUNEL não apresenta correlação com a proliferação celular quantificada pela imunomarcação de Ki67.

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**, Chicago, v. 215, p. 1629-1634, 1999.
- AMAGAI, Y.; TANAKA, A.; MATSUDA, A.; MATSUDA, H. Heterogeneity of internal tandem duplications in the c-kit of dogs with multiple mast cell tumours. **Journal of Small Animal Practice**, Oxford, v. 54, p. 377-380, 2013.
- AMBROSINI, G.; ADIDA, C.; ALTIERI, D.C. A novel anti-apoptosis gene, surviving, expressed in cancer and lymphoma. **Nature Medicine**, v. 3, p. 917- 921.
- BARRA, C.N.; Imunomarcção de proteínas relacionadas à apoptose em mastocitomas cutâneos caninos e seu valor como indicador prognóstico. **Dissertação (Mestrado em Ciências)- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo**, São Paulo, 108f. 2015.
- BAKER-GABB, M.; HUNT, G. B.; FRANCE, M. P. Soft tissue sarcomas and mast cell tumours in dogs; clinical behavior and responses to surgery. **Australian Veterinary Journal**, New South Wales, v. 81, n. 12, p. 732-738, 2003.
- BLACKWOOD, L.; MURPHY, S.; BURACCO, P.; DE VOS, J. P.; DE FORNELTHIBAUD, P.; HIRSCHBERGER, J.; KESSLER, M.; PASTOR, J.; PONDE, F.; SAVARY-BATAILE, K.; ARGYLE, D. J. European consensus document on mast cell tumours in dogs and cats. **Veterinary and Comparative Oncology**, Oxford, v. 10, n. 3, 2012.
- BOSTOCK, D. E. The prognosis following surgycal removal of mastocytomas in dogs. **Journal of the Small Animal Practice**, Oxford, v. 14, p. 27-41, 1973.
- BOSTOCK, D. E. Neoplasms of the skin and subcutaneous tissues in dogs and cats. **British Veterinary Journal**, London, v. 142, n.1, p. 1-19, 1986.
- BOSTOCK, D. E.; CROCKER, J.; HARRIS, K.; SMITH, P. Nucleolar organizer regions as indicators of post-surgical prognosis in canine spontaneous mast cell tumors. **British Journal of Cancer**, Newmarket, v. 59, p. 915-918, 1989.
- BRODEY, R. S. Canine and feline neoplasia. **Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine**, San Diego, v.14, p.309-54, 1970.
- CAHALANE, A. K.; PAYNE, S.; BARBER, L. G.; DUDA, L. E.; HENRY, C. J.; MAULDIN, G. E.; GELNNA, E.; FRIMBERGER, A. E.; COTTER, M. S.; MOORE, S. A. Prognostic factors for survival of dogs with inguinal and perineal mast cell tumors. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Chicago, v. 225, n. 3, p. 401- 408, 2004a.
- CAMPS-PALAU, M. A.; LEIBMAN, N. F.; ELMSLIE, R.; LANA, S. E.; PLAZA, S.;

MCNIGHT, J. A.; RISBON, R.; BERGMAN, P. J. Treatment of canine mast cell tumours with vinblastine, cyclophosphamide and prednisone: 35 cases (1997-2004). **Veterinary and Comparative Oncology**, Oxford, v. 5, n. 3, p. 156–167, 2007.

CANNAS, S. J. P.; SCHONING, P. Canine mast cell tumors: a comparison of staining techniques. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, v. 6, p. 458- 465, 1994.

CARLSTEN, K. S.; LONDON, C. A.; HANEY, S.; BURNETT, R.; AVERY, A. C.; THAMM, D. H. Multicenter prospective trial of hypofractionated radiation treatment, toceranib, and prednisone for measurable canine mast cell tumors. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Philadelphia, v. 26, n. 1, p. 135–141, 2012.

COLE, W. Mast cell tumor in a puppy. **Canadian Veterinary Journal**, Guelph, v. 31, p. 457, 1990.

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

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**, São Paulo, v. 13, n. 3, p. 206- 213, 2008.

DOBSON, J. M.; SCASE, T. J. Advances in the diagnosis and management of cutaneous mast cell tumours in dogs. **The Journal of Small Animal Practice**, Oxford, v. 48, n. 8, p. 424–431, ago. 2007.

DUNKLE, A.; HE, Y.W. Apoptosis and Autophagy in the Regulation of T Lymphocyte. **Journal of Immunology Research**, Cairo, v. 49, p. 70-86, 2011.

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

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

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

FOX, L. E. Mast cell tumors. In: MORRISON, W.B. **Cancer in dogs and cats medical and surgical management**, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1998. Cap. 30, 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**, Philadelphia, v. 4, p.

242-246, 1990.

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

GALLI, S. J.; ZSEBO, K. M.; GEISLER, E.N. The kit ligand, stem cell factor. **Advance Immunology**, v. 55, p. 1, 1994.

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

GILSON, S. D. Clinical management of the regional lymph node. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, Philadelphia, v. 25, p. 149-167, 1995.

GINN, P. E.; FOX, L. E.; BROWER, J. C.; GASKIN, A.; KURSMAN, 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**, New York, v. 37, n. 1, p. 33-39, 2000.

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

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

GUROVA, K. V.; GUDKOV, A. V. Paradoxical role of apoptosis in tumors progression. **Journal of Cellular Biochemistry**, Bucharest, v.88, p. 128-137, 2003.

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

HAHN, K. A.; KING, G. K.; CARRERAS, J. K. Efficacy of radiation therapy for incompletely resected grade-III mast cell tumors in dogs: 31 cases (1987-1998). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Chicago, v. 224, n. 1, p. 79-82, 2004.

HAHN, K. A.; OGILVIE, G.; RUSK, T.; DEVAUCHELLE, P.; LEBLANC, A.; LEGENDRE, A.; POWERS, B.; LEVENTHAL, P. S.; KINET, P. J.; 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**, Philadelphia, v. 22, n. 6, p. 1301–1309, 2008.

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

HARTMANN, K.; HERMES, B.; RAPPERSBERGER, K.; SEPP, N.; MEKORI, Y.A.; HENZ, B.M. Evidence for altered mast cell proliferation and apoptosis in cutaneous mastocytosis. **British Journal of Dermatology**, London, v. 149, p. 554- 559, 2003.

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

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

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

HUME, C. T.; KIUPEL, M.; RIGATTI, L.; SHOFER, F. S.; SKORUPSKI, K. A.; SORENMO, K. U. Outcomes of dogs with grade 3 mast cell tumors: 43 cases (1997-2007). **Journal of the American Animal Hospital Association**, South Bend, v. 47, p. 37-44, 2011.

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**, Philadelphia, v. 22, n. 4, p. 985–988, 2008.

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

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

KIERSZENBAUM, A. L. Tecidos conjuntivos. In: *Histologia e biologia celular*. 2. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. cap. 4, p. 109-144.

KIUPEL, M.; WEBSTER, J. D.; BAILEY, K. L.; BEST, S.; DELAY, J.; DETRISAC, C. J.; FITZGERALD, S. D.; GAMBLE, D.; GINN, P. E.; GOLDSCHMIDT, M. H.; HENDRICK, M. J.; HOWERTH, E. W.; JANOVITZ, E. B.; LANGOHR, I.; LENZ, S. D.; LIPSCOMB, T. P.; MILLER, M. A.; MISDORP, W.; MOROFF, S.; MULLANEY, T. P.; NEYENS, I.; O'TOOLE, D.; RAMOS-VARA, J.; SCASE, T. J.; SCHULMAN, F. Y.; SLEDGE, S.; SMEDLEY, R. C.; SMITH, K.; SNYDER, P. W.; SOUTHORN, E.; STEDMAN, N. L.; STEFICEK, B. A.; STROMBERG, P. C.; VALLI, V. E.; WEISBRODE, S. E.; YAGER, J.; HELLER, J.; MILLER, R. Proposal of a 2-tier histologic grading system for canine cutaneous mast cell tumors to more accurately predict biological behavior. **Veterinary pathology**, New York, v. 48, n. 1, p. 147–155, 2011.

KIUPEL, M.; WEBSTER, J. D.; KANEENE, J. B.; MILLER, R.;

YUZBASİYANGURKAN, V. The use of KIT and tryptase expression patterns as prognostic tools for canine cutaneous mast cell tumors. **Veterinary Pathology**, New York, v. 41, n. 4, p. 371–377, 2004.

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

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

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

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

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

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

LADUE, T.; PRICE, G. S.; DODGE, R.; PAGE, R. L.; THRALL, D. E. Radiation therapy for incompletely resected canine mast cell tumors. **Veterinary Radiology and Ultrasound**, Raleigh, v. 39, p. 57-62, 1998.

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

LONDON, C.; GALLI, S. J.; YUUKI, T.; HU, Z.; HELFAND, S. C.; GEISSLER, E. N. Spontaneous canine mast cell tumors express tandem duplications in the protooncogene c-kit. **Experimental Hematology**, London, v. 27, p. 589-597, 1999.

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

LONDON, C. A.; THAMM, D.H.; VAIL, D.M. Mast cell tumors. In: WITHROW, S.J.; MACEWEN, E.G. **Small Animal Clinical Oncology**, p. 335-355, 2013.

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

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

83, 1986.

MARTIN, P. D.; ARGYLE, D. J. Advances in the management of skin cancer. **Veterinary Dermatology**, New York, v. 24, n. 1, p. 173–180, 2013.

MARTINS, A. M. C. P. F.; VASQUES-PEYSER, A.; TORRES, L.N.; MATERA, J. M.; DAGLI, M. L. Z.; GUERRA, J. L. Retrospective-systematic study and quantitative analyses of cellular proliferation and apoptosis in normal, hyperplastic and neoplastic perianal glands in dogs. **Veterinary and Comparative Oncology**, Oxford, v. 6, n. 2, p. 71-79, 2008.

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

MCCAW, D. L.; MILLER, M. A.; BERGMAN, P. J.; WITHROW, S. J.; MOORE, A. S.; KNAPP, D. W.; FOWLER, D.; JOHNSON, J. C. Vincristine therapy for mast cell tumors in dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Philadelphia, v. 11, n. 6, p. 375-378, 1997.

MCNIEL, E. A.; PRINK, A. L.; O'BRIEN, T. D. Evaluation of risk and clinical outcome of mast cell tumors in pug dogs. **Veterinary and Comparative Oncology**, Oxford, v. 4, n. 1, p. 2-8, 2006.

MILLER, D. M. The occurrence of mast cell tumors in the dog. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, Philadelphia, v. 33, p. 473-489, 1995.

MISDORP, W. Mast cells and canine mast cell tumors: a review. **Veterinary Quarterly**, Netherlands, v. 26, p. 156-169, 2004.

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**, Chicago, 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 tumors. **Veterinary Record**, London, v. 158, p. 287-297, 2006.

MURPHY, S.; SPARKES, A. H.; BREARLEY, M. J.; SMITH, K. C.; BLUNDEN, A. S. Relationships between the histological grade of cutaneous mast cell tumors in dogs, 155 their survival and the efficacy of surgical resection. **Veterinary Record**, London, v. 154, p. 743-746, 2004.

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

Columbia, v. 17, n. 6, p. 561–564, 2005.

O'CONNELL, K.; THOMSON, M. Evaluation of prognostic indicators in dogs with multiple, simultaneously occurring cutaneous mast cell tumours: 63 cases. **Veterinary and Comparative Oncology**, Oxford, v. 11, n. 1, p. 51–62, 2013.

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

OUYANG, L.; SHI, Z.; ZHAO, S.; WANG, F.T.; ZHAU, T.; LIU, B.; BAO, J.K. Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. **Cell proliferation**, Oxford, v. 45, p. 487–498, 2012.

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

PHILLIPS, B.S.; KASS, P. H.; NAYDAN, D.K.; WINTHROP, M.D.; GRIFFEY, S.M.; MADEWELL, B.R. Apoptotic and proliferation indexes in canine lymphoma. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, v.12, p. 111–117, 2000.

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

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**, Columbia, v. 16, n. 6, p. 554–561, 2004a.

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

QUINN, C. M.; WRIGTH, N. A. The clinical assessment of proliferation and growth in human tumors: evaluation of methods and application as a prognostic variable. **Journal of Pathology**, Oxford, 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 tumors. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Philadelphia, v. 22, n. 6, p. 1390–1396, 2008.

ROBAT, C.; LONDON, C. A.; BUNTING, L.; MCCARTAN, L.; STINGLE, N.; SELTING, K.; KURZMAN, I.; VAIL, D. M. Safety evaluation of combination vinblastine and toceranib phosphate (Palladia®) in dogs: A phase I dose-finding study. **Veterinary and Comparative Oncology**, Oxford, v. 10, n. 3, p. 174–183, 2012.

ROMANSIK, E. M.; REILLY, C. M.; KASS, P. H.; MOORE, P. F.; LONDON, C. A. Mitotic index is predictive for survival for canine cutaneous mast cell tumors. **Veterinary Pathology**, New York, v. 44, n. 3, p. 335–341, 2007.

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

RUSSEL, J.H.; LEY, T.J. Lymphocyte-mediated cytotoxicity. **Annual Review of Immunology**, Palo Alto, v. 20, p. 323-370, 2002.

SABATTINI, S.; SCARPA, F.; BERLATO, D.; BETTINI, G. Histologic grading of canine mast cell tumor: is 2 better than 3? **Veterinary Pathology**, New York, 2014.

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

SCARPA, F.; SABATTINIA, S.; BETTINI, G.; Cytological grading of canine cutaneous mast cell tumors. **Veterinary and Comparative Oncology**, 2014.

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

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

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

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

SHOOP, S. J. W.; MARLOW, S.; CHURCH, D.B.; ENGLISH, K.; MCGREEVY, P.D.; STELL, A.J.; THOMSON, P.C.; O'NEIL, D.G.; BRODBELT, D.C. Prevalence and risk factors for mast cell tumors in dogs in England. **Canine Genetics and Epidemiology**, London, 2:1, 2015.

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

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

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

STOCKMANN, F.D.; FERRARI, H.F.; ANDRADE, A.L.; LOPES, R.A.; CARDOSO, T.C.; LUVIZOTTO, M.C.R. Canine Transmissible Veneral Tumors: Aspects Related to Programmed Cell Death. **Brazilian Journal Veterinary Pathology**, v. 4, n. 1, p. 67-75, 2011.

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

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

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

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

TAKEUCHI, Y.; FUJINO, Y.; WATANABE, M.; NAKAGAWA, T.; OHNO, K.; SASAKI, N.; SUGANO, S.; TSUJIMOTO, H. Aberrant autophosphorylation of c-Kit receptor in canine mast cell tumor cell lines. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Netherlands, v. 137, n. 3-4, p. 208–216, 2010.

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

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

THAMM, D. H.; MAULDIN, E. A.; VAIL, D. M. Prednisone and vinblastine chemotherapy for canine mast cell tumor – 41 cases. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Philadelphia, v. 13, p. 491-497, 1999.

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

THAMM, D. H.; VAIL, D. M. Mast cell tumors. In: WITHROW, S. J.; MACEWEN, S. **Small animal clinical oncology**. 4. ed. St Louis, MO: Saunders Elsevier, 2007. p. 402-424.

THOMPSON, J. J.; PEARL, D. L.; YAGER, J. A.; BEST, S. J.; COOMBER, B. L.; TORRES, R. N.; KIUPEL, M.; FOSTER, R. A. Canine subcutaneous mast cell tumors: cellular proliferation and KIT expression as prognostic indices. **Veterinary Pathology**, New York, v. 48, n. 1, p. 169–181, 2011b.

VASCELLARI, M. M.; GIANTIN, K.; CAPELLO, A.; CARMINATO, E. M.; MORELLO, A.; VERCELLI, A.; GRANATO, P.; BURACCO, M.; DACASTO, F.; MUTINELLI. Expression of Ki67, BCL-2, and COX-2 in Canine Cutaneous Mast Cell Tumors: Association With Grading and Prognosis. **Veterinary Pathology**, New York, v. 50, n. 1, p. 110-121, 2013.

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

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

WEBSTER, J. D.; KIUPEL, M.; KANEENE, J. B.; MILLER, R.; YUZHASIYANGURKAN, V. The use of KIT and tryptase expression patterns as prognostic tools for 164 canine cutaneous mast cell tumors. **Veterinary Pathology**, New York, v. 41, n. 4, p. 371–377, 2004.

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

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

WEBSTER, J. D.; YUZHASIYAN-GURKAN, V.; MILLER, R. A.; KANEENE, J. B.; KIUPEL, M. Cellular proliferation in canine cutaneous mast cell tumors: associations with c-kit and its role in prognostication. **Veterinary Pathology**, New York, v. 44, 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**, London, v. 4, p. 32, 2008.

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

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

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

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

WU, H.; HAYASHI, T.; INOUE, M. Immunohistochemical expression. Of Mdm2 and p53 in canine cutaneous mast cell tumours. **Journal of Veterinary Medicine**, San Diego, v. 53, p. 53-68, 2006.

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

YANG, F.; TRAN, T. A.; CARLSON, J. A.; HIS, E. D.; ROSS, C. W.; ARBER, D. A. Paraffin section immunophenotype of cutaneous and extracutaneous mast cell disease. Comparison to other hematopoietic neoplasms. **American Journal of Surgical Pathology**, Philadelphia, v. 24, p. 703-709, 2000.

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

YUAN, C.H.; FILIPPOVA, M.; HUGHES, P.D. Modulation of apoptotic pathways by human papillomaviruses (HPV): mechanisms and implications for therapy. **Viruses**, Cairo, v. 4, p. 3831-3850, 2012.

ZEMKE, D.; YAMINI, B.; YUZHASIYAN-GURKAN, V. Mutations in the juxtamembrane domain of c-KIT are associated with higher grade mast cell tumors in dogs. **Veterinary Pathology**, New York, v. 39, n. 5, p. 529-535, 2002.