

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO - UENF**

ANNA PAULA MARTINS DE CARVALHO

**CLASSIFICAÇÃO HISTOPATOLÓGICA, AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO
CELULAR E IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE RECEPTORES C-KIT
EM MASTOCITOMAS CANINOS**

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ

2015

ANNA PAULA MARTINS DE CARVALHO

**CLASSIFICAÇÃO HISTOPATOLÓGICA, AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO
CELULAR E IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE RECEPTORES C-KIT
EM MASTOCITOMAS CANINOS**

Tese apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Ciência Animal.

ORIENTADOR: Prof. Leonardo Serafim da Silveira
CO-ORIENTADOR: Prof.. Andrigo Barboza De Nardi

CAMPOS DOS GOYTACAZES

2015

ANNA PAULA MARTINS DE CARVALHO

**CLASSIFICAÇÃO HISTOPATOLÓGICA, AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO
CELULAR E IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE RECEPTORES C-KIT
EM MASTOCITOMAS CANINOS**

Tese apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Ciência Animal.

Aprovada em 02/03/2015

Sara Maria de Carvalho e Suzano – DSc Medicina Veterinária - UCB

Eulógio Carlos Queiroz de Carvalho – DSc Patologia Veterinária - UENF

Enrique Medina Acosta – Dsc Parasitologia Médica e Molecular - UENF

Prof. Leonardo Serafim da Silveira - Orientador (DSc Patologia Vet.) - UENF

Aos

Meus pais, meu irmão e meu
marido, por tudo que vocês já
fizeram por mim.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus por me dar saúde, coragem, força de vontade e por me permitir concluir mais esta etapa.

Ao meu marido, Herval Velasco Neto, pelo companheirismo e por me ajudar em todos os momentos necessários, dando-me apoio, força e carinho sempre que precisei. Não teria conseguido sem você.

À minha mãe, Samara Martins de Carvalho, por sempre correr para me ajudar, mesmo que isso exigisse enorme sacrifício. Obrigada por tudo!

Ao meu pai, Joilson Dias de Carvalho, pela disponibilidade em ajudar sempre que precisei e pelas correções no português, sempre tão úteis.

Ao meu irmão, Pedro Henrique Martins de Carvalho, minha pessoa preferida no mundo, por todos esses anos de companhia e por tornar alguns momentos difíceis mais fáceis.

Ao meu orientador e professor, Leonardo Serafim da Silveira, pela compreensão, ensinamentos, apoio, disponibilidade e amizade durante esses 10 anos de orientação. Não tenho palavras para agradecer por tudo que você fez por mim.

Ao meu coorientador, Andriago Barboza de Nardi, pelas ideias, disponibilidade e ajuda oferecida a mim sempre que precisei.

Aos meus companheiros e amigos Juliana Ywasaki Lima, Fábio Ferreira de Queiroz e Carolina Torres de Azevedo, por toda a ajuda recebida, pela amizade e pelos momentos de risadas que tornaram tudo mais fácil.

À minha amiga de graduação, mestrado e doutorado, Luciana Salles Vasconcelos Henriques, por tantos anos de amizade, pelas histórias e por tornar tudo muito mais divertido. Acho que agora vamos sair da caverna do dragão.

À minha avó, Edméa Martins, por toda a garra e força que sempre demonstrou e por me provar que tudo é possível.

A toda minha família, especialmente Andrezza, Mirinha, Amanda, Júnior, Renata e Pedro Victor, por me darem todo o apoio que sempre precisei ao longo de toda essa jornada.

Ao amigo Hassan Jerdy, por me acompanhar nas longas horas tentando descobrir o funcionamento do microscópio e por me ajudar nas fotos do trabalho.

À minha orientanda, Gabriella Massine, por sempre me ajudar quando precisei.

À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, pelo oferecimento do curso, e à CAPES, pela concessão da bolsa de doutorado.

A todos os professores, funcionários e alunos do laboratório de Patologia da UENF, por me ajudarem em cada etapa necessária.

Aos laboratórios VetMol e VetPat, nas pessoas de Rafael Torres Neto e Felipe Sueiro, por cederem espaço e conhecimento e por permitirem a realização do trabalho em suas dependências.

A todos os professores e funcionários do curso de Ciência Animal da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro.

Às minhas irmãs, Mariana Lima Moraes e Regina Célia Padilha, por acreditarem em mim e pela amizade de tantos anos. Obrigada por cada risada, cada história e cada passeio ao longo de todo esse tempo.

A todos os meus amigos por estarem ao meu lado, mesmo que alguns de longe, pela amizade de tantos anos e por me fazerem rir. Sei que muitas vezes não estive presente, mas vocês sempre estiveram no meu coração.

A todos os membros da banca pelas críticas pertinentes que tornaram este trabalho melhor.

E a todos que de alguma maneira contribuíram para que eu chegasse até aqui.

“Cada sonho que você deixa para trás
é um futuro que deixa de existir.”

Steve Jobs

RESUMO

O mastocitoma é o tumor cutâneo mais comum em cães, representando 20% dos tumores caninos. A graduação histopatológica é o método de eleição para prever o comportamento biológico do mastocitoma e, atualmente, são utilizados os métodos de Patnaik e de Kiupel para dividi-los em graus de malignidade. A imunistoquímica (IHQ) permite avaliar os mastocitomas e definir o prognóstico, através da marcação do c-kit e do ki-67, associado à proliferação tumoral. O mastocitoma tem etiologia indefinida, mas vem sendo associado à presença de mutação no c-kit. O objetivo do trabalho é quantificar e identificar os mastocitomas de cães de Campos dos Goytacazes que possuam mutações e associar com os graus histológicos. Foram avaliados 61 animais, levando em consideração o sexo, a raça, a idade, a localização tumoral, o grau tumoral pelas classificações de Patnaik e Kiupel, a infiltração de eosinófilos, a marcação do KIT e do Ki-67 e a presença de mutação. As variáveis foram correlacionadas utilizando os testes de qui-quadrado, teste de Fisher e teste de verossimilhança. Não foi verificada predileção sexual ao desenvolvimento do mastocitoma. Os animais idosos foram os mais acometidos, já os animais sem raça definida e os das raças Boxer, Labrador e Pinscher foram aqueles com maior predisposição ao desenvolvimento tumoral. A localização foi a única variável clínica associada ao grau tumoral ($p=0.011$), com tumores em membros relacionados a tumores benignos e os tumores na região genital cabeça e pescoço relacionados a tumores malignos. Os tumores de grau II e os de baixo grau foram os mais encontrados e as duas classificações demonstraram correlação muito significativa entre elas ($p<0,001$). A concentração do infiltrado eosinofílico não demonstrou correlação significativa a nenhuma das classificações histológicas. O padrão KIT foi dependente da localização tumoral ($p=0,015$) e das classificações de Patnaik ($p=0,001$) e Kiupel ($p<0,001$). A marcação do Ki-67 demonstrou dependência da localização ($p=0,024$), mas independência das classificações histológicas e do padrão KIT. O concentrado eosinofílico não estava associado ao padrão KIT, mas foi correlacionado significativamente ao Ki-67 ($p=0,028$). A presença de mutação no exon 11 do domínio justamembrana não demonstrou associação a nenhuma das variáveis clínicas, das classificações histológicas, da concentração de eosinófilos e do padrão KIT. A presença da mutação foi correlacionada significativamente apenas

ao Ki-67 ($p=0,010$). Os resultados obtidos sugerem que a localização é a variável clínica mais relacionada ao prognóstico e que apenas a classificação de Kiupel associada ao imunohistoquímica são suficientes para avaliar o comportamento tumoral.

Palavras-chave: mastocitoma, classificação histológica, KIT, Ki-67, mutação.

ABSTRACT

Mast cell tumor is the most common skin tumors in dogs representing 20% of canine tumors. The histological classification is the method of choice to predict the biological behavior of mast cell tumor and currently the methods of Patnaik and Kiupel are used. Immunohistochemistry (IHC) allows the evaluation of mast cell tumors and defining prognosis, by the c-kit marking and ki-67, associated with tumor proliferation. The mast cell tumor is unknown etiology, but has been associated with the presence of mutation in the c-kit. The objective is to quantify and identify the mast cell tumors in dogs of Campos dos Goytacazes that have mutations and associate with histological grades. We evaluated 61 animals and sex, breed, age, tumor location, tumor grade by ratings Patnaik and Kiupel, infiltration of eosinophils, marking the KIT and Ki-67 and the presence of mutation were evaluated. The variables were correlated using the chi-square test, Fisher's exact test and likelihood ratio test. There was no sex predilection development of mast cell tumor, the old-aged were the most affected animals, the mixed breed, Boxer, Labradors and Pinschers were those with greater predisposition to tumor development. The location was the only clinical variable associated with tumor grade ($p = 0.011$), with tumors in members related to benign tumors and tumors in the genital area, head and neck associated with malignant. Grade II tumors and low-grade were the most frequent and the two classifications showed very significant correlation between them ($p < 0.001$). The concentration of eosinophilic infiltrate showed no significant correlation with any of the histological scores. The KIT was dependent on the tumor location ($p = 0.015$) and Patnaik ($p = 0.001$) and Kiupel ($p < 0.001$) ratings. The marking of the Ki-67 showed dependence location ($p = 0.024$), but independent of the histological scores and KIT. Eosinophilic concentrate was not associated with KIT, but was significantly correlated with Ki-67 ($p = 0.028$). The presence of mutation on exon 11 showed no association with any of the clinical variables, the histological scores, the concentration of eosinophils and KIT. The mutation was significantly correlated only to Ki-67 ($p = 0.010$). The results suggest that the location is the clinical variable most related to prognosis and that Kiupel rating associated with immunohistochemistry is sufficient to assess tumor behavior.

Keywords: mast cell tumor, histologic classification, KIT, Ki-67, mutation

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01: Fotomicrografia com a gradícula usada para a contagem das células marcadas com o Ki-67 e as células marcadas com n= 26 (IHQ; Ki-67-400X).....	41
Figura 02: Porcentagem de machos e fêmeas com mastocitoma avaliados no estudo.....	45
Figura 03: Número de animais de cada raça representada no trabalho.....	47
Figura 04: Distribuição da localização tumoral dos mastocitomas analisados.....	48
Figura 05: Mastocitoma de cão, grau I (Patnaik). Mastócitos redondos com pouco polimorfismo. Tumor restrito a uma pequena área na derme (HE- 50µm).	50
Figura 06: Mastocitoma de cão, grau II (Patnaik). Tumor extenso, com células e núcleos polimórficos (HE- 50µm).	50
Figura 07: Mastocitoma de cão, grau III (Patnaik). Células e núcleos polimórficos. Presença de núcleos vacuolizados e alguns núcleos bizarros (HxE-50µm).	51
Figura 08: Mastocitoma de cão, baixo grau (Kiupel). Ausência de figuras de mitose, núcleos bizarros ou células multinucleadas. Cariomegalia menor que 10% (HE- 50µm).	52
Figura 09: Mastocitoma de cão, alto grau (Kiupel). Presença de algumas figuras de mitose, os diversos núcleos bizarros foram responsáveis pela classificação histológica (HE- 50µm).....	52
Figura 10: Mastocitoma de cão, padrão KIT do tipo perimembranoso (KIT 1), caracterizado pela marcação da membrana plasmática (IHQ; c-kit-50µm).....	55
Figura 11: Mastocitoma de cão, padrão KIT do tipo citoplasmático focal (KIT 2) , caracterizado pela marcação de uma pequena região ao lado do núcleo (IHQ; c-kit-50µm).	56
Figura 12: Mastocitoma de cão, padrão KIT do tipo citoplasmático focal (KIT 3), caracterizado pela marcação de todo o citoplasma celular (IHQ; c-kit-50µm).....	56
Figura 13: Mastocitoma de cão, não proliferativo com a marcação de 4 células dentro da gradícula (IHQ; Ki-67-10µm).....	59

Figura 14: Mastocitoma de cão, proliferativo com a marcação de 99 células dentro da gradícula (IHQ; Ki-67-10µm).....	59
Figura 15: Gel de agarose a 4%, corado com brometo de etídio para permitir a visualização do exon 11 da PCR de mastocitoma de cão, demonstrando dois tumores sem mutação observados pelas bandas únicas e uma com uma banda sobreposta (seta) a banda comum (central) indicando o material genético com mutação.....	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 01: Estádios clínicos do mastocitoma cutâneo em cães segundo a OMS (Owen, 1980)	34
Tabela 02: Dados dos mastocitomas esperados para cada grau da classificação histológica de Patnaik; Ehler; Mac Ewen (1984).....	37
Tabela 03: Variáveis analisadas no estudo e suas divisões.....	44
Tabela 04: Média da idade dos indivíduos analisados, com mínimo, máximo e desvio padrão.....	46
Tabela 05: Classes etárias utilizadas e o número de animais em cada uma.....	46
Tabela 06: Número de animais de cada sexo divididos pela classe etária.....	46
Tabela 07: Número de animais de cada raça divididos de acordo com o sexo	47
Tabela 08: Distribuição da localização tumoral de acordo com o sexo.....	49
Tabela 09: Número de animais classificados pelo método de Kiupel et al. (2011) divididos de acordo com a classe etária.....	53
Tabela 10: Número de animais classificados pelo método de Kiupel et al. (2011) divididos de acordo com os a localização do tumor, excluindo aqueles que não tinham localização conhecida.....	53
Tabela 11: Animais avaliados divididos pelas duas classificações histológicas....	53
Tabela 12: Concentração de eosinófilos relacionada com a classificação de Patnaik.....	54
Tabela 13: Concentração de eosinófilos relacionada com a classificação de Kiupel.	54
Tabela 14: Localização dos tumores avaliados relacionados com o padrão KIT, excluindo aqueles que não tinham a localização definida.....	57
Tabela 15: Divisão em graus pelo método de Patnaik et al. (1984) relacionados com o padrão KIT.....	58
Tabela 16: Divisão em graus pelo método de Kiupel et al. (2011) relacionados com o padrão KIT.	58
Tabela 17: Média de células marcadas pelo anticorpo Ki-67, com mínimo, máximo e desvio padrão.....	58

Tabela 18: Média, mínimo, máximo e desvio padrão de marcação do Ki-67 divididos pela classificação histológica em três graus.....	60
Tabela 19: Média, mínimo, máximo e desvio padrão de marcação do Ki-67 divididos por classificação histológica em dois graus.....	60
Tabela 20: Localização dos tumores relacionados com a classificação do Ki-67, excluindo aqueles que não tinham a localização definida.....	60
Tabela 21: Animais avaliados pelo ki-67 divididos de acordo com os graus de Patnaik; Ehler; Mac Ewen (1984).....	61
Tabela 22: Animais avaliados pelo ki-67 divididos de acordo com os graus de Kiupel et al (2011).....	61
Tabela 23: Concentração de eosinófilos divididos pelo padrão de marcação do Ki-67.....	62
Tabela 24: Avaliação histológica, utilizando as duas classificações, relacionada com o padrão KIT.....	62
Tabela 25: Avaliação histológica, utilizando as duas classificações, relacionada com a marcação do Ki-67.....	63
Tabela 26: Avaliação histológica, utilizando as duas classificações, relacionada com o sexo.....	63
Tabela 27: Divisão em graus, subdividindo o grau II em alto e baixo, relacionados com o padrão KIT.....	63
Tabela 28: Divisão em graus, subdividindo o grau II em alto e baixo, relacionados com a marcação do Ki-67.....	64
Tabela 29: Divisão em graus, subdividindo o grau II em alto e baixo, relacionados com a idade.....	64
Tabela 30: Número de animais com e sem mutações no resultado da PCR divididos de acordo com a classificação de Patnaik; Ehler; Mac Ewen (1984).....	66
Tabela 31: Número de animais com e sem mutações no resultado da PCR divididos de acordo com a classificação de Kiupel et al (2011).....	66
Tabela 32: Divisão em graus, subdividindo o grau II em alto e baixo, relacionados com a presença de mutação verificada pelo PCR.....	66
Tabela 33: Número de animais com e sem mutações no resultado da PCR divididos de acordo com o padrão KIT.....	67

Tabela 34: Número de animais com e sem mutações no resultado da PCR divididos de acordo com a classificação do Ki67..... 67

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
1.1. OBJETIVO GERAL.....	20
1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
1.3. JUSTIFICATIVA	20
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
2.1. MASTÓCITO.....	22
2.2. MASTOCITOMA.....	23
2.2.1. Etiologia	24
2.2.2. Diagnóstico	25
2.2.2.1. Macroscopia.....	25
2.2.2.2. Citologia.....	26
2.2.2.3. Histopatologia.....	26
2.2.2.4. Imunoistoquímica.....	28
2.3. FUNÇÃO DOS RECEPTORES DE TIROSINA QUINASE.....	29
2.3.1. Atuação dos receptores de tirosina quinase no câncer	31
2.3.2. As mutações nos mastocitomas	32
2.4. PROGNÓSTICO.....	32
3. MATERIAL E MÉTODOS	35
3.1. ANIMAIS.....	35
3.2. EXAME HISTOPATOLÓGICO.....	49

3.3. IMUNOISTOQUÍMICA.....	37
3.3.1. Processamento.....	38
3.3.1.1. Desparafinização em estufa.....	38
3.3.1.2 Reidratação em álcool.....	38
3.3.1.3. Recuperação antigênica.....	38
3.3.1.4. Bloqueio da peroxidase endógena.....	39
3.3.1.5. Incubação com os anticorpos primários e secundários.....	39
3.3.1.6. Coloração.....	39
3.3.1.7. Montagem.....	40
3.3.1.8. Avaliação imunoistoquímica.....	40
3.4. ANÁLISE MOLECULAR.....	41
3.4.1. Extração de DNA.....	41
3.4.2. Amplificação do c-kit justamembrana.....	42
3.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	42
4. RESULTADOS.....	45
4.1. AVALIAÇÃO DOS DADOS CLÍNICOS.....	45
4.1.1. Sexo.....	45
4.1.2. Idade.....	45
4.1.3. Raça.....	46
4.1.4. Localização tumoral.....	48
4.2. AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA.....	45
4.3. AVALIAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA.....	55

4.4. PCR.....	64
5. DISCUSSÃO.....	68
6. CONCLUSÕES.....	80
REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	81
APÊNDICES.....	93

1. INTRODUÇÃO

A alta incidência de neoplasias na espécie canina está correlacionada à maior longevidade destes animais, o que os expõe a carcinógenos por mais tempo e ao sistema imune comprometido (WITHROW; VAIL, 2007).

O mastocitoma é o tumor cutâneo mais comum em cães (LONDON; SEGUIN, 2003; WITHROW; VAIL, 2007), representando entre 16 e 21% dos tumores caninos (DALECK; DE NARDI; RODASKI, 2008). Pode surgir da derme ou do tecido subcutâneo com diversas apresentações, o que dificulta avaliações de comportamento (LONDON; SEGUIN, 2003; STREFEZZI; XAVIER; CATÃO-DIAS, 2003).

A graduação histopatológica é o método de eleição para prever o comportamento biológico do mastocitoma (PATNAIK; EHLER; MAC EWEN, 1984) e, atualmente, são usadas duas classificações: a de Kiupel et al. (2011) que os divide em dois graus de malignidade e a de Patnaik; Ehler; Mac Ewen (1984) que os divide em três graus de malignidade.

A imunoistoquímica permitiu avaliar melhor os mastocitomas e definir o prognóstico, através da análise da atividade proliferativa do tumor, a expressão quantitativa e qualitativa de várias proteínas nas células neoplásicas e as características genéticas destes tumores (OLIVEIRA, 2008).

Muitos estudos têm demonstrado uma proporção significativa de cães com mastocitoma apresentando alguma mutação no proto-oncogenes c-kit. Esta característica é mais comum em tumores de graus intermediários ou altos e estão associados a prognósticos ruins (WITHROW; VAIL, 2007).

A incidência de mutações no domínio justamembrana do c-kit é relatada em 13,6 a 33% dos mastocitomas cutâneos espontâneos (DOWNING et al., 2002; ZEMKE et al., 2002). A pesquisa das mutações nos mastocitomas é essencial para determinar a patogênese e a heterogeneidade clínica dos mastocitomas cutâneos em cães (OHMORI et al., 2008).

. OBJETIVO GERAL

Quantificar e identificar em mastocitomas de cães os receptores c-kit que possuam mutações e associá-los aos graus histológicos e à agressividade da neoplasia em cães na cidade de Campos dos Goytacazes-RJ.

1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a importância do sexo, idade, raça e localização no comportamento tumoral.
- Determinar o grau histológico dos mastocitomas caninos.
- Correlacionar quatro classificações histológicas para verificar a mais eficaz.
- Utilizar marcadores imunoistoquímicos para verificar o padrão KIT.
- Avaliar e determinar o índice de proliferação dos mastocitomas caninos através da imunoistoquímica.
- Avaliar a presença de mutações no exon 11 do domínio justamembrana no proto-oncogenes c-kit .
- Correlacionar às diversas variáveis que interferem no comportamento tumoral.

1.3. JUSTIFICATIVA

O mastocitoma é o tumor cutâneo mais comum na rotina veterinária, mas a sua etiologia ainda não está bem definida. A marcação dos receptores c-kit pode ajudar a conhecer melhor este tumor e, conseqüentemente, no desenvolvimento de novos tratamentos.

Ao redor do mundo, existem muitos estudos a respeito da mutação do receptor c-kit em mastocitomas, mas não há muitos estudos a respeito da presença, da

localização e da quantidade da mutação em pacientes no Brasil, especialmente no Norte Fluminense.

O conhecimento acerca do mastocitoma no Brasil ajudará na avaliação da resposta do paciente ao tumor e no desenvolvimento de tratamento específico para os padrões da doença brasileira.

O desenvolvimento deste trabalho vai auxiliar no conhecimento do mastocitoma na região de Campos dos Goytacazes, o que pode auxiliar no estudo desta neoplasia em outras regiões do Brasil, e permitir um estudo epidemiológico do mastocitoma canino brasileiro.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. MASTÓCITO

Os mastócitos são células do tecido conjuntivo, de origem hematopoiética, que deixam a medula óssea pela corrente sanguínea, ainda imaturos, e penetram nos tecidos onde se proliferam, diferenciam-se e permanecem durante semanas ou meses (METCALFE, 1995; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004; OKAYAMA, 2006; DALECK; DE NARDI; RODASKI, 2008). Sua concentração tecidual é determinada por um equilíbrio entre as células que chegam ao tecido com a taxa de apoptose das células já existentes no local (METCALFE, 1995).

Originam-se de um precursor hematopoiético (CD 34⁺), que está presente na medula óssea e no sangue periférico (KITAMURA; GO; HANATAKA, 1978), e migram para os tecidos, onde ocorre a diferenciação na forma madura (METCALFE, 1995). A diferenciação ocorre pela influência do fator de células tronco (SCF) e da interleucina-3 (IL-3), a partir de uma linhagem diferente dos precursores dos granulócitos e dos monócitos e macrófagos (SCOTT; STOCKHAM, 2000; ROBBIE-RYAN; BROWN, 2002).

A célula madura é globosa, grande e com citoplasma repleto de grânulos intensamente corados, ricos em mediadores inflamatórios, que são liberados quando há um estímulo (THARP, 1998). O núcleo é pequeno, esférico e central, mas de difícil visualização devido aos grânulos, que podem conter histamina e/ou heparina (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004; DALECK; DE NARDI; RODASKI, 2008), além de outros componentes, como os proteoglicanos, responsáveis pela ligação de diversos corantes catiônicos que conferem a característica de metacromasia, típica dos mastócitos e relacionada aos hexassacarídeos formadores da heparina (JAQUES et al., 1977).

Estão presentes em diversos tecidos, como a medula óssea e os linfonodos, mas não são observados em exames hematológicos de cães saudáveis (SCOTT; STOCKHAM, 2000). O tecido mais acessível para o estudo da atividade do mastócito é a pele (CHARLESWORTH, 1997). Há duas populações de mastócitos, uma denominada mastócito do tecido conjuntivo, que habita a pele e a cavidade

peritoneal, e a outra que habita a mucosa intestinal e os pulmões, denominada mastócito da mucosa (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

A pele do cão apresenta entre dois e doze mastócitos por campo de grande aumento, localizados, principalmente, na derme e na junção epidérmica, normalmente nas regiões perivascular sanguínea e linfática, junto aos anexos cutâneos e nervos, o que permite o exercício de suas funções nas reações imunes e alérgicas, inflamações e expulsões de parasitas (BENINGO; SCOTT; ERB, 2000; ZAPULLA *et al.*, 2002; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). Os mastócitos estão distribuídos por toda a pele do animal, com maior concentração no pavilhão auditivo e nos membros (AUXILIA; HILL, 2000).

As reações alérgicas dermatológicas são as mais comumente associadas aos mastócitos e as características da lesão dependem da sensibilidade do órgão-alvo, dos mediadores liberados e da natureza do antígeno presente no local (DALECK; DE NARDI; RODASKI, 2008).

Em cães, as patologias relacionadas aos mastócitos são as reações de hipersensibilidade tipo I local e sistêmica (RINGLE, 2000) e os mastocitomas (DALECK; DE NARDI; RODASKI, 2008).

2.2. MASTOCITOMA

O mastocitoma é o tumor cutâneo mais frequente em cães (LONDON; SEGUIN, 2003; WITHROW; VAIL, 2007), representando entre 16 e 21% dos tumores caninos (DALECK; DE NARDI; RODASKI, 2008). Embora seja mais comum na pele e no tecido subcutâneo, há relatos de tumores primários no intestino, fígado e baço (LONDON; SEGUIN, 2003).

Acomete, principalmente, cães entre oito e nove anos (LONDON; SEGUIN, 2003), mas pode ser diagnosticado em animais entre um ano e meio a dezessete anos (COSTA-CASAGRANDE *et al.*, 2008) e não há predileção por sexo (COSTA-CASAGRANDE *et al.*, 2008; FURLANI *et al.*, 2008). Há predisposição racial do Boxer (COSTA-CASAGRANDE *et al.*, 2008; FURLANI *et al.*, 2008), Boston Terrier, Bulldog inglês (CROW, 1977; GOLDSCHMIDT; HENDRICK, 2002; LONDON;

SEGUIN, 2003), Labrador, Golden Retrievers, Cocker Spaniel, Schnauzer, Teckel e Shar-pei (DALECK; DE NARDI; RODASKI, 2008). Cães mestiços também possuem alta incidência de mastocitoma, o que pode ser explicado pelo grande número de cães sem raça definida atendidos na rotina da clínica veterinária (COSTA-CASAGRANDE et al., 2008; FURLANI et al., 2008).

O mastocitoma cutâneo se localiza, frequentemente, nas regiões do tronco e regiões perineal e genital (50-60% dos casos) (FURLANI et al., 2008), seguida dos membros (25%) (GOVIER, 2003), mas também podem aparecer com certa frequência na cabeça e no pescoço (KIUPEL et al, 2005; FULCHER et al. 2006). Ainda não há relatos conclusivos de que o tumor, em determinadas regiões, como junções muco-cutâneas, seja mais agressivo do que em outras (LONDON; SEGUIN, 2003).

2.2.1. Etiologia

Os eventos moleculares e genéticos que contribuem para o desenvolvimento e progressão do tumor ainda não estão bem elucidados, mas estudos recentes demonstram relação com anormalidades na p53 e na superexpressão do c-kit (WU; HAYASHI; INQUE, 2004; TURIN et al., 2006; WEBSTER et al., 2007).

O mastocitoma é associado à inflamação crônica e à aplicação de algumas substâncias irritantes à pele (WITHROW; VAIL, 2007). Há indícios da relação entre o desenvolvimento da neoplasia à presença de partículas virais do tipo C em células tumorais e na medula óssea de cães com mastocitoma (DALECK; DE NARDI; RODASKI, 2008). O mastocitoma pode ser transmitido de um cão para outro, utilizando extratos tumorais, especialmente em animais muito jovens ou imunocomprometidos, porém não há evidência de transmissão horizontal do tumor (WITHROW; VAIL, 2007; DALECK; DE NARDI; RODASKI, 2008).

Muitos estudos têm demonstrado uma proporção significativa de cães com mastocitoma, apresentando alguma mutação no proto-oncogenes c-kit. Esta característica é mais comum em tumores de graus intermediários ou altos e estão associados a prognósticos ruins (WITHROW; VAIL, 2007).

A disfunção das tirosina-quinases vem sendo identificada em uma série de neoplasias. Essa pode ocorrer de muitas maneiras (LONDON, 2004). A superexpressão ou a mutação de um proto-oncogenes faz com que ocorra ativação da quinase, com propagação persistente do sinal e ausência da regulação negativa, gerando uma proliferação celular descontrolada, que acelera o desenvolvimento neoplásico (JARK et al., 2012).

Em cães, a mutação no KIT é encontrada em mastocitomas. Na maioria deles, a mutação consiste em uma duplicação em tandem no domínio justamembrana, codificada pelos exon 11-12 e responsável pela regulação negativa da ativação do receptor, o que resulta em estímulo persistente para a multiplicação celular (LONDON et al., 1999; LONDON, 2009).

Recentemente, foram identificadas mutações no domínio extracelular do KIT e deleções no domínio justamembrana de um menor número de mastocitomas, o que promove um crescimento tumoral descontrolado (ZEMKE et al., 2002; LONDON, 2009). Existe a possibilidade de mutações em outras localizações que ainda não foram identificadas (ZEMKE et al., 2002).

2.2.2. Diagnóstico

2.2.2.1. Macroscopia

A macroscopia do tumor é variável e pode aparecer como massas ou placas alopécicas, eritematosas e edematosas (GOLDSCHMIDT; HENDRICK, 2002). Podem ser confundidos com qualquer outro tipo de lesão e apresentar coloração branca ou amarelada, dependendo do grau de degranulação celular e da presença de inflamação secundária (GOLDSCHMIDT; HENDRICK, 2002; MURPHY, 2007).

O tamanho é variável, com média de 3,3 cm (FULCHER et al. 2006). Em tumores grandes, pode ocorrer ulceração e hemorragia. As lesões podem ser únicas ou múltiplas (GOLDSCHMIDT; HENDRICK, 2002).

O aspecto do tumor pode variar de acordo com o grau histológico. Enquanto os tumores bem diferenciados são pequenos, solitários, de crescimento lento e não

ulcerados, os indiferenciados têm crescimento rápido, ulceram e causam inflamação nos tecidos adjacentes (OLIVEIRA, 2008).

É comum o proprietário do paciente relatar variações no tamanho do tumor em pequenos períodos de tempo. Esta variação está relacionada à liberação de mediadores inflamatórios pelo tumor, que causam inflamação e edema no tecido adjacente, fazendo com que o tumor aumente e diminua de tamanho em pequenos intervalos de tempo (LONDON; SEGUIN, 2003; MURPHY, 2007).

2.2.2.2. Citopatologia

A citologia por aspirado de agulha fina é um dos métodos mais utilizados no diagnóstico do mastocitoma, por ser de fácil realização e fornecer um diagnóstico eficiente (LONDON; SEGUIN, 2003).

Os mastócitos aparecem como células redondas, de pequenas a médias, e com a presença de grânulos citoplasmáticos pequenos. Alguns mastócitos podem apresentar pouco ou nenhum grânulo, o que torna mais difícil o diagnóstico citológico (WITHROW; VAIL, 2007).

O diagnóstico diferencial destes tumores está relacionado aos chamados tumores de células redondas que são o linfoma, o tumor venéreo transmissível (TVT), o histiocitoma e o plasmocitoma (LONDON; SEGUIN, 2003).

Embora a citologia seja eficiente no diagnóstico, a histopatologia é essencial para a determinação do grau tumoral (LONDON; SEGUIN, 2003).

2.2.2.3. Histopatologia

A graduação histopatológica é o método de eleição para determinar o comportamento biológico do mastocitoma (BOSTOCK, 1973; PATNAIK; EHLER; MAC EWEN, 1984).

A classificação dos mastocitomas é feita dividindo-os em três graus de malignidade (PATNAIK; EHLER; MAC EWEN, 1984). Essa classificação baseia-se no índice mitótico, na quantidade de grânulos citoplasmáticos e no grau de anisocitose (STREFEZZI; XAVIER; CATÃO-DIAS, 2003; PINCZOWSKI et al., 2008).

Segundo Patnaik; Ehler; Mac Ewen (1984), os tumores de grau I são aqueles com pequenos grânulos citoplasmáticos e confinados à derme. Possuem pouca ou nenhuma atipia celular, mastócitos pouco polimórficos e redondos. Figuras de mitose são raras, com ausência de células binucleadas.

Os mastocitomas de grau II são mais celulares, com pleomorfismo celular e nuclear, grânulos de tamanhos variados e região tumoral mais extensa, desde a epiderme (com a presença de ulcerações) até planos mais profundos. Esses tumores apresentam algumas figuras de mitose e alguns núcleos bizarros, podendo ter áreas de necrose e hialinização (PATNAIK; EHLER; MAC EWEN, 1984).

Os tumores de grau III são extremamente celulares, com pleomorfismo celular e nuclear exacerbado, além de núcleos vesiculares e com nucléolos evidentes. Apresentam maior número de figuras de mitose, com áreas de hemorragia, necrose e hialinização (PATNAIK; EHLER; MAC EWEN, 1984).

A classificação dos mastocitomas em três graus ainda é considerado o padrão ouro para determinar o prognóstico, porém há uma predominância do grau II e uma variação da classificação do mesmo tumor entre observadores, o que torna o sistema de Patnaik menos eficiente (KIUPEL et al., 2011).

Com o objetivo de tornar a classificação histopatológica mais confiável, Kiupel et al. (2011) realizaram uma nova classificação. Esta divide os mastocitomas em dois graus de malignidade: os de baixo e os de alto grau. A nova classificação é baseada na morfologia nuclear e nas figuras de mitose que têm grande importância para o prognóstico. Ela demonstrou maior correlação com o prognóstico do que o padrão de Patnaik, além de um maior consenso entre os patologistas.

Os mastocitomas são classificados em alto grau quando apresentam uma ou mais destas características: ao menos três células multinucleadas (três ou mais núcleos) por campo de maior aumento (400 x), ao menos sete figuras de mitose por campo de maior aumento (400 x), ao menos três núcleos bizarros por campo de maior aumento (400 x), ou cariomegalia relacionada a pelo menos 10% das células tumorais. Os campos selecionados devem ser aqueles com maior índice mitótico ou

com maior grau de anisocariose. Os tumores que não se encaixam nesses padrões são classificados como de baixo grau (KIUPEL et al., 2011).

A classificação de Kiupel et al. (2011) demonstrou que os tumores identificados como de alto grau apresentam maior correlação com menor tempo de sobrevida e com o menor tempo de intervalo livre da doença (maior risco de recidivas e metástases).

Além da classificação, também se observa os eosinófilos, presentes em número variável, dispersos ou formando agregados pelo tumor (GROSS et al., 2005). Também pode ocorrer a presença de colagenólise (feixe de colágeno eosinofílico brilhante), esclerose, edema, necrose e inflamação secundária que, quando severa, pode mascarar as células neoplásicas e tornar difícil a visualização das margens (GOLDSCHMIDT; HENDRICK, 2002).

2.2.2.4. Imunoistoquímica

A imunoistoquímica é uma técnica que possibilita a localização e a visualização de um antígeno *in situ*, em cortes histológicos, através da utilização de anticorpos primários direcionados aos antígenos pesquisados. O diagnóstico oncológico usa a imunoistoquímica para identificar o tipo celular de neoplasias indiferenciadas e a origem da metástase, além de avaliar a terapia utilizada e o prognóstico (DALECK; DE NARDI; RODASKI, 2008).

Diversos anticorpos estão à disposição para utilização nos mastocitomas, avaliando a atividade proliferativa do tumor, a expressão quantitativa e qualitativa de várias proteínas nas células neoplásicas e as características genéticas dos mastocitomas (OLIVEIRA, 2008).

Os anticorpos antitriptase e antiqumase são considerados específicos para os mastocitomas, pois não coram nenhum outro tipo celular e são positivos na maioria dos casos desta neoplasia (DALECK; DE NARDI; RODASKI, 2008). Porém, a marcação por estes anticorpos não tem qualquer valor prognóstico (WEBSTER et al., 2007).

Para avaliação do prognóstico, utiliza-se a mensuração da proliferação celular, através da contagem da frequência de Regiões Organizadoras Nucleolares com afinidade pela prata (AgNORs), contagem de células positivas para o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) e a contagem de células positivas para a proteína Ki-67 (SIMOES; SCHONING; BUTINE 1994; STREFEZZI; XAVIER; CATÃO-DIAS, 2003; STREFEZZI et al., 2010; WEBSTER et al., 2007).

A proteína Ki-67 tem seu índice aumentado de acordo com grau histológico do tumor e está associado à recidiva e à mortalidade associada ao mastocitoma (WEBSTER et al., 2007).

O receptor KIT está associado a uma proteína transmembrana e está localizado na membrana citoplasmática. Em cães, mastócitos normais demonstram o KIT apenas na membrana, enquanto que os mastocitoma indiferenciados expressam o KIT citoplasmático (LONDON et al., 1996; REGUERA et al., 2000; MORINI et al., 2004, KIUPEL et al., 2004). Todos os mastocitomas expressam o KIT, mas com intensidade de reação diferente de acordo com o grau do tumor (REGUERA; FERRER; RABANAL, 2002).

A localização citoplasmática do KIT está relacionada a um menor tempo de remissão e sobrevida e a um prognóstico pior quando comparado com a localização citoplasmática (KIUPEL et al., 2004).

Existe uma correlação entre os graus mais agressivos à localização intracitoplasmática do KIT. O padrão KIT citoplasmático é mais comum nos mastocitomas de grau II (PATNAIK; EHLER; MAC EWEN., 1984) e nos de alto grau (KIUPEL et al., 2011), enquanto os padrões KIT citoplasmático focal e o perimembranoso foram associados aos graus I e II e aos de baixo grau. (KIUPEL et al., 2004; GIANTIN et al., 2012).

2.3. FUNÇÃO DOS RECEPTORES DE TIROSINA QUINASE

As proteínas quinases são as enzimas responsáveis pela transdução do sinal celular, pela regulação do crescimento, sobrevivência, diferenciação e morte celular (LONDON, 2004). As enzimas quinases, que atuam exclusivamente nos

aminoácidos da tirosina, são denominadas tirosina quinase (LONDON 2009; JARK et al., 2012)

As enzimas atuam através da fosforilação, transferência de grupos fosfatos do ATP (adenosina trifosfato), para elas mesmas (autofosforilação) ou de outras moléculas, gerando um sinal intracelular, em resposta a um sinal extracelular (LONDON, 2004; LONDON, 2009; JARK et al., 2012). Os sinais extracelulares geralmente são desencadeados pelos fatores de crescimento, hormônios ou citocinas (SACHSENMAIER, 2001).

As quinases podem estar presentes na superfície celular, no citoplasma ou no núcleo. As quinases que estão na superfície celular são ativadas pela ligação dos fatores de crescimento, denominados de receptores de tirosina quinase. (LONDON, 2007). Os receptores possuem um domínio para o ligante extracelular, um domínio de transmembrana e um domínio citoplasmático que regula a fosforilação (YARDEN et al., 1987; LONDON, 2004). Alguns exemplos desses receptores são os KIT, MET, AXL e o receptor de fator de crescimento epitelial (LONDON, 2009).

A função da quinase é a regulação das funções celulares, além de estar envolvida na angiogênese (LONDON, 2007).

O proto-oncogenes c-kit codifica um receptor transmembrana do tipo III, da subfamília das tirosina-quinases, denominado CD117 ou de receptor do fator de célula tronco (SCFR) (YARDEN et al., 1987; LONDON et al., 1996). O receptor KIT possui cinco domínios de imunoglobulina, sendo três os maiores deles: um domínio extracelular, um domínio de transmembrana e um domínio intracelular que é dividido em um domínio justamembrana e um domínio quinase, onde há o local para a ligação da ATP e para a fosfotransferase (YARDEN; ULLRICH, 1988; ROSKOSKI, 2005). O ligante do KIT é o SCF (WEBSTER et al., 2006). A ligação deste receptor ao fator de células tronco é muito importante para a sobrevivência, proliferação, diferenciação, migração, degranulação, supressão da apoptose e adesão da fibronectina dos mastócitos normais (TSAI et al., 1991; YEE; PAEK; BESMER, 1994).

O receptor KIT está presente nas células precursoras hematopoiéticas, melanócitos, células do sistema nervoso central e mastócitos, em que está associado à sobrevivência, proliferação e diferenciação celular (LONDON, 2004;

LONDON, 2009). Os mastócitos estão associados à adesão da fibronectina, quimiotaxia e degranulação (WEBSTER et al., 2006).

2.3.1. Atuação dos receptores de tirosina quinase no câncer

A disfunção das tirosina quinases foi identificada em uma série de neoplasias (LONDON, 2004). A superexpressão ou a mutação de um proto-oncogenes ativam a quinase, com propagação persistente do sinal e ausência da regulação negativa, gerando uma proliferação celular descontrolada que acelera o desenvolvimento neoplásico (JARK et al., 2012). A mutação pode ser adição, deleção ou troca de um simples aminoácido, mas, geralmente, ocorre por uma duplicação interna em tandem no KIT (LONDON, 2004).

O receptor de tirosina quinase do tipo KIT é um dos maiores exemplos de disfunção das tirosinas quinases que podem levar ao desenvolvimento de uma neoplasia (JARK et al., 2012).

O c-kit está envolvido na patogênese de diversas neoplasias humanas. A presença de mutações ou expressões aberrantes está relacionada a tumores do estroma gastrintestinal, câncer de próstata, leucemia mieloblástica e a mastocitoses (WEBSTER et al., 2006).

Em cães, a mutação no c-kit é encontrada em mastocitomas. Na maioria deles, a mutação consiste em uma duplicação em tandem no domínio justamembrana, codificada pelos exon 11-12 e responsável pela regulação negativa da ativação do receptor. Sem a regulação negativa, há um estímulo persistente para a multiplicação celular (LONDON et al., 1999; LONDON, 2009).

Outras mutações em diferentes domínios já foram identificadas, como no exon 8, mas todas elas parecem ter o mesmo efeito na desregulação celular (ZEMKE et al., 2002; LONDON, 2009).

2.3.2. As mutações nos mastocitomas

A proliferação de mastócitos está relacionada a presença de mutação do proto-oncogenes c-kit (DALECK; DE NARDI; RODASKI, 2008).

A porcentagem de mastocitomas que apresentam mutações no domínio justamembrana varia de acordo com os estudos. Zemke et al. (2002) reportaram que 13,6% dos animais de seu estudo apresentavam algum tipo de mutação, Webster et al. (2007) encontraram 16% dos cães afetados com alguma mutação, enquanto que London et al. (1999) reportaram 45% e Ma et al. (1999) 42%. Essas variações ocorrem pela randomização dos animais selecionados (WEBSTER et al., 2006).

Ohmori et al. (2008) relataram que qualquer mutação no c-kit pode estar envolvida na regulação da proliferação neoplásica. A investigação das mutações nos mastocitomas é essencial para determinar a patogênese e a heterogeneidade clínica da neoplasia em cães

Há uma relação entre o grau tumoral e a presença da mutação, especialmente as duplicações (DOWNING et al., 2002; ZEMKE et al., 2002), que aumentam em porcentagem de acordo com a indiferenciação tumoral. Os mastocitoma de grau II e grau III, tumores indiferenciados, são aqueles que mais associados a mutações, têm comportamento mais agressivo e maiores chances de recidivas e metástase, além de estarem relacionados com uma sobrevida menor do animal (LONDON et al. 1999; ZEMKE et al., 2002; WEBSTER et al., 2006).

Não se sabe se há relação entre a presença da mutação e a mudança da localização do KIT ou se esta ocorre por outra progressão do mastocitoma, pois o animal pode apresentar a localização citoplasmática sem apresentar mutação (WEBSTER et al., 2006).

2.4. PROGNÓSTICO

O comportamento biológico do mastocitoma varia de tumores de baixa malignidade a tumores extremamente malignos. Todos os mastocitomas são considerados

potencialmente malignos, mas apenas 50% dos casos se comportam assim (O'KEEFE, 1990; OLIVEIRA, 2008).

Vários fatores podem influenciar no prognóstico. O estadiamento clínico (Tabela 01), que divide os tumores em cinco estágios de acordo com as suas características, a velocidade de crescimento e de proliferação celular, predisposição racial, sinais sistêmicos, recorrência, idade do paciente, tamanho do tumor e presença de mutações no c-kit (BOSTOCK, 1973; WITHROW; VAIL, 2007; DALECK; DE NARDI; RODASKI, 2008). A classificação histológica é o fator mais importante na determinação do prognóstico e da sobrevivência do paciente (BOSTOCK, 1973; PATNAIK; EHLER; MAC EWEN, 1984; GOLDSCHMIDT; HENDRICK, 2002), mas apenas sugere o comportamento tumoral. Este é avaliado por outras análises como a contagem de AgNORs, o PCNA e o ki-67 (SIMOES et al, 1994; STREFEZZI; XAVIER; CATÃO-DIAS, 2003; WEBSTER et al., 2007; STREFEZZI et al., 2010).

Owen (1980) propôs um estadiamento clínico para efeitos de prognóstico, porém, cada aumento de grau na classificação do mastocitoma não significa, fundamentalmente, um agravamento no prognóstico (TURREL et al., 1988; LONDON; SEGUIN, 2003). O sistema (OWEN, 1980) atribui um estágio mais alto aos casos disseminados, comparados àqueles com lesões simples. Porém, Thamm; Mauldini; Vail (1999) relataram, em seu estudo, que cães com tumor único não apresentaram prognóstico melhor que aqueles com tumores múltiplos tratados com quimioterapia.

Tabela 01: Estádios clínicos do mastocitoma cutâneo em cães segundo a OMS (Owen, 1980).

Estádio clínico	Características
0	Tumor completamente excisado da derme, sem envolvimento do gânglio regional.
I	Lesão solitária na derme e tecido subcutâneo sem comprometimento ganglionar.
II	Lesão na derme e subcutâneo com comprometimento de gânglio regional ou várias lesões na derme.
III	Lesões múltiplas e recorrentes ou uma grande massa infiltrante, com ou sem comprometimento ganglionar.
IV	Tumores com metástase e enfermidade sistêmica (envolvimento sanguíneo ou medular).

Legenda: Todos os estágios podem ser divididos em a ou b. São a quando não há sinal sistêmico ou b quando há sinal sistêmico.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. ANIMAIS

Foi coletado material de 100 animais com diagnóstico prévio de mastocitoma. Ao longo do trabalho, alguns animais foram sendo eliminados por diagnósticos errados, pela quantidade insuficiente de material para realizar todas as etapas do trabalho, por falta de informações no histórico e por não estarem de acordo com o objetivo do trabalho, como os mastocitomas subcutâneos, que foram eliminados após diagnóstico. Após todas essas análises, restaram 61 animais para a análise.

Foram utilizados 61 tumores de cães (*Canis familiaris*), independente de raça, idade e sexo, provenientes de material de arquivo da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro em Campos dos Goytacazes – RJ, com diagnóstico prévio de mastocitoma cutâneo.

A idade, o sexo, a raça e a localização foram analisados para verificar se esses fatores influenciam no prognóstico tumoral. Nos casos em que o animal possuía mais de um tumor, foi considerado como tumor disseminado e usado para efeito de análise aquele que apresentava pior grau na classificação.

3.2. EXAME HISTOPATOLÓGICO

O exame histopatológico foi realizado novamente objetivando a confirmação do diagnóstico e a diferenciação dos mastocitomas em graus pela classificação de Patnaik; Ehler; Mac Ewen, (1984) (I, II e III) e de Kiupel et al. (2011) (alto e baixo) no Laboratório de Morfologia e Patologia Animal do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (LMPA/CCTA/UENF).

As amostras foram reemblocadas e cortadas (Micrótomo Semiautomático - LEICA RM2145) em 5 µm e as lâminas coradas pela Hematoxilina e Eosina (HxE) e pelo Azul de Toluidina para visualização dos grânulos citoplasmáticos dos mastócitos e da metacromasia.

As lâminas foram analisadas em microscópio óptico por 3 patologistas diferentes. Os exames foram realizados às cegas e, após a observação individual, os diagnósticos foram confrontados e, quando necessário, os patologistas chegaram a um consenso quanto a classificação e a diferenciação em graus dos mastocitomas. Outras características comuns foram observadas, como a presença de edema, necrose e inflamação secundária e presença de infiltrado eosinofílico.

O infiltrado eosinofílico foi classificado de acordo com a concentração de eosinófilos por campo avaliado. Quando os eosinófilos não eram visualizados, foram considerados como ausentes; quando o tumor possuía poucos eosinófilos esparsos pelo tumor, o infiltrado era considerado leve; quando o tumor apresentava um infiltrado eosinofílico em concentração média, presente em todos os campos, mas sem quantidade exagerada, o infiltrado foi considerado como moderado; e quando o tumor possuía uma concentração muito grande de eosinófilos por campo, chamando mais atenção que o próprio tumor, a concentração foi considerada intensa.

Os critérios utilizados para a diferenciação em alto ou baixo grau, segundo a classificação de Kiupel et al. (2011), foram a concentração de células multinucleadas de figuras de mitose e de núcleos bizarros por campo de maior aumento (400x) e a presença de cariomegalia em pelo menos 10% das células tumorais. Para a diferenciação em graus I, II ou III, pela classificação de Patnaik; Ehler; Mac Ewen (1984), foram usados critérios como a extensão tumoral, o pleomorfismo celular e nuclear e a presença de figuras de mitose, células multinucleadas ou células gigantes, mas sem levar em consideração o número específico destas, sendo uma classificação mais subjetiva (Tabela 02).

Além das classificações já consagradas, foram realizadas duas outras classificações histológicas que uniam as de Patnaik; Ehler; Mac Ewen (1984) e de Kiupel et al. (2011).

Uma classificação dividindo os mastocitomas em seis graus de malignidade (grau I baixo, grau I alto, grau II baixo, grau II alto, grau III baixo e grau III alto) e a outra dividindo apenas os tumores grau II em alto e baixo. Essas classificações foram realizadas após as de Patnaik e Kiupel e os resultados foram unidos para obter as novas classificações.

Tabela 02: Dados dos mastocitomas esperados para cada grau da classificação histológica de Patnaik; Ehler; Mac Ewen (1984).

Classificação de Patnaik

	Grau I	Grau II	Grau III
Celularidade	Pequena	Bastante celular	Altamente celular
Extensão	Tumor restrito a derme	Células neoplásicas infiltrando na derme profunda e no tecido subcutâneo	Células neoplásicas invadindo o tecido subcutâneo ou regiões mais profundas
Pleomorfismo	Células bem diferenciadas e arranjadas em fitas	Células moderadamente pleomórficas	Células altamente pleomórficas, com tamanho variado. Presença de células gigantes e multinucleadas
Forma	redondas	redondas a ovóides	Redonda, ovoide ou fusiforme
Figuras de Mitose	Ausentes	Raras (0-2 por campo)	Comum (3-6 por campo)

3.3. IMUNOISTOQUÍMICA

Os exames imunoistoquímicos foram realizados no laboratório VETMOL (Diagnóstico em Patologia Molecular Veterinária e Pesquisa), na Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho *Campus* Botucatu – SP, para confirmar o diagnóstico de mastocitoma, avaliar a proliferação tumoral, através do anticorpo anti Ki-67, avaliar a marcação do c-kit e associar à agressividade tumoral. Os mesmos cortes histológicos do processo anterior foram colocados em lâminas silanizadas para a realização dos exames.

3.3.1. Processamento

3.3.1.1. Desparafinização em estufa

Os cortes histológicos foram mantidos em estufa a 60° dentro de recipiente com xilol I durante 10 a 15 minutos e em recipiente com xilol II durante 10 a 15 minutos, em temperatura ambiente.

3.3.1.2 Reidratação em álcool

Após o xilol, as lâminas foram colocadas em álcool absoluto I, II e III, durante 3 minutos cada, para a retirada do xilol. As lâminas foram colocadas em álcool 95% e 85% para a hidratação do corte histológico. Após o álcool, a lâmina foi lavada em água deionizada por 5 minutos.

3.3.1.3. Recuperação antigênica

A recuperação antigênica foi realizada com ácido cítrico (2,1g para cada litro de água destilada) em panela pressurizada especial para imunoistoquímica, que controla a temperatura e a pressão interna, durante 30 minutos.

Após esse tempo, as lâminas foram retiradas da panela de pressão e colocadas para resfriar durante 10 minutos em temperatura ambiente e depois lavadas uma vez em água deionizada.

3.3.1.4. Bloqueio da peroxidase endógena

Para o bloqueio da peroxidase endógena, foi aplicada no tecido da lâmina uma camada de solução de peróxido de hidrogênio (água oxigenada 20 volumes + água destilada). Após 20 minutos em temperatura ambiente, a solução foi limpa com água deionizada. Para parar a reação, foi adicionada a solução tampão de lavagem TBS/Tris Tween 20x por duas vezes, deixando agir por 5 minutos cada vez.

3.3.1.5. Incubação com os anticorpos primários e secundários

No trabalho foram utilizados os anticorpos primários anti Ki-67, clone MIB-1 (anticorpo monoclonal, anti Ki67 humano, DakoCytomation) e CD117 (anticorpo policlonal, anti c-kit humano, DakoCytomation) para avaliar o proto-oncogene c-kit. A diluição do CD117 foi feita 1:1250 e a do MIB-1 foi de 1:100.

Foi inoculado 1 μ L de anticorpo por lâmina e deixado na estufa para agir por 1 hora e meia. A reação foi parada com TBS/Tris Tween 20x aplicada duas vezes.

A incubação com o anticorpo secundário foi realizada durante 45 minutos em temperatura ambiente, utilizando o kit EnVision (DAKO). Após esse tempo, a solução tampão Tris foi usada para a lavagem da lâmina e para parar a reação.

3.3.1.6. Coloração

O revelador utilizado foi o DAB (diaminobenzidina, DAKO, DAB+ Liquid, Chromogen Solution), que foi aplicado com uma pipeta na área do tecido e ficou agindo por 5 minutos. A lâmina foi lavada com solução tampão e depois com água deionizada.

A coloração com Hematoxilina foi realizada com o corante agindo sobre o tecido por 1 minuto e depois lavagem em água corrente por 4 minutos e com água deionizada no final.

3.3.1.7. Montagem

Na fase da montagem, ocorre um processo inverso ao inicial, no qual o tecido é desidratado novamente. As lâminas foram mergulhadas em álcool 85 e 95% e, nos três alcoóis absolutos, por um minuto e seguiram para um banho de xilol I por dois minutos e depois de xilol II, onde permaneceram até a montagem e colocação da lamínula.

3.3.1.8. Avaliação imunoistoquímica

A observação das lâminas foi realizada em microscópio óptico nas objetivas de 10x, 20x e 40x, avaliando o grau de marcação de cada anticorpo. A reação foi considerada positiva quando a marcação ocorria na membrana plasmática ou no citoplasma dos mastócitos.

Segundo Webster et al. (2004), marcação do anticorpo CD117 pode apresentar três padrões KIT:

- perimembranoso, quando há marcação membranar;
- citoplasmático focal, quando há marcação citoplasmática paranuclear;
- citoplasmático difuso, quando há marcação citoplasmática intensa.

O anticorpo MIB-1 está relacionado à proliferação tumoral e para avaliação é necessária a gradícula de 10x10 em um campo de 400x. Para a avaliação, foram contadas o número de células marcadas, dentro da gradícula (Figura 02), em cinco campos. Se a média de células marcadas for maior que 23, indica que o tumor é proliferativo, se for menor, o tumor é não proliferativo (WEBSTER et al., 2007).

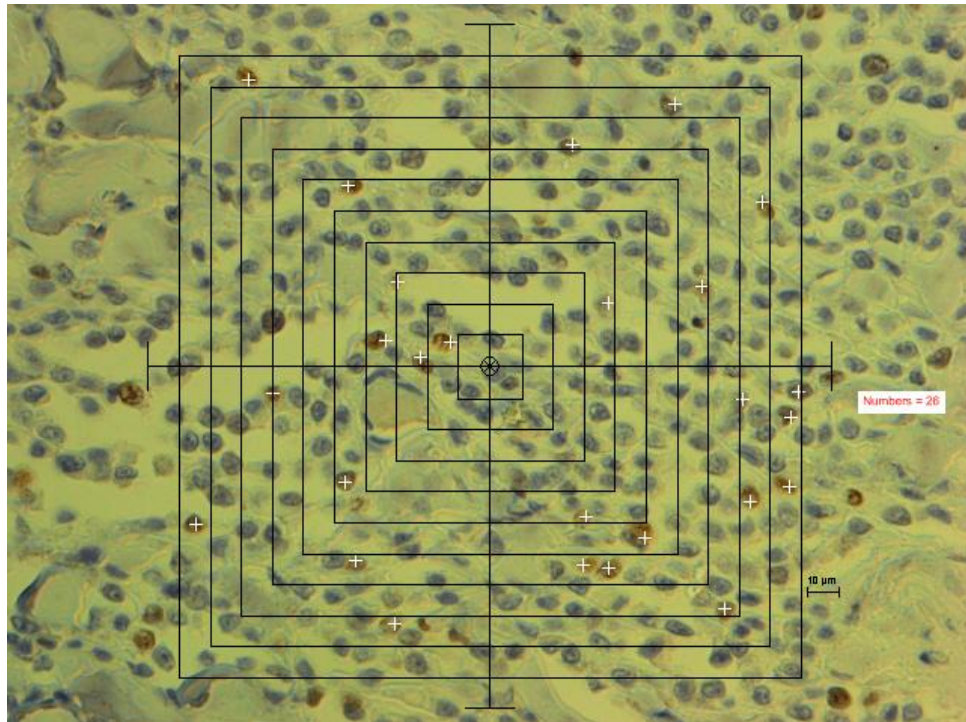


Figura 01: Fotomicrografia com a gradícula usada para a contagem das células marcadas com o Ki-67 e as células marcadas com um $n = 26$ (IHQ; Ki-67-400X).

3.4. ANÁLISE MOLECULAR

A Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) foi realizada no laboratório VETPAT em Campinas-SP, para verificar a presença de mutação no proto-oncogenes c-kit, com a utilização de um protocolo adaptado da técnica de Webster; Kiupel; Yuzbasiyan-Gurkan (2006). A PCR foi realizada em 40 blocos de parafina.

3.4.1. Extração de DNA

Depois de confirmado o tumor, uma fatia foi seccionada de cada bloco de parafina para a extração do DNA. Seguindo o padrão de Zemke et al (2002), a parafina foi retirada ao colocar uma amostra do tecido em 400 μL da para a digestão

solução (TRIS com EDTA). A amostra foi colocada a 95°C por 10 minutos e aquecida duas vezes por 30 segundos em forno micro-ondas na potência máxima, com mistura completa após cada aquecimento.

Foi adicionada 5µl de 15 mg de proteinase K em cada uma das amostras e estas foram incubadas a 42°C “overnight” ou até que o fragmento tecidual fosse completamente digerido. A proteinase K foi inativada por calor a 95° C por 10 minutos e as amostras centrifugadas a 12.000 RPM em uma microcentrífuga por 10 minutos e transferida para outro túbulo, sem a parafina. Em torno de 200 µl de cada reação foi usada para a PCR.

3.4.2. Amplificação da região justamembrana do c-kit

A amplificação do DNA da região justamembrana de c-kit foi realizada por primers (ATCTGTCTCTCTTTTCTCCCC e TGGGGTTCCTAAAGTCATTGT) baseados no exon 11, pela técnica de PCR convencional. O material passou por uma desnaturação inicial que durou quatro minutos a 94°C, seguido de 35 ciclos de 1 minuto por 94°C, mais 35 ciclos de dois minutos a 66°C, 35 ciclos de três minutos a 72°C e uma fase final de oito minutos por 72°C. O produto da amplificação foi colocado em gel de agarose a 4%, corados com brometo de etídio e visualizados com luz ultravioleta para avaliação por Eletroforese.

3.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Na análise estatística, foram avaliadas variáveis contínuas e categóricas. As variáveis contínuas foram a idade e o número de células marcadas com anticorpo anti Ki-67. As variáveis categóricas analisadas foram o sexo, a idade, a raça, a localização, o grau histológico (nas duas classificações), a concentração de eosinófilos, a marcação do KIT e a presença de mutação (Tabela 03).

Os resultados das análises histopatológicas foram analisados estatisticamente pelo programa IBM SPSS Statistics 20. Foi feita a estatística descritiva com as variáveis contínuas, calculando a média, o mínimo, o máximo e o desvio padrão. Com as variáveis categóricas foi calculada a frequência e a porcentagem de cada uma delas.

Foram realizados testes para correlacionar as diversas variáveis entre si. Para verificar a dependência entre as variáveis, foram usados os testes de qui-quadrado (χ^2), o teste da razão de verossimilhança e o teste exacto de Fisher. Foi utilizado o teste Phi e V de Cramer para verificar a força da dependência entre as variáveis.

Tabela 03: Variáveis analisadas no estudo e suas divisões.

Sexo	Macho Fêmea
Idade	Desconhecido Entre 0 e 3 anos Entre 4 e 6 anos Entre 7 e 9 anos Entre 10 e 12 anos Maiores que 12 anos
Raça	Labrador Fox Paulistinha Bernesse SRD Boxer Pit Bull Pinscher Maltês Dachshound Golden Rottweiler Bichon Frisé Akita Pug Pastor Alemão
Localização	Cabeça Pescoço Dorso Ventre Genital Membro Disseminado Desconhecido
Grau histológico (Patnaik)	Grau I Grau II Grau III
Grau histológico (Kiupel)	Baixo Grau Alto Grau
Concentração de eosinófilos	Ausente Leve Moderado Intenso
Padrão C-kit	Perimembranoso Citoplasmático focal Citoplasmático difuso
Ki-67	Não proliferativo Proliferativo
Presença de mutação	Normal Mutante

4. RESULTADOS:

4.1. AVALIAÇÃO DOS DADOS CLÍNICOS

4.1.1. Sexo

O sexo foi informado para 61 animais. Desses, 36 (59%) eram machos e 25 (41%) eram fêmeas (Figura 03).

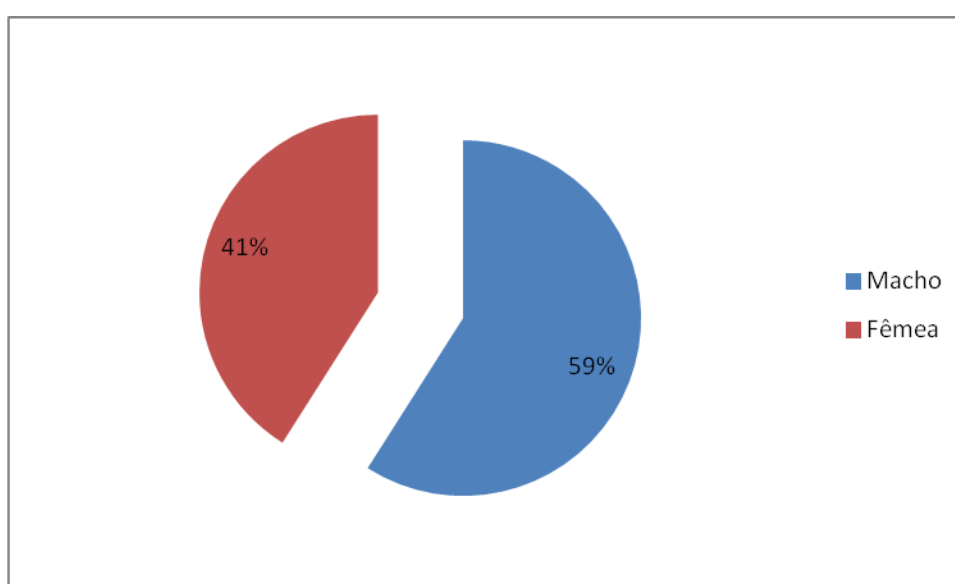


Figura 02: Porcentagem de machos e fêmeas com mastocitoma avaliados no estudo.

4.1.2. Idade

A idade dos animais variou entre 2 e 18 anos, com média de 9,1 anos. Nem todos os animais analisados tinham a idade relatada no histórico, por isso a média foi calculada com um $n= 58$ (tabela 04).

Para facilitar a análise estatística, os animais foram divididos em classes de acordo com a idade. As categorias estão na Tabela 05, assim como o número de animais agrupados em cada uma.

Tabela 04: Média da idade dos indivíduos analisados, com mínimo, máximo e desvio padrão.

Idade (n)	Média	Mínimo	Máximo	Desvio Padrão
58	9,1	2	18	3,28

Tabela 05: Classes etárias utilizadas e o número de animais em cada uma.

Idade	Número
Entre 0 e 3 anos	3
Entre 4 e 6 anos	10
Entre 7 e 9 anos	17
Entre 10 e 12 anos	22
Maiores que 12 anos	6
Desconhecido	3
Total	61

Pela avaliação estatística, a idade em que ocorre o aparecimento dos tumores é independente do sexo (Tabela 06) ($\chi^2 = 3,49$; gl.=4; p= 0,479).

Tabela 06: Número de animais de cada sexo divididos pela classe etária.

Classe Etária	Macho	Fêmea	Total
0 – 3 anos	2	1	3
4 - 6 anos	4	6	10
7-9 anos	10	7	17
10-12 anos	16	7	22
Maiores que 12	4	2	6
Desconhecido	1	2	3
Total	36	25	61

4.1.3. Raça

Em relação à raça, foram analisados 61 animais. Os sem raça definida (SRD) foram os mais representados, 15 (24,6%) animais, seguidos do Boxer com 14 (23 %). Foram avaliados sete animais da raça Labrador e Pinscher. As outras raças relatadas no estudo foram Fox Paulistinha, Pit Bull, Golden Retriever, Bichon Frisé,

Bernese, Maltês, Dachshund, Rottweiler, Akita, Pastor Alemão e Pug, totalizando 15 raças representadas (Figura 03).

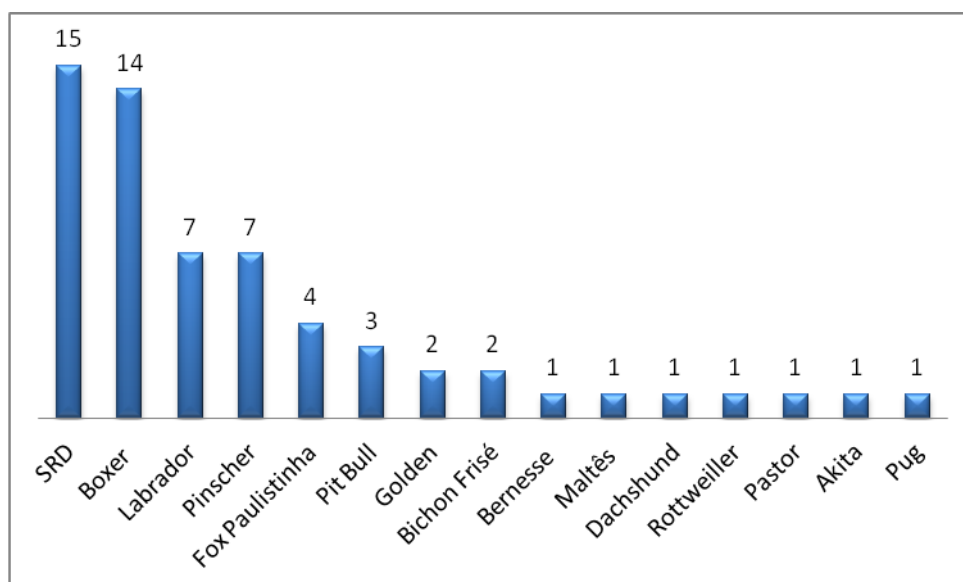


Figura 03: Número de animais de cada raça representada no trabalho.

Nenhuma raça teve dependência da idade ($\chi^2= 64,202$; gl.=56; $p=0,211$) ou do sexo (Tabela 07) ($\chi^2= 21,556$; gl.=14; $p=0,088$) para o aparecimento do tumor, pois não houve significância estatística.

Tabela 07: Número de animais de cada raça divididos de acordo com o sexo.

Raça	Macho	Fêmea	Total
SRD	9	6	15
Boxer	9	5	14
Labrador	6	1	7
Pinscher	6	1	7
Fox Paulistinha	1	3	4
Pit Bull	1	2	3
Golden Retriever	1	1	2
Bichon Frisé	0	2	2
Bernese	0	1	1
Maltês	0	1	1
Dachshund	0	1	1
Rottweiler	1	0	1
Akita	1	0	1
Pug	0	1	1
Pastor Alemão	1	0	1
Total	36	25	61

4.1.4. Localização tumoral

Dos tumores avaliados, apenas 52 tinham localização conhecida.

A localização mais comum foram os membro, 20 animais (38,5%), independente se o membro era torácico ou pélvico.

O segundo local com maior concentração tumoral foi a região genital, já que 8 (15,4 %) apresentavam o tumor nessa região.

A presença tumoral nas regiões ventral e dorsal e os tumores disseminados, animais com múltiplos tumores, também foram bastante comuns, 13% cada um.

Também foram encontrados tumores nas regiões da cabeça e do pescoço. No total foram achados sete localizações tumorais diferentes, além dos nove animais em que a localização não estava descrita (Figura 04).

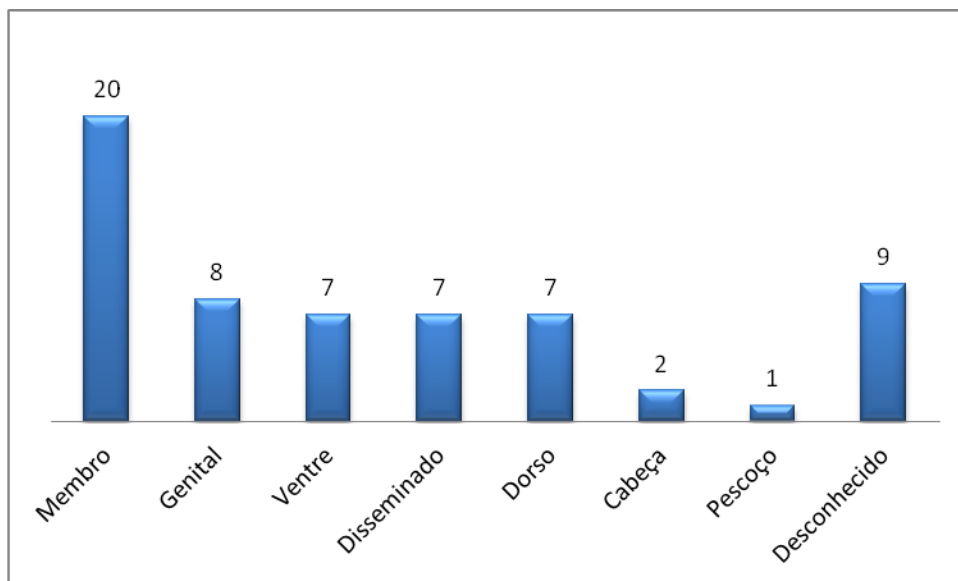


Figura 04: Distribuição da localização tumoral dos mastocitomas analisados.

Nenhuma das variáveis clínicas, como a raça ($\chi^2= 65,937$; gl.=78; $p=0,833$), a idade ($\chi^2= 22,278$; gl.=24; $p=0,563$) e o sexo ($\chi^2= 10,496$; gl.=7; $p=0,109$) (Tabela 08), estão correlacionadas estatisticamente com a localização tumoral.

Tabela 08: Distribuição da localização tumoral de acordo com o sexo.

Localização	Macho	Fêmea	Total
Membro	8	12	20
Ventre	5	2	7
Genital	7	1	8
Disseminado	3	4	7
Dorso	3	4	7
Cabeça	2	0	2
Pescoço	1	0	1
Desconhecido	6	3	9
Total	35	26	61

4.2. AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA

A avaliação histopatológica foi realizada em 61 animais e os tumores foram classificados pelo método de Patnaik; Ehler; Mac Ewen (1984), que diferencia os mastocitomas em graus I, II e III, e pelo método de Kiupel et al. (2011), que diferencia os mastocitomas em baixo ou alto grau.

Pela classificação Patnaik; Ehler; Mac Ewen (1984), dos 61 tumores, seis (9,8%) foram considerados Grau I, 45 (73,8%) Grau II e 10 (16,4%) Grau III (Figura 06, 07 e 08).

A determinação em graus dos tumores pela classificação de Patnaik; Ehler; Mac Ewen (1984) não é correlacionada a nenhuma das variáveis clínicas. A classificação histológica foi independente do sexo ($\chi^2= 0,181$; gl.=2 p=0,913), da raça ($\chi^2= 19,828$; gl.=28; p=0,871), da idade ($\chi^2= 15,348$; gl.=8; p=0,053) e da localização ($\chi^2= 7,565$; gl.=12; p= 0,818).

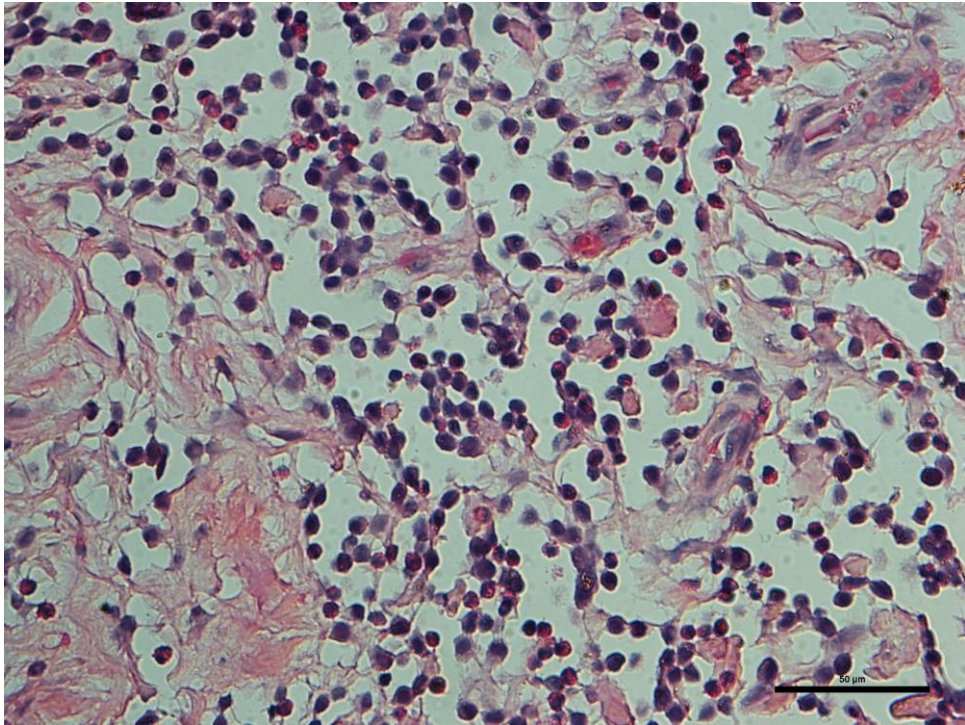


Figura 05: Mastocitoma de cão, grau I (Patnaik). Mastócitos redondos com pouco polimorfismo. Tumor restrito a uma pequena área na derme (HE- 50µm).

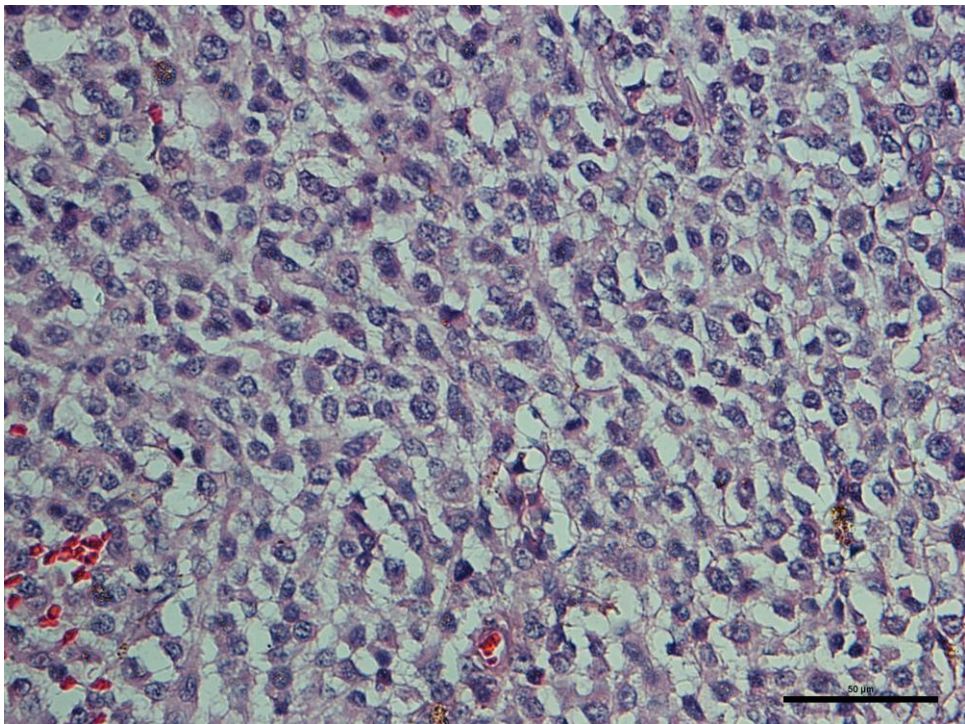


Figura 06: Mastocitoma de cão, grau II (Patnaik). Tumor extenso, com células e núcleos polimórficos (HE- 50µm).

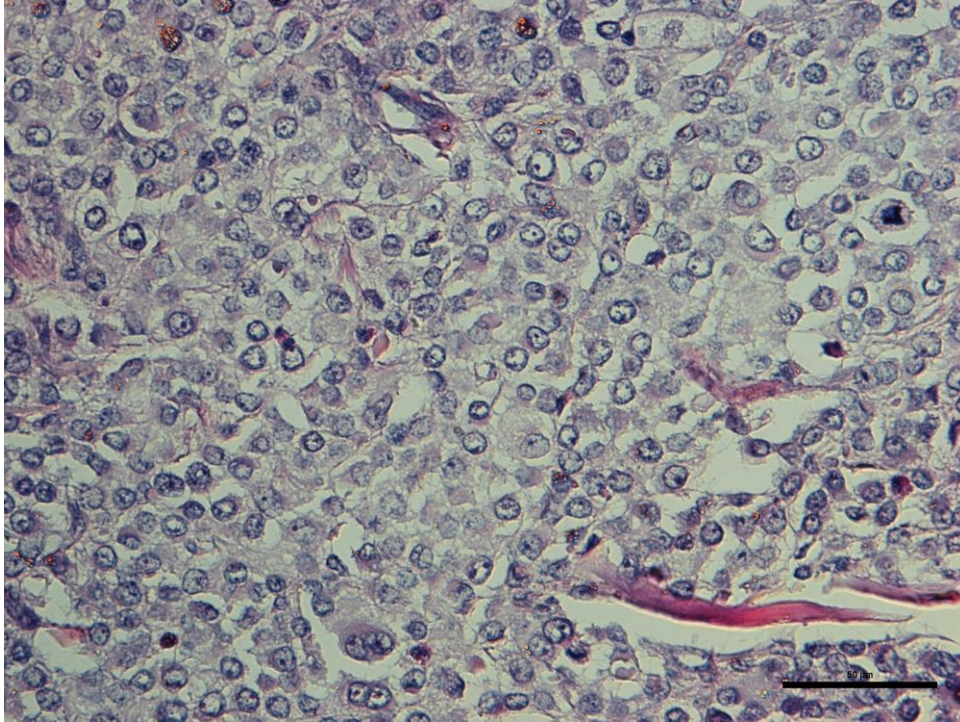


Figura 07: Mastocitoma de cão, grau III (Patnaik). Células e núcleos polimórficos. Presença de núcleos vacuolizados e alguns núcleos bizarros (HxE-50µm).

Pela classificação de Kiupel et al. (2011), dos 61 tumores analisados, 42 (68,85%) foram classificados como baixo grau e 19 (31,15%) como alto grau (Figura 09 e 10).

A determinação em graus dos tumores pela classificação de Kiupel et al. (2011) demonstrou independência do sexo ($\chi^2= 2,45$; gl.=1 p=0,117) e da raça ($\chi^2= 15,299$; gl.=14; p=0,358), mas dependência da idade (Tabela 09) ($\chi^2= 13,041$; gl.=4;p= 0,011), com força de 0,421, numa escala que vai de 0 a 1, e da localização (Tabela 10) ($\chi^2= 13,733$; gl.=6; p=0,033), com força de 0,508, mais forte do que a da idade.

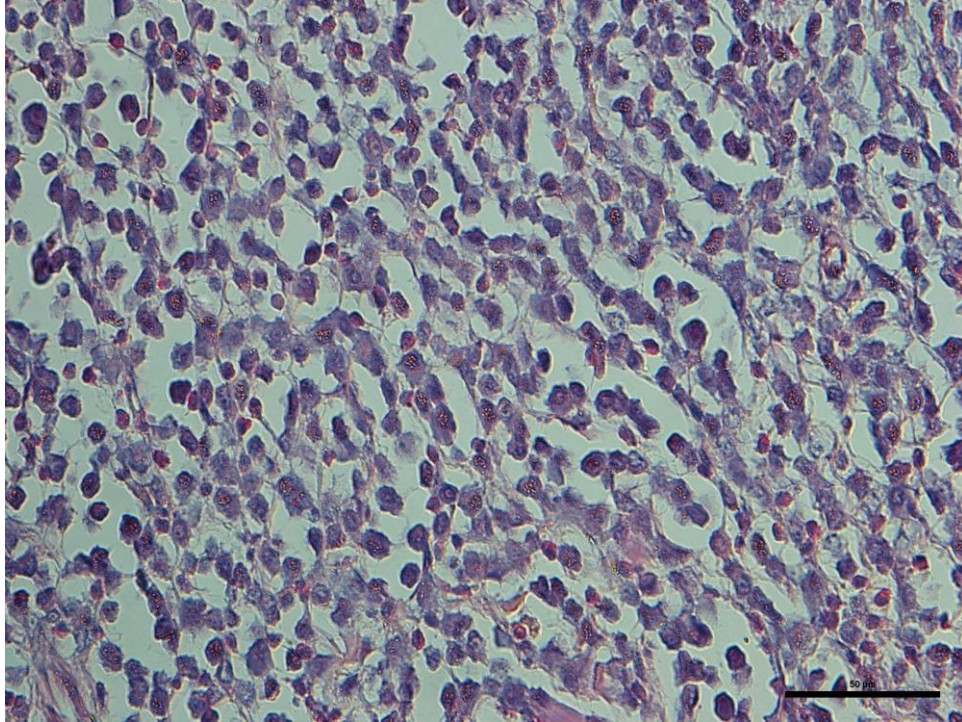


Figura 08: Mastocitoma de cão, baixo grau (Kiupel). Ausência de figuras de mitose, núcleos bizarros ou células multinucleadas. Cariomegalia menor que 10% (HE- 50 μ m).

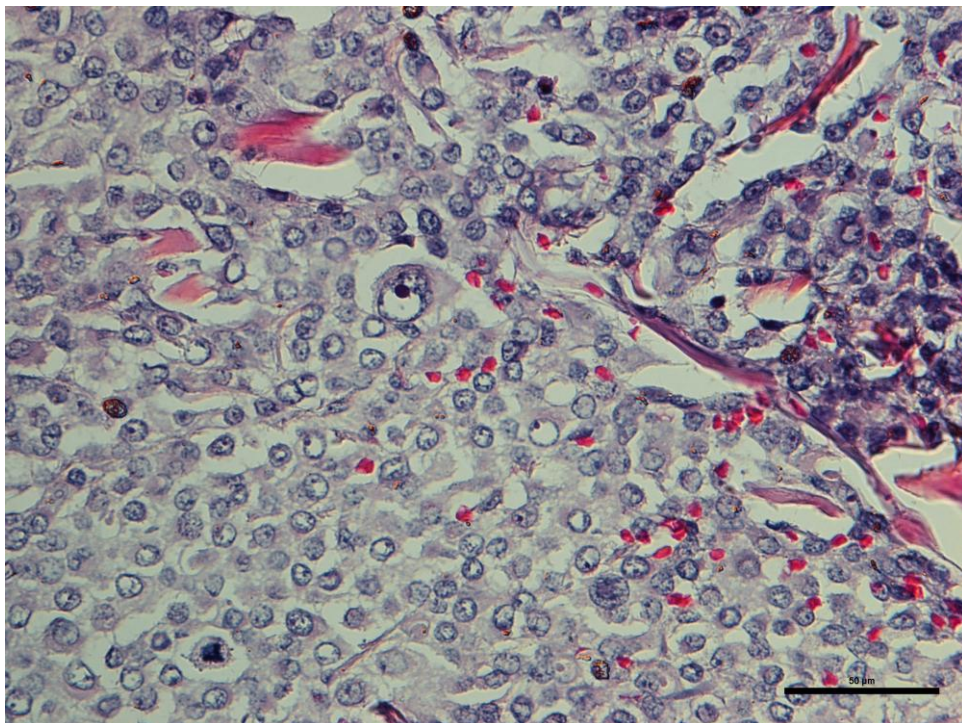


Figura 09: Mastocitoma de cão, alto grau (Kiupel). Presença de algumas figuras de mitose, os diversos núcleos bizarros foram responsáveis pela classificação histológica (HE- 50 μ m).

Tabela 09: Número de animais classificados pelo método de Kiupel et al. (2011) divididos de acordo com a classe etária

		Kiupel		Total
		alto	baixo	
Idade	Entre 0 e 3	1	2	3
	Entre 10 e 12	12	10	22
	Entre 4 e 6	0	10	10
	Entre 7 e 9	4	13	17
	Maior que 12	2	4	6
Total		19	39	58

Tabela 10: Número de animais classificados pelo método de Kiupel et al. (2011) divididos de acordo com os a localização do tumor, excluindo aqueles que não tinham localização conhecida.

		Kiupel		Total
		alto	baixo	
Localização	cabeça	2	0	2
	disseminado	1	6	7
	dorso	2	5	7
	genital	5	3	8
	membro	4	16	20
	pescoço	1	0	1
	ventre	1	6	7
Total		16	36	52

Dos seis animais classificados como grau I, todos foram classificados como baixo grau. Dos 45 animais como grau II, 34 (75,5%) foram classificados como baixo grau e 11 (24,5%) como alto grau. Já os classificados como grau III, dois foram classificados como baixo grau e oito como alto grau (Tabela 11).

As duas classificações demonstraram dependência uma da outra ($\chi^2 = 15,612$; gl.=2, $p < 0,001$), com força de 0,492, ou seja, nem muito forte e nem muito fraca.

Tabela 11: Animais avaliados divididos pelas duas classificações histológicas.

		Patnaik			Total
		I	II	III	
Kiupel	alto	0	11	8	19
	baixo	6	34	2	42
Total		6	45	10	61

A quantidade de infiltrado eosinofílico não foi levada em consideração na classificação tumoral, pois o infiltrado não seguia um padrão que permitisse correlacionar sua concentração com o grau. Foram encontrados tumores indiferenciados com a presença de infiltrado eosinofílico intenso, mas este também foi encontrado em tumores bem diferenciados e pouco agressivos.

Dos 61 mastocitomas avaliados, o eosinófilo esteve ausente em seis (9,8%), infiltração leve em 15 tumores (24,6%), moderada em 25 (41%) e intensa em 15 (24,6%). A divisão dos tumores de acordo com os grau de Patnaik e Kiupel estão nas tabelas 12 e 13, respectivamente.

Tabela 12: Concentração de eosinófilos relacionada com a classificação de Patnaik.

		Patnaik			Total
		I	II	III	
Eosinofilo	ausente	0	4	2	6
	intenso	2	11	2	15
	leve	1	11	3	15
	moderado	3	19	3	25
Total		6	45	10	61

Tabela 13: Concentração de eosinófilos relacionada com a classificação de Kiupel.

		Kiupel		Total
		alto	baixo	
Eosinofilo	ausente	3	3	6
	intenso	4	11	15
	leve	7	8	15
	moderado	5	20	25
Total		19	42	61

A concentração eosinofílica foi independente das variáveis clínicas sexo ($\chi^2=4,42$; gl.=3, p=0,220), idade ($\chi^2=12,265$; gl.=12, p=0,425), raça ($\chi^2=45,428$; gl.=42 p=0,338) e localização ($\chi^2=22,833$; gl.=18, p=0,197). A concentração também foi independente das classificações de Patnaik ($\chi^2=3,025$; gl.=6, p=0,806) e Kiupel ($\chi^2=4,21$; gl.=3 p=0,240).

4.3. AVALIAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA

A análise imunoistoquímica (IHQ) foi realizada com a utilização dos anticorpos anti- CD117 para visualização do c-kit e anti-MIB-1 para avaliar a proliferação.

A visualização do c-kit pode determinar os padrões perimembranoso, citoplasmático focal e citoplasmático difuso. Dos 61 tumores que foram processados pela imunoistoquímica, 29 (47,54%) apresentaram padrão perimembranoso (Figura 10), 14 (22,95%) padrão citoplasmático focal (Figura 11) e 18 (29,51%) padrão citoplasmático difuso (Figura 12).

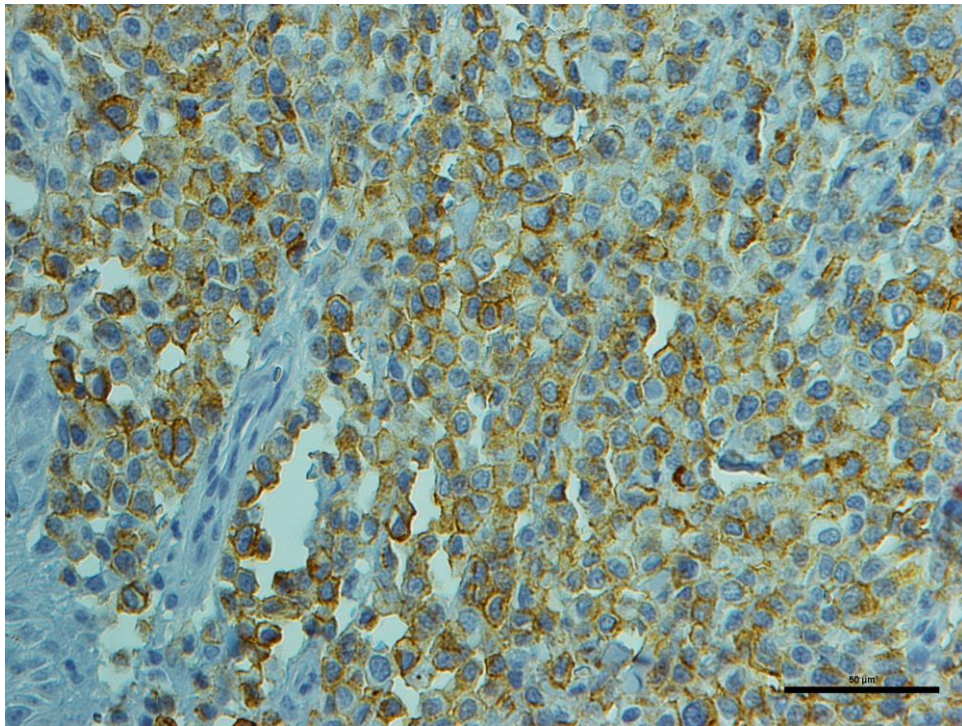


Figura 10: Mastocitoma de cão, padrão KIT do tipo perimembranoso (KIT 1), caracterizado pela marcação da membrana plasmática (IHQ; c-kit-50 μ m).

Ao correlacionar às variáveis clínicas, o padrão KIT de marcação foi independente do sexo ($\chi^2= 0,911$; gl.=2 p=0,634), da idade ($\chi^2= 9,644$; gl.=8; p=0,291) e da raça ($\chi^2= 31,639$; gl.=28; p=0,289), mas dependente da localização (Tabela 14) ($\chi^2= 24,982$; gl.=12; p=0,015), com 0,487 de força.

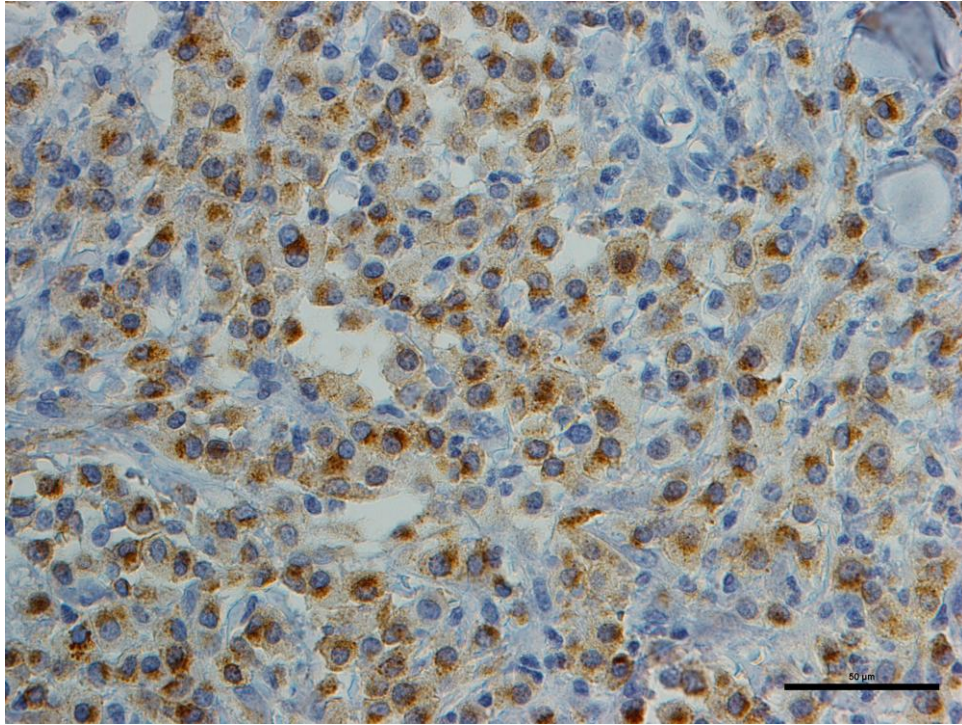


Figura 11: Mastocitoma de cão, padrão KIT do tipo citoplasmático focal (KIT 2) , caracterizado pela marcação de uma pequena região ao lado do núcleo (IHQ; c-kit-50µm).

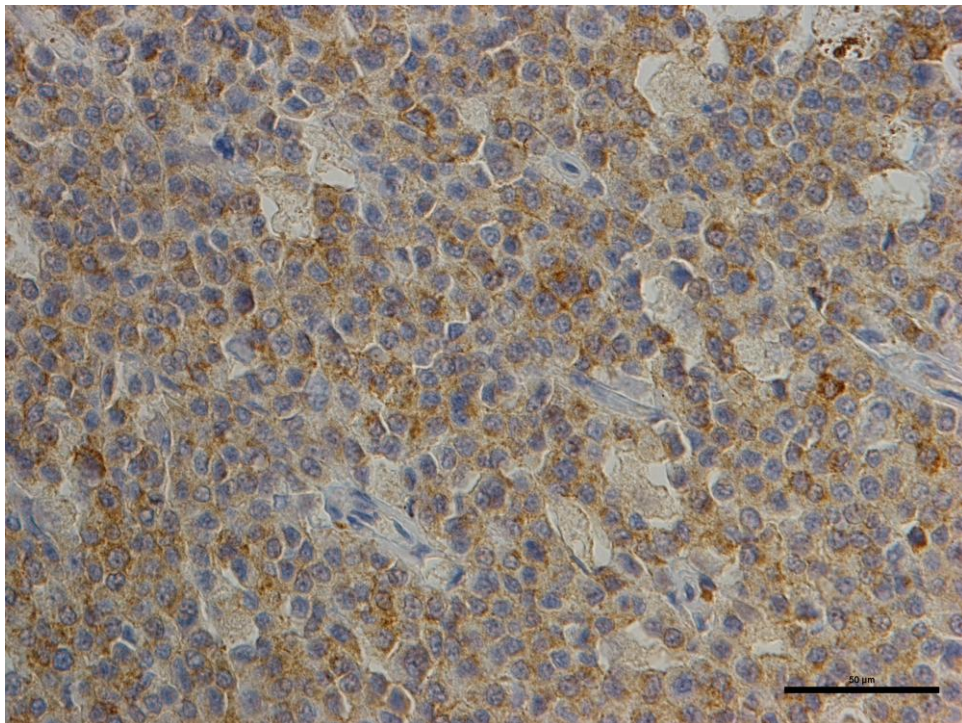


Figura 12: Mastocitoma de cão, padrão KIT do tipo citoplasmático focal (KIT 3), caracterizado pela marcação de todo o citoplasma celular (IHQ; c-kit-50µm).

Tabela 14: Localização dos tumores avaliados relacionados com o padrão KIT, excluindo aqueles que não tinham a localização definida.

	KIT			Total
	difuso	focal	perimembranoso	
Localização				
cabeça	1	1	0	2
disseminado	1	1	5	7
dorso	1	3	3	7
genital	7	0	1	8
membro	4	3	13	20
pescoço	1	0	0	1
ventre	1	3	3	7
Total	16	11	25	52

Dos 29 tumores com padrão perimembranoso, cinco (17,24%) eram de grau I e 24 (82,76%) de grau II. Nenhum com padrão perimembranoso foi classificado como grau III. Já na classificação de Kiupel et al. (2011), dos 29 tumores perimembranosos, 28 (96,5%) eram de baixo grau e um (3,5%) de alto grau.

Dos tumores com padrão citoplasmático focal, um (7,14%) era de grau I, 10 (71,43%) de grau II e 3 (21,43%) de grau III. Pela classificação de Kiupel et al. (2011), dos 14 citoplasmáticos focais, oito (57,14%) eram de baixo grau e 6 (42,86%) de alto grau.

Os tumores citoplasmáticos difusos eram 11 (61,11%) de grau II e sete (38,89%) de grau III. Nenhum desses tumores foi classificado como de grau I pela classificação de Patnaik; Ehler; Mac Ewen (1984). Na classificação de Kiupel et al. (2011), seis (33,33%) eram de baixo grau e 12 (66,67%) de alto grau.

Ao correlacionar a imunoistoquímica à classificação histológica, verificou-se que o padrão KIT de marcação é dependente da classificação de Patnaik; Ehler; Mac Ewen (1984) ($\chi^2= 19,405$; gl.=4; p=0,001) (tabela 15), com força baixa de 0,348 e da classificação de Kiupel et al. (2011) ($\chi^2= 21,859$; gl.=2; p<0,001) (tabela 16), com força de 0,599.

Tabela 15: Distribuição dos mastocitomas pelo método de Patnaik; Ehler; Mac Ewen (1984) relacionados com o padrão KIT.

		KIT			
		difuso	focal	perimembranoso	Total
Patnaik	I	0	1	5	6
	II	11	10	24	45
	III	7	3	0	10
Total		18	14	29	61

Tabela 16: Divisão em graus pelo método de Kiupel et al. (2011) relacionados com o padrão KIT.

		KIT			
		difuso	focal	perimembranoso	Total
Kiupel	alto	12	6	1	19
	baixo	6	8	28	42
Total		18	14	29	61

A imunoistoquímica do ki-67 só foi eficiente em 26 tumores. O Ki-67 é um anticorpo que necessita de material com DNA disponível para a ligação. O material de arquivo mais antigo não tem mais o material genético livre de outras ligações. Por isso, não foi possível a interação com o anticorpo. Destes, 17 (65,38%) eram não proliferativos e nove (34,62%) eram proliferativos (Figura 14 e 15).

O que determina se um tumor é proliferativo ou não é a contagem de células marcadas. A quantidade de células marcadas variou de 0 (nenhuma célula marcada) até 100 células marcadas por campo com a utilização da gradícula. A média de células marcadas foi 14 (Tabela 17).

Tabela 17: Média de células marcadas pelo anticorpo Ki-67, com mínimo, máximo e desvio padrão.

Ki-67 (n)	Média	Mínimo	Máximo	Desvio Padrão
26	14	0	100	20,71

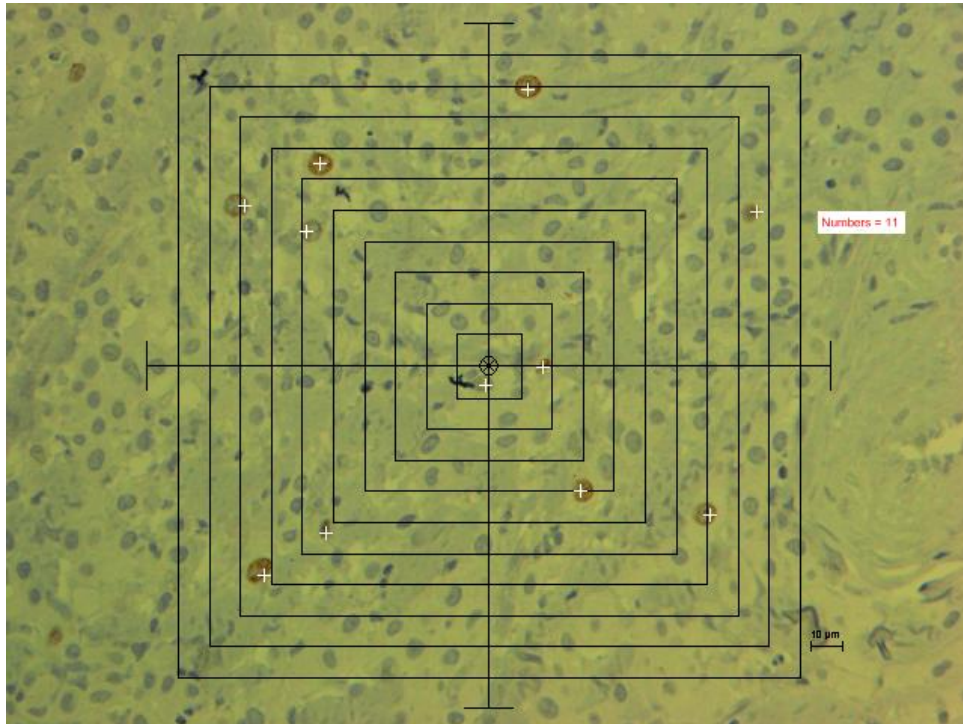


Figura 13: Mastocitoma de cão, não proliferativo com a marcação de 4 células dentro da gradícula (IHQ; Ki-67-10µm).

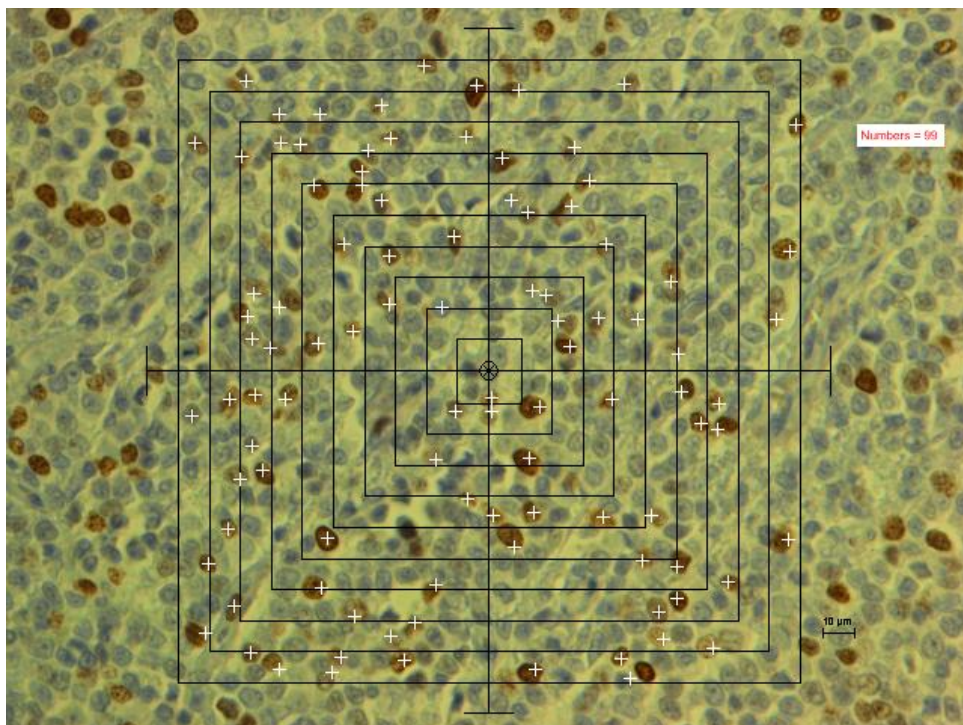


Figura 14: Mastocitoma de cão, proliferativo com a marcação de 99 células dentro da gradícula (IHQ; Ki-67-10µm).

A média de marcação celular por grau histológico foi calculada e pode ser visualizada nas tabelas 18 e 19.

Tabela 18: Média, mínimo, máximo e desvio padrão de marcação do Ki-67 divididos pela classificação histológica em três graus.

Classificação	Número	Média	Mínimo	Máximo	Desvio Padrão
Grau I	2	2,65	0	5,3	3,75
Grau II	17	13,88	0	30	11,40
Grau III	8	19,68	0	100	31,99

Tabela 19: Média, mínimo, máximo e desvio padrão de marcação do Ki-67 divididos por classificação histológica em dois graus.

Classificação	Número	Média	Mínimo	Máximo	Desvio Padrão
Baixo Grau	15	8,31	0	30	10,15
Alto Grau	11	21,75	0	100	27,20

A imunistoquímica com ki-67 é independente do sexo ($\chi^2 = 0,460$; gl.=1; p=0,683), da raça ($\chi^2 = 6,531$; gl.=66; p=0,366) e da idade ($\chi^2 = 1,924$; gl.=3; p=0,588), mas é dependente da localização ($\chi^2 = 12,885$; gl.=5; p=0,024), com força de dependência alta de 0,678 (Tabela 20).

Tabela 20: Localização dos tumores relacionados com a classificação do Ki-67, excluindo aqueles que não tinham a localização definida.

		Ki-67		
		não proliferativo	proliferativo	Total
localização	cabeça	0	2	2
	disseminado	1	0	1
	dorso	3	0	3
	genital	1	3	4
	membro	6	3	9
	ventre	3	0	3
Total		14	8	22

Usando a classificação de Patnaik; Ehler; Mac Ewen (1984), os tumores não proliferativos eram dois (11,8%) de grau I, 10 (58,8%) de grau II e cinco (29,4%) de grau III. Já os tumores proliferativos eram seis de grau II (66,67%) e três (33,33%)

de grau III. Nenhum dos tumores proliferativos teve classificação de grau I (Tabela 21).

Pela classificação de Kiupel et al. (2011), os tumores não proliferativos eram 12 (70,59%) de baixo grau e cinco (29,41%) de alto grau. Os tumores proliferativos eram três (66,67%) de baixo grau e seis (66,67%) de alto grau (Tabela 22).

Tabela 21: Animais avaliados pelo ki-67 divididos de acordo com os graus de Patnaik; Ehler; Mac Ewen (1984).

		Patnaik			Total
		I	II	III	
Ki-67	não proliferativo	2	10	5	17
	proliferativo	0	6	3	9
Total		2	16	8	26

Tabela 22: Animais avaliados pelo ki-67 divididos de acordo com os graus de Kiupel et al (2011).

		Kiupel		Total
		alto	baixo	
Ki-67	não proliferativo	5	12	17
	proliferativo	6	3	9
Total		11	15	26

A marcação com o anticorpo anti Ki-67 não demonstrou correlação significativa com nenhuma das classificações histológicas. Ela foi independente da classificação de Patnaik ($\chi^2 = 1,787$; gl.=2; p=0,409) e da classificação de Kiupel ($\chi^2 = 3,371$; gl.=1; p=0,066).

Comparando as duas análises imunoistoquímicas, oito (47,06%) tumores não proliferativos eram do tipo perimembranoso, cinco (29,41%) citoplasmáticos focais e quatro (23,53%) citoplasmáticos difusos. Já os proliferativos, um (11,11%) era do tipo perimembranoso, três (33,33%) eram citoplasmáticos focais e cinco (55,56%) eram citoplasmáticos difusos.

Os dois anticorpos utilizados na imunoistoquímica são independentes entre si ($\chi^2 = 4,312$; gl.=2; p=0,116).

A concentração de eosinófilo demonstrou independência do padrão KIT ($\chi^2 = 6,997$; gl.=6; p=0,321), mas dependência do Ki-67 ($\chi^2 = 9,062$; gl.=3; p=0,028), com força de 0,527 (tabela 23).

Tabela 23: Concentração de eosinófilos divididos pelo padrão de marcação do Ki-67.

		Ki-67		
		não proliferativo	proliferativo	Total
Eosinófilo	ausente	1	1	2
	intenso	6	0	6
	leve	5	1	6
	moderado	5	7	12
Total		17	9	26

Ao juntar as duas classificações, agrupando os mastocitomas em seis graus, a histologia permaneceu dependente do padrão KIT ($\chi^2= 32,973$; gl.=8; $p<0,001$) (Tabela 24), com força de 0,453, mas independente do anticorpo Ki-67 ($\chi^2= 4,360$; gl.=4; $p=0,359$) (Tabela 25).

Ao comparar a classificação histológica, com seis graus de diferenciação, com as variáveis clínicas, esta demonstrou independência da localização ($\chi^2= 24,375$; gl.=24; $p=0,440$), da idade ($\chi^2= 25,807$; gl.=16; $p=0,057$) e da raça ($\chi^2= 37,693$; gl.=56; $p=0,971$), mas dependente do sexo ($\chi^2= 10,123$; gl.=4; $p=0,038$) (Tabela 26), com força de 0,372. Essa dependência não foi verificada em nenhuma outra correlação com as classificações histológicas.

Tabela 24: Avaliação histológica, utilizando as duas classificações, relacionada com o padrão KIT.

		KIT			
		difuso	focal	perimembranoso	Total
Histologia	I alto	0	0	0	0
	I baixo	0	1	5	6
	II alto	6	4	1	11
	II baixo	5	6	23	34
	III alto	6	2	0	8
	III baixo	1	1	0	2
Total		18	14	29	61

Tabela 25: Avaliação histológica, utilizando as duas classificações, relacionada com a marcação do Ki-67.

		Ki-67		
		não proliferativo	proliferativo	Total
Histologia	I alto	2	0	0
	I baixo	2	0	2
	II alto	2	3	5
	II baixo	8	3	11
	III alto	4	3	7
	III baixo	1	0	1
Total		17	9	26

Tabela 26: Avaliação histológica, utilizando as duas classificações, relacionada com o sexo.

		Sexo		
		Fêmea	Macho	Total
Histologia	I baixo	2	4	6
	I alto	0	0	0
	II baixo	18	16	34
	II alto	1	10	11
	III baixo	0	2	2
	III alto	4	4	8
Total		25	36	61

Utilizando uma variável das duas classificações histológicas, que divide apenas os tumores de grau II em baixo e alto, esta se manteve dependente do padrão KIT ($\chi^2 = 32,526$; gl.=6; $p < 0,001$) (Tabela 27), com força de 0,446, mas independente do Ki-67 ($\chi^2 = 3,336$; gl.=3; $p = 0,343$) (Tabela 28). Ou seja, não há diferença significativa entre as classificações.

Tabela 27: Divisão em graus, subdividindo o grau II em alto e baixo, relacionados com o padrão KIT.

		KIT			
		difuso	focal	perimembranoso	Total
Histologia	I	0	1	5	6
	II alto	6	4	1	11
	II baixo	5	6	23	34
	III	7	3	0	10
Total		18	14	29	61

Tabela 28: Divisão em graus, subdividindo o grau II em alto e baixo, relacionados com a marcação do Ki-67.

		Ki-67		
		não proliferativo	proliferativo	Total
Histologia	I	2	0	2
	II alto	2	3	5
	II baixo	8	3	11
	III	5	3	8
Total		17	9	26

Ao testar esta nova classificação, a histologia demonstrou independência da localização ($\chi^2= 18,972$; gl.=21; $p=0,587$), da raça ($\chi^2= 35,323$; gl.=42; $p=0,757$) e do sexo ($\chi^2= 7,753$; gl.=3; $p=0,051$), mas dependência da idade ($\chi^2= 24,174$; gl.=12; $p=0,019$) (tabela 29), com força de 0,334, diferente do observado nas outras classificações.

Tabela 29: Divisão em graus, subdividindo o grau II em alto e baixo, relacionados com a idade.

		Histologia				
		I	II alto	II baixo	III	Total
Idade	Entre 0 e 3	0	1	2	0	3
	Entre 10 e 12	0	7	8	7	22
	Entre 4 e 6	1	0	9	0	10
	Entre 7 e 9	4	2	9	2	17
	Maior que 12	1	1	3	1	6
Total		6	11	31	10	58

4.4. PCR

Dos 40 tumores que foram analisados pela PCR, não foi possível realizar o exame em oito deles por causa da indisponibilidade do material genético nos blocos de arquivo. Dos 32 tumores analisados, apenas três apresentaram mutação e elas eram do exon 11, o que representa 9,4% dos tumores analisados.

As mutações encontradas foram duplicações em tandem no exon 11 do domínio justamembranas, que podem ser observadas na Figura 15 como uma banda mais alta, sobreposta a banda normal presente em cães sem mutação.

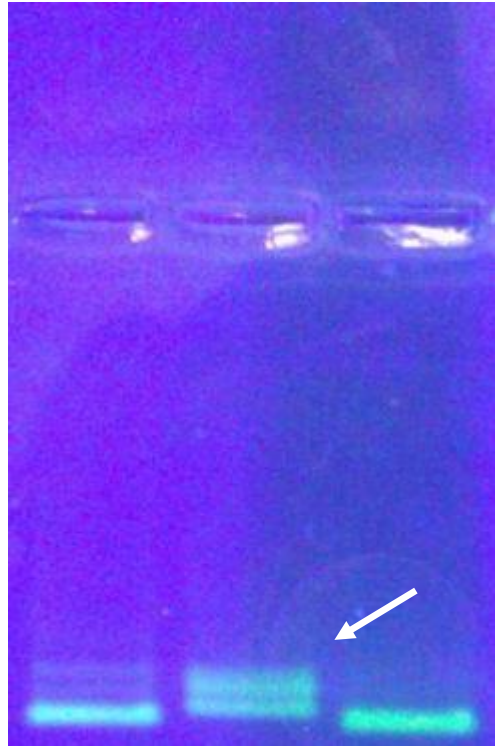


Figura 15: Gel de agarose a 4%, corado com brometo de etídio para permitir a visualização do exon 11 da PCR de mastocitoma de cão, demonstrando dois tumores sem mutação observados pelas bandas únicas e uma com uma banda sobreposta (seta) a banda comum (central) indicando o material genético com mutação.

Uma mutação foi encontrada em um macho, entre 7 e 9 anos, sem raça definida e localizado na cabeça. A segunda mutação também foi encontrada em um macho, entre 7 e 9 anos, Boxer e com localização tumoral desconhecida. A terceira mutação foi encontrada em uma fêmea, entre 10 e 12 anos, Pug e com tumor em membro.

A presença da mutação demonstrou independência das variáveis sexo ($\chi^2=0,25$; gl.=1; $p=0,875$), idade ($\chi^2=2,919$; gl.=4; $p=0,571$), raça ($\chi^2=8,407$; gl.=10; $p=0,589$) e localização ($\chi^2=7,708$; gl.=5; $p=0,173$).

Dos três tumores com mutação, dois eram de grau II (tumores com diferenciação intermediária) e um era de grau III (tumores indiferenciados). Na

classificação de Kiupel et al. (2011), dois dos tumores mutantes eram de alto grau e um de baixo grau.

A presença da mutação também não demonstrou dependência das análises histopatológicas, nem pelo método de Patnaik; Ehler; Mac Ewen (1984) ($\chi^2= 0,675$; gl.=2; p=0,713) (Tabela 30) e nem pelo método de Kiupel et al (2011) ($\chi^2= 0,526$; gl.=1; p=0,468) (Tabela 31). O PCR foi independente da concentração de eosinófilos ($\chi^2= 6,085$; gl.=3; p=0,108).

Tabela 30: Número de animais com e sem mutações no resultado da PCR divididos de acordo com a classificação de Patnaik; Ehler; Mac Ewen (1984).

		Patnaik			Total
		I	II	III	
PCR	mutante	0	2	1	3
	normal	3	19	7	29
Total		3	21	8	32

Tabela 31: Número de animais com e sem mutações no resultado da PCR divididos de acordo com a classificação de Kiupel et al (2011).

		Kiupel		Total
		alto	baixo	
PCR	mutante	2	1	3
	normal	13	16	29
Total		15	17	32

Utilizando a variável da classificação histopatológica, dividindo o grau II em baixo e alto, a presença da mutação foi independente da classificação histológica ($\chi^2= 0,805$; gl.=3; p=0,848) (Tabela 32).

Tabela 32: Divisão em graus, subdividindo o grau II em alto e baixo, relacionados com a presença de mutação verificada pelo PCR.

		PCR		Total
		mutante	normal	
Histologia	I	0	3	3
	II alto	1	7	8
	II baixo	1	12	13
	III	1	7	8
Total		3	29	32

Em relação à imunohistoquímica, dos três tumores com mutação, dois tinham padrão KIT aberrante (um citoplasmático focal e um citoplasmático difuso) e um tinha padrão KIT perimembranoso (Tabela 33). Todos os tumores mutantes eram proliferativos na avaliação do ki-67 (Tabela 34).

Tabela 33: Número de animais com e sem mutações no resultado da PCR divididos de acordo com o padrão KIT.

		KIT			Total
		difuso	focal	perimembranoso	
PCR	mutante	1	1	1	3
	normal	12	6	11	29
Total		13	7	12	32

Tabela 34: Número de animais com e sem mutações no resultado da PCR divididos de acordo com a classificação do Ki67.

		Ki-67		Total
		não proliferativo	proliferativo	
PCR	mutante	0	3	3
	normal	13	5	18
Total		13	8	21

A presença de mutação demonstrou independência do padrão KIT ($\chi^2= 0,236$; gl.=2; p=0,889), mas dependência do resultado encontrado no Ki-67 ($\chi^2= 6,640$; gl.=1; p=0,010), com força de dependência média de 0,520.

5. DISCUSSÃO:

O mastocitoma é um tumor frequente na rotina ambulatorial, mas ainda não é possível prever o seu comportamento apenas com os achados da clínica. A variação individual ainda é muito importante na resposta ao tratamento.

Por utilizar material de arquivo, não foi possível verificar a sobrevivência e o índice de recidivas dos animais do estudo. Porém, ao correlacionar as diversas variáveis, objetivou-se verificar se os resultados laboratoriais podem ajudar a prever o comportamento do mastocitoma.

No presente estudo, foram encontrados mais machos do que fêmeas com mastocitoma, como relatado por Kiupel et al., 2005; Costa-Casagrande et al., 2008; Furlani et al., 2008; Oliveira, 2008; Navega, 2011, mas diferente de Simoes; Schoning; Butine (1994), Séguin et al. (2001) e Berlato et al. (2013) que descreveram um número maior de fêmeas afetadas. Não houve diferença significativa entre os sexos que indique predisposição ao desenvolvimento do mastocitoma (LONDON; SEGUIN, 2003; PREZIOSI; SARLI; PALTRINIERI, 2007; COSTA-GASAGRANDE et al. 2008).

Apenas a classificação histológica em seis graus de diferenciação apresentou relação com o sexo. Porém, como na literatura disponível não há qualquer relação entre as classificações histológicas e o sexo e a classificação em seis graus não demonstrou qualquer valor prognóstico, pode-se afirmar que o sexo não é uma variável importante na avaliação do tumor.

A faixa de idade dos animais afetados foi muito ampla, variando entre 2 e 18 anos, similar à descrita em literatura (COSTA-GASAGRANDE et al. 2008 FURLANI et al., 2008; ROMANSIK et al., 2007; BERLATO et al., 2013). Os animais afetados tinham em média nove anos de idade.

Segundo O'Keefe (1990), os animais idosos parecem ser os mais afetados, o que condiz com o nosso estudo, no qual os animais idosos representaram 73%. Essa predisposição ao aparecimento tumoral está relacionada à longevidade dos animais, que permanecem expostos à agente cancerígenos por mais tempo (FURLANI et al. 2008).

London; Seguin (1999) relataram que os animais com nove anos são os mais afetados. No presente estudo, os animais nessa faixa etária foram bastante acometidos (27,8%), mas os animais entre 10 e 12 anos representaram 36% dos casos de mastocitoma.

No estudo de Bostock (1986); Thamm; Vail (2001); Séguin et al. (2001), foram citados animais com mastocitoma de um ano e meio. Não foram encontrados animais jovens (menores que dois anos) com mastocitoma no presente estudo.

Há correlação significativa entre os animais idosos e a classificação histológica. A classificação de Kiupel et al. (2011) e a classificação usando quatro graus de diferenciação, foram dependentes da idade. Apenas 31% dos animais idosos apresentaram o padrão perimembranoso na marcação do c-kit, considerado o padrão com melhor prognóstico (WEBSTER et al., 2004; WEBSTER et al., 2007). Todos os animais que deram resultado proliferativo na análise do ki-67 e com mutação genética eram idosos, o que concorda com Kiupel et al. (2005) que associaram os animais idosos a um número maior de mutações.

Porém, os animais idosos demonstraram maior correlação com os tumores de baixo grau, relacionados com melhor prognóstico. Com essa variação da dependência dos resultados, verifica-se que a idade não é um bom fator prognóstico, uma vez que há uma grande diferença do comportamento esperado de acordo com a variável analisada.

Em relação à raça, os animais sem raça definida e os animais das raças Boxer e Labrador foram aquelas com maior representatividade e esse resultado é similar ao descrito em literatura (KIUPEL et al., 2005; MULLINS et al., 2006; COSTA-CASAGRANDE, et al. 2008; BERLATO et al 2013), variando apenas a ordem em que as raças foram encontradas. O maior número de indivíduos sem raça definida encontrado pode ser justificado pelo grande número de atendimento desses animais no Hospital Veterinário da UENF.

Conforme citado em literatura (THAMM; VAIL, 2001; LONDON; SEGUIN, 2003), entre os animais de raça definida, os da raça Boxer representaram 30,4% e 23% do conjunto de animais avaliados. Segundo Misdorp (1996), essa maior ocorrência é devido a presença de fatores endógenos. Segundo London et al., (1999), outras raças descendentes do Bulldog (Boston Terrier e Bulldog Inglês)

também apresentam predisposição genética, mas não foram observadas no presente estudo.

Ainda segundo Thamm; Vail (2001), mesmo com a grande frequência de mastocitomas em Boxers, geralmente estes são de grau intermediário ou baixo. Este dado foi verificado no presente trabalho, em que, dos 14 animais avaliados, 10 (71,5%) eram de grau I ou II e de baixo grau.

Segundo Murphy et al. (2006), os Labradores tendem a ter tumores mais agressivos. O presente estudo corrobora com os autores, uma vez que os sete animais afetados eram de grau II, quatro deles eram de alto grau e cinco tinham padrão KIT citoplasmático.

A raça Pinscher só foi citada uma vez em literatura (COSTA-CASAGRANDE et al., 2008) como mais acometida, mas no presente trabalho ela também apresentou uma alta incidência de mastocitomas. Este fato pode ter ocorrido pelo grande número de animais dessa raça na população animal brasileira.

A região mais frequente do aparecimento do mastocitoma é o tronco (SÉGUIN, et al., 2001; KIUPEL et al., 2005; MULLINS et al., 2006; FULCHER et al., 2006; FURLANI et al., 2008), mas, nos nossos estudos, o local mais frequente de aparecimento tumoral foram os membros (38,4%). A região do tronco (somando as regiões do ventre e do dorso) representou 26,9% dos locais acometidos, aparecendo em segundo lugar.

A localização tumoral é a variável clínica que está mais relacionada ao prognóstico, sendo a classificação de Kiupel, o padrão KIT e o ki-67 dependentes da localização.

Segundo Govier (2003) e London; Seguin (2003), a localização inguinal, perineal, prepucial e oral, assim como regiões muco-cutâneas, estão relacionadas a um pior grau histológico. Kiupel et al (2005) descreveram que os tumores na cabeça e no pescoço aumentam o risco do desenvolvimento de metástase. No presente estudo, dos onze animais com localização genital, na cabeça e no pescoço, todos tiveram tumor de grau intermediário a indiferenciado (grau II-III), apenas dois eram de baixo grau e todos tinham padrão KIT citoplasmático. Esses dados corroboram com a literatura (WEBSTER et al., 2004; WEBSTER et al., 2007), uma vez que, animais com mastocitomas com graus II e III e padrão citoplasmático estão relacionados aos piores prognósticos.

Por outro lado, os mastocitomas nos membros tinham comportamento menos agressivo, pois 80% deles eram de baixo grau e 65% tinham padrão KIT perimembranoso. Esses dados corroboram com Forrest (1997), que relatou que os mastocitomas nos membros tinham comportamento benigno, e com Oliveira (2008), que classificou a maioria dos mastocitomas no membro como de grau I.

A localização disseminada representou 13,4% de todas as localizações encontradas, o que condiz com Govier (2003), Mullins et al. (2006) e Furlani et al. (2008) que citaram entre 9 e 14% dos animais com tumores múltiplos. O papel da localização múltipla não está definido já que há autores que relatam um pior prognóstico associado (FURLANI et al., 2008). No presente estudo, os tumores disseminados apresentavam graus baixos e padrão perimembranoso, o que corrobora com os autores (THAMM; MAULDIN; VAIL, 1999; SEGUIN et al., 2001; THAMM; VAIL, 2001) que não os associam a piores prognósticos.

Kiupel et al. (2005) citaram que os animais idosos e da raça Boxer são predispostos ao desenvolvimento dos tumores múltiplos. A associação foi confirmada, pois em torno de 50% dos tumores múltiplos eram em indivíduos idosos e/ou Boxers. A predisposição de animais idosos ocorre por um acúmulo maior de mutações no DNA ao longo da vida (KIUPEL et al., 2005). Mullins et al. (2006) relataram que as fêmeas tem maior predisposição para múltiplos tumores, o que não foi verificado no presente estudo porque a maioria dos tumores disseminados eram em machos. Não há relatos da presença de mutação associada com a presença de tumores múltiplos, mas no presente trabalho, um dos animais mutantes tinha tumor disseminado.

Dos tumores analisados, seis foram classificados como de grau I (9,8%). A porcentagem de animais com grau I foi bem menor do que a descrita em literatura (SIMOES; SCHONING; BUTINE, 1994; LONDON; SEGUIN, 2003; COSTA-CASAGRANDE et al., 2008; FURLANI et al., 2008; BERLATO et al., 2013), que varia entre 20 e 30%. Essa variação pode ter ocorrido pelo serviço do Hospital Veterinário ser direcionado a pessoas de baixa renda, que demoram mais para levar seus animais ao atendimento e, com essa demora, o tumor pode ter se indiferenciado com o tempo.

Os tumores classificados como de grau II foram os mais frequentes (73,8%), conforme literatura (SIMOES; SCHONING; BUTINE 1994; LONDON; SEGUIN, 2003;

COSTA-CASAGRANDE et al., 2008; FURLANI et al., 2008; BERLATO et al., 2013). Essa maior concentração do grau II ocorre porque há uma tendência dos patologistas a classificarem como grau II os tumores que estão no limite entre o grau I e o grau II. Existe uma variação muito grande entre observadores para determinar um tumor como grau I ou grau II (KIUPEL et al., 2011; GARRET, 2014). Isso acontece, principalmente, pela avaliação subjetiva de cada um dos parâmetros indicados por Patnaik; Ehler; Mac Ewen (1984) para a diferenciação dos graus.

A classificação de Patnaik; Ehler; Mac Ewen (1984) não foi dependente de nenhuma das variáveis clínicas avaliadas, o que significa que o sexo, a idade, a raça e o local não interferem no grau do mastocitoma.

Pela classificação de Kiupel et al. (2011), 68,15% foram classificados como de baixo grau e 31,15% como de alto grau. Esse percentual é similar ao encontrado por Giantin et al (2012) e Sabbattini et al.(2015), mas os tumores de baixo grau foram encontrados em maior número que o descrito por Takeuchi et al. (2013).

A classificação de Kiupel é independente do sexo e da raça, mas dependente da idade e da localização. Pelos dados analisados, parece que quanto mais velho o animal, maior a chance de tumor baixo grau e certas localizações estão mais relacionadas a tumores de baixo grau e outras com tumores de alto grau, conforme citado anteriormente.

As duas classificações histológicas são dependentes uma da outra, com alta significância. Ou seja, para cada grau de Patnaik, deve-se esperar um determinado grau de Kiupel. Assim, espera-se que os tumores de grau I sejam classificados como de baixo grau e os de grau III como de alto grau. Novamente, o grande problema são os tumores de grau II, considerados como de grau intermediário, nos quais é difícil prever o comportamento. Pensando nisso, muitos patologistas decidiram usar as duas classificações em seus laudos, até que seja definida aquela com melhores resultados (SABBATTINI et al., 2015).

Para tentar prever o comportamento do tumor de grau II, foram usadas duas classificações diferentes no presente estudo, uma dividindo os tumores em seis graus e uma dividindo apenas os tumores de grau II em baixo ou alto grau. Embora essas classificações sejam dependentes das variáveis sexo e idade, respectivamente, elas não demonstraram valor prognóstico. O resultado das duas classificações juntas foi inferior ao que utiliza apenas o método de Kiupel, o que

condiz com Vascellari et al. (2012), Takeuchi et al. (2013) e Sabbattini et al. (2015) que relataram que a classificação de Kiupel é superior que a de Patnaik para determinar o prognóstico.

A eosinofilia associada ao tumor é comum em mastocitomas (SIMOES; SCHONNING; BUTINE, 1994; GROSS et al 2005; OLIVEIRA, 2008) e estava presente em 90% dos tumores. Não foi verificada relação da concentração de eosinófilos presentes no campo tumoral e o grau histológico. A ausência de relação entre a concentração de eosinófilos e o grau tumoral já foi relatada em literatura (OLIVEIRA, 2008). Gross et al. (2005) relataram que a eosinofilia diminui a medida que aumenta a anaplasia, porém alguns tumores indiferenciados do presente estudo apresentavam infiltrado intenso de eosinófilos.

Oliveira (2008) relatou que, em seus estudos, todos os tumores grau III tinham infiltrado eosinofílico, mas alguns tumores de grau I e II não. No presente estudo, apenas os tumores de grau II apresentavam ausência de eosinófilos. Todos os tumores de grau I apresentavam pelo menos o infiltrado leve.

A concentração de eosinófilos não estava associada com nenhum dos padrões KIT, mas apenas o padrão citoplasmático focal tinha eosinófilos ausentes.

Não há relatos em literatura que explique a correlação entre a concentração de eosinófilos e a marcação do Ki-67. Porém, nenhum tumor proliferativo teve concentração intensa de eosinófilos, o que pode indicar que quanto mais proliferativo o tumor, menor a quimiotaxia de eosinófilos.

Dos 61 tumores avaliados para o anti-KIT, o padrão perimembranoso representou quase 50% dos casos avaliados (46,54%). Essa porcentagem é bem maior do que a descrita em literatura (KIUPEL et al, 2004; PREZIOSI; SARLI; PALTRINIERI, 2007), mas similar à descrita por Gil da Costa et al (2007).

O padrão KIT foi independente das variáveis clínicas, exceto a localização. É possível verificar a associação ao constatar que a maioria das neoplasias em membro era do tipo perimembranoso, associado a melhores prognósticos, enquanto a localização genital estava associada ao padrão KIT citoplasmático difuso.

Foi possível verificar que há associação entre o padrão KIT e a classificação de Patnaik, conforme citado por Webster et al. (2006) e Gil da Costa et al (2007). Todos os mastocitomas classificados como grau III tinham padrão KIT citoplasmático e a maior parte dos classificados como grau I (83%) eram perimembranosos. Essa

correlação estatística significativa também foi verificada por Reguera et al. (2000), que descreveram uma relação inversa entre a diferenciação celular e a expressão de c-kit. Logo, quanto mais diferenciado o tumor, menor a chance do padrão KIT sofrer modificação.

Preziosi; Sarli; Paltrinieri (2007) relataram, em seu trabalho, uma forte associação entre os tumores de grau I com o padrão citoplasmático difuso e os de grau III com o padrão citoplasmático focal. Essas informações não foram verificadas no presente estudo e nem no estudo de Reguera (2000), nos quais os tumores de grau I estavam associados ao padrão perimembranoso e os de grau III estavam associados ao padrão citoplasmático difuso.

Segundo Costa-Casagrande et al. (2013), há uma correlação entre a localização aberrante do KIT com o aumento da atividade proliferativa do mastocitoma, embora eles não tenha encontrado associação entre o padrão KIT e a classificação histológica.

Kiupel et al (2005) relataram que os padrões citoplasmáticos estão associados a menor sobrevida e menor tempo de recorrência e que, quanto mais agressiva a classificação tumoral, maior a chance de observarmos o padrão citoplasmático difuso. O presente estudo corrobora com esses resultados, pois todos os tumores classificados como grau III tinham o padrão citoplasmático.

O padrão KIT também demonstrou dependência da classificação histológica de Kiupel com maior significância do que a calculada para a classificação de Patnaik, o mesmo ocorreu no estudo de Giantin et al (2012).

Giantin et al (2012) citaram que os tumores de alto grau estavam associados ao padrão citoplasmático difuso e os tumores de baixo grau estavam associados aos padrões citoplasmático focal e perimembranoso. No presente estudo, os de baixo grau estavam mais associados ao padrão perimembranoso (66,7%) e os de alto grau associados ao padrão citoplasmático difuso (63%), porém o padrão citoplasmático focal demonstrou maior associação aos tumores de alto grau (31,5%) do que aos de baixo grau (19%). Isso corrobora com os estudos de Giantin et al (2012) que verificaram não haver diferença significativa na sobrevida dos cães com os dois padrões citoplasmáticos.

O padrão KIT é considerado um forte fator de prognóstico dos mastocitomas caninos, especialmente a associação entre o padrão citoplasmático e o aumento da

proliferação celular e do grau histológico (ZEMKE et al, 2002; KIUPEL et al, 2005; WEBSTER et al, 2006; GIANTIN et al. 2012) e a um comportamento mais agressivo (PATRUNO et al, 2012). O presente estudo demonstrou forte associação entre o padrão KIT e a classificação histológica.

A média de marcação celular do Ki-67 foi 14 e o número de células marcadas variou de nenhuma a 100 células em um mesmo campo. Esses dados são similares aos descritos por Webster et al (2006).

Vascellari et al (2012) relataram médias de marcação próximas entre os graus I e II, com marcação de grau III próxima ao limite que indica proliferação. No presente estudo, a média de marcação dos tumores de grau I era muito menor do que a de grau II, mas a marcação de grau III também estava próxima do limite. As médias de marcação para a classificação de Kiupel foi maior do que a descrita em literatura (VASCELLARI et al., 2012)

A proliferação tumoral demonstrou independência do sexo, da raça e da idade, mas dependência da localização, com alta força de associação. Foi possível observar que os tumores no membro, associados à melhores prognósticos, eram, em sua maioria (67%), não proliferativos, enquanto os de cabeça e genital, associados a piores prognósticos, eram proliferativos (83,3%).

Strefezzi et al (2010) relataram correlação significativa entre o número de células marcadas pelo ki-67 e a classificação de Patnaik. No presente estudo, o número de células marcadas pelo anti ki-67 não demonstrou relação com nenhuma das classificações histológicas.

Scase et al (2006) e Ozaki et al (2007) relataram que a marcação do Ki-67 pode ser usada para subdividir o grau II, mas não foram observadas no presente estudo diferenças significativas entre os tumores proliferativos e não proliferativos de grau II que possam aumentar a associação com o comportamento tumoral, da mesma maneira que Strefezzi et al (2010) que não encontraram diferenças na sobrevida desses dois grupos.

Embora não tenha existido dependência entre as variáveis, é possível observar que nenhum tumor de grau I foi considerado como proliferativo. Mas os tumores de grau II e III não seguem a prerrogativa de que tumores mais agressivos deveriam ser proliferativos. Pela classificação de Kiupel, a maior parte dos tumores

não proliferativos eram de baixo grau e os proliferativos eram de alto grau, mas não há significância estatística.

Scase et al (2006) descreveram que existiam mais tumores de grau I associados a tumores proliferativos do que de grau II. No presente estudo, há uma maior porcentagem de tumores de grau II proliferativos, mesmo comparando aos de grau III.

Ao contrário do estudo de Gil da Costa et al (2007), não foi encontrada correlação significativa entre os dois anticorpos, embora seja possível observar uma leve tendência de tumores não proliferativos com padrão perimembranoso e tumores proliferativos com padrão citoplasmático.

Ao agrupar as duas classificações histológicas, dividindo cada grau de Patnaik em baixo ou alto, o padrão KIT permaneceu dependente da classificação histopatológica e o ki-67 permaneceu independente.

Ao realizar uma nova disposição, agrupando as duas classificações histológicas, mas dessa vez subdividindo o grau II em baixo e alto grau, o KIT permaneceu dependente e o ki-67 independente da histopatologia.

A frequência da mutação encontrada no presente estudo foi de 9,4%, similar à encontrada por Zemke et al. (2002), mas bem menor do que outras citadas por London et al (1999) e Jones et al. (2004), de quase 50%, que pode ser explicada por só terem sido usados animais de grau II e III nos estudos.

Segundo Webster et al. (2006), a porcentagem de mutações encontrada deve ser de 9-15% em todos os mastocitomas e pode ser de até 50% em cães com mastocitomas indiferenciados. A porcentagem de tumores indiferenciados foi de mais de 90%, mas apenas 10% deles tinha a mutação no exon 11.

A duplicação em tandem no exon 11 é a mutação mais frequente em cães (WEBSTER et al., 2006) e a melhor caracterizada (JONES et al., 2004). Porém, em um estudo mais recente, Amagai et al. (2013) relataram que a duplicação em tandem do domínio justamembrana está presente apenas em uma pequena quantidade de mastocitomas, e que estes ocorrem por clones múltiplos ou por exposições não clônicas.

A presença de deleções no exon 11 e mutações em outras localizações já foram relatadas por Zemke et al. (2002) e Webster et al. (2006). Todas as mutações são responsáveis pela ativação da fosforilação sem a necessidade de um ligante, o

que gera a proliferação excessiva do tumor (LONDON et al., 1999; MA et al, 1999) e está associada à agressividade tumoral (ZEMKE et al., 2002).

Segundo London et al (1999), quanto mais agressivo e indiferenciado o tumor, maior a chance da frequência de mutações. Esta também interfere no número de recidivas e metástases, além de diminuir a sobrevida (WEBSTER et al., 2006). A presença de mutação não está relacionada a mastocitomas benignos (DOWNING et al, 2002).

No presente estudo, não foram encontradas mutações em um grande número de animais. Isso pode ocorrer pela presença de mutação em outros genes do c-kit que não foram investigados (LONDON et al, 1999).

A presença de mutação não demonstrou correlação significativa com nenhuma das variáveis clínicas (sexo, idade, raça e localização). Essa ausência de associação com as variáveis foi descrita por Zemke et al. (2002) e Downing et al. (2002).

Uma das mutações encontradas foi em um cão da raça Boxer, mas este fato não é suficiente para indicar a predisposição genética desses animais, uma vez que foi encontrado o mesmo número de mutações em cães da raça Pug e em um cão sem raça definida.

Não houve correlação estatística significativa entre nenhuma das classificações histológicas e a presença de mutação, conforme citado por Downing et al. (2002). Porém, Zemke et al. (2002) propuseram relação entre o grau histológico e a presença de mutação, mas sem evidências estatísticas.

Da mesma maneira que Zemke et al. (2002), não foram encontradas mutações em nenhum animal com mastocitoma de grau I e 10% dos animais com grau II apresentavam mutações. Porém, a porcentagem de mutações encontradas nos animais de grau III foi superior à localizada no presente estudo.

Nenhum animal de grau I pela classificação de Patnaik apresentaram mutação no presente estudo.

Pela classificação histológica em dois graus, duas mutações eram em animais com tumor de alto grau e uma era em um tumor de baixo grau. A classificação de alto grau é aquela que tem o pior prognóstico e que agrupa os animais de grau II e III da classificação de Patnaik (Kiupel et al., 2011), por isso, a maior frequência de mutações nos tumores de alto grau é esperada. Giantin et al (2012) descreveram a

presença de mutação em todos os graus histológicos, mas a porcentagem de tumores de baixo grau com mutação foi maior do que os tumores de alto grau.

A localização aberrante do c-kit já foi citada como relacionada à presença de mutação (LONDON et al., 1999; WEBSTER et al., 2004; WEBSTER et al., 2006). Webster et al. (2006) relataram correlação significativa entre a presença de mutação e a mudança na localização do c-kit na imunohistoquímica. Essa dependência não foi verificada no presente estudo.

Um dos animais com a mutação tinha padrão perimembranoso. Segundo Webster et al. (2006), uma explicação seria a aquisição recente da mutação, que ainda não modificou a localização do c-kit.

Porém, a alteração da localização do c-kit pode ser um evento separado da presença da mutação, já que, no presente estudo, dos 32 animais avaliados, 20 tinham padrão citoplasmático. Destes, 18 não apresentavam mutação. O mesmo foi verificado por Webster et al. (2006), que sugeriram que a mutação em outros locais ou outros fatores podem estar relacionados à alteração da localização membranosa do c-kit. Tanto a presença de mutação ou a localização aberrante do c-kit estão associados aos prognósticos piores (WEBSTER et al., 2007), mas mesmo tumores sem mutação podem proliferar e ter comportamento maligno (GIANTIN et al., 2012). Segundo Webster et al (2006), a localização aberrante do KIT é mais importante na patogênese do tumor do que a superexpressão do c-kit.

Todos os tumores com mutação eram proliferativos na marcação do ki-67 e há dependência estatística entre a presença de mutação e a marcação do ki-67. Isso corrobora com os resultados de Webster et al. (2007), que associaram a presença de mutação e a localização aberrante do KIT com a proliferação celular em mastocitomas cutâneos.

O mastocitoma é um tumor complexo que exige a realização de uma série de exames para prever o comportamento biológico e realizar o tratamento adequado, aumentando a sobrevida e diminuindo o risco de recidivas.

Embora existam diversos fatores, ainda não é possível associar nenhuma variável a um comportamento específico do tumor e a um prognóstico definitivo. Existem dados como a localização, as classificações histológicas, o padrão da proteína do c-kit, a taxa de proliferação pelo ki-67 e a presença de mutação que

devem ser analisados em conjunto, mas nenhum deles tem valor definitivo quando usado sozinho.

As variáveis mais associadas ao prognóstico são a classificação histológica, o padrão KIT e o Ki-67 (GIANTIN et al., 2012; VASCELLARI et al., 2012). Entre as classificações histológicas, a que demonstrou maior associação com o prognóstico foi a que divide os tumores em dois graus de malignidade.

Mesmo não conseguindo variáveis definitivas para prever o comportamento tumoral, é possível afirmar que a classificação de Kiupel et al. (2011), associada à imunohistoquímica, são eficientes para direcionar as ações do médico veterinário .

6. CONCLUSÕES:

Entre as variáveis clínicas, a localização tumoral é a mais importante ao comportamento biológico e deve ser levada em consideração na hora de determinar o prognóstico e o tratamento.

A classificação histológica ainda é a análise mais comum e aquela que auxilia melhor o clínico a avaliar o paciente. Embora as duas classificações usadas atualmente sejam eficientes, a classificação de Kiupel é a que tem maior valor prognóstico.

A imunistoquímica tem alto valor prognóstico e deve ser mais amplamente utilizada na avaliação do paciente para que a conduta do médico veterinário possa antecipar possíveis recidivas e auxiliar a obtenção de melhores resultados no tratamento.

A presença de mutação não é tão importante para o prognóstico, mas deve ser solicitada para permitir o acompanhamento do paciente e realizar outras formas de tratamento mais eficientes quando há mutação.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

AMAGAI, Y.; TANAKA, A.; MATSUDA, A.; JUNG, K.; OIDA, K.; NISHIKAWA, S.; JANG, H.; MATSUDA, H. Heterogeneity of internal tandem duplications in the c-kit of dogs with multiple mast cell tumours. *Journal of Small Animal Practice*. v. 54, p. 377-380. 2013.

AUXILIA, S.; HILL, P. Mast cell distribution, epidermal thickness and hair follicle density in normal canine skin: possible explanations for the predilection sites of atopic dermatitis? *Vet Dermatol*. v. 11, p. 247-254. 2000.

BENINGO, K.; SCOTT, D.; ERB, H. Subepidermal linear alignment of mast cells in inflammatory dermatoses of the dog. *Vet Dermatol*. v. 11, p. 13-16. 2000.

BERLATO, D.; MURPHY, S.; MONTI, P.; STEWART, J.; NEWTON, J. R.; FLINDALL, A.; MAGELENNON, G. A. Comparison of mitotic index and Ki67 index in the prognostication of canine cutaneous mast cell tumours. *Veterinary and Comparative Oncology*. 2013.

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

BOSTOCK, D. Neoplasms of the skin and subcutaneous tissues in dogs and cats. *Br Vet J*. v. 142, p. 1-19. 1986.

CHARLESWORTH, E. N. The role of basophils and mast cells in acute and late reactions in the skin. *Allergy: European Journal of Allergy & Clinical Immunology, Supplement* , v. 52, n. 34, p. 31-43, 1997.

COSTA-CASAGRANDE, T. A.; ELIAS, D. S.; MELO, S. R.; MATERA, J. M. Estudo retrospectivo do mastocitoma canino no serviço de Cirurgia de pequenos animais – Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. *Archives of Veterinary Science*, v.13, n.3, p.176-183. 2008.

COSTA-CASAGRANDE, T. A.; OLIVEIRA DE BARROS, L. M.; FUKUMASU, H.; COGLIATI, B.; CHAIBLE, L. M.; DAGLI, M. L. Z.; MATERA, J. M. The value of molecular expression of KIT and KIT ligand analysed using real-time polymerase chain reaction and immunohistochemistry as a prognostic indicator for canine cutaneous mast cell tumours. v. 13, n. 1, p.1 -10. 2013.

CROW, S. E. Treatment of a mast cell tumor in a dog. *Modern Veterinary Practice*, v. 58, p.766-767, 1977.

DALECK, C. R.; DE NARDI A. B.; RODASKI, S. *Oncologia em cães e gatos*. São Paulo: Ed. Roca, 2008. 612p.

DOWNING, S.; CHIEN, M. B.; KASS, P. H.; MOORE, P. E.; LONDON, C. A. Prevalence and importance of internal tandem duplications in exons 11 and 12 of c-kit in mast cell tumors of dogs. *American Journal of Veterinary Research*, v. 63, p.1718–1723. 2002.

FORREST, L. Combination cancer treatment: Surgery and radiation therapy. *Vet Med*. v. 92, n. 12, p. 1043-1049. 1997.

FULCHER, R.; LUDWIG, L.; BERGMAN, P.; NEWMAN, S.; SIMPSON, A.; PATNAIK; EHLER; MAC EWEN, A. Evaluation of a two-centimeter lateral surgical margin for excision of grade I and Grade II cutaneous mast cell tumors in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 288, n. 2, p. 210-15. 2006.

FURLANI, J. M.; DALECK, C. R.; VICENTI, F. A. M.; DE NARDI, A. B.; PEREIRA, G. T.; SANTANA, A. E.; EURIDES D.; SILVA, L. A. F. Mastocitoma canino: estudo retrospectivo. *Ciência Animal Brasileira*. v. 9, n. 1, p. 242-250. 2008.

GARRET, L. D. Canine mast cell tumors: diagnosis, treatment, and prognosis. *Veterinary Medicine: Research and Reports*. v. 5, p. 49-58. 2014.

GIANTIN, M.; VASCELLARI, M.; MORELLO, E. M.; CAPELLO, K.; VERCELLI, A.; GRANATO, A.; LOPPARELLI, R. M.; NASSUATO, C.; CARMINATO, A.; MARTANO, M.; MUTINELLI, F.; DACASTO, M. c-KIT messenger RNA and protein expression and mutations in canine cutaneous mast cell tumors: correlations with post-surgical prognosis. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. v. 24, n. 1, p. 116-126. 2012.

GIL DA COISA, R. M.; MATOS, E.; REMA, A.; LOPES, C. PIRES, M. A.; GÄRTNER, F. CD117immunoexpression in canine mast cell tumours: correlations with pathological variables and proliferation markers. v. 3, p. 19-25. 2007.

GOLDSCHMIDT, M. H.; HENDRICK, M. J. Tumors of the skin and soft tissues. In: MEUTEN, D. J. Tumors in domestic animals. 4. ed. Iowa : Iowa State Press, 2002. p. 105-109.

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

GROSS, T. L.; IHRKE, P.; WALDER, E. J.; AFFOLTER, V. K. Mast cell tumors. In: ROSS, T. L.; WALDER, E. J.; AFFOLTER V. K. *Skin Diseases of the Dog and Cat: Clinical and Histopathological Diagnosis*. 2 ed. Oxford: Science Ltd, 2005. p. 853-65.

JARK, P. C.; MACHADO, L. H. A.; SAKATE, M.; CALAZANS, S. G.; CÁPUA, M. L. B.; COSTA, M. T.; DE NARDI, A. B. Inibidores de tirosina-quinase no tratamento de

mastocitomas cutâneos em cães – revisão. *Clínica Veterinária*. v.17, n. 99, p. 50-56, 2012.

JAQUES, L.; SUE, T.; MCDUFFIE, N.; PRESNELL, K. Sulfated mucopolysaccharides in dog mast cell tumors. *Journal Animal Hospital Association*. v. 13, p. 359-68. 1977.

JONES, C. L. R.; GRAHN, R. A.; CHIEN; M. B.; LYONS, L. A.; LONDON, C. A. Detection of c-kit mutations in canine mast cell tumors using fluorescent polyacrylamide gel electrophoresis. v. 16, p. 95-100. 2004.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. *Histologia Básica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 488p

KITAMURA, Y.; GO, S.; HATANAKA, K. Decrease of mast cells in W/W^v mice and their increase by bone marrow transplantation. *Blood*, v. 52, p. 447-452. 1978.

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

KIUPEL, M.; WEBSTER, J. D; MILLER, R.; KANEENE, J. Impact of tumour depth, tumor location and multiple synchronous masses on the prognosis of canine cutaneous mast cell tumours,. *Journal of Veterinary Medicine*, v. 52, p. 280-86. 2005.

KIUPEL, M.; WEBSTER, J. D., BAILEY, K. L.; BEST, S.; DELAY, J.; DETRISAC, C. J.; FITZGERALS, S. D.; GAMBLE, D.; GINN, P .E.; GOLDSCHIMIDT, M. H.; HENDRICK, M .J.; HOWERTH, E. W.; JANOVITZ, E. B.; LANGOHR, I.; LENZ, S. D.; LIPSCOMB, T. P.; MILLER, M. A., MISDORP, W.; MOROFF, S.; MULLANEY, T. P.; NEYENS, I.; O'TOOLE, D.; RAMOS-VARA, J.; SCASE, T. J.; SCHULMAN, F. Y.; SLEDGE, D.; SMEDLEY, R. C.; SMITH, K.; STROMBERG, P. C.; VALLI, V. E.;

WEISBRODE, S. E.; YAGER, J.; HELLER, J.; MILLER, R. Proposal of a 2-Tier Histologic Grading System for Canine Cutaneous Mast Cell Tumors to More Accurately Predict Biological Behavior. *Veterinary Pathology*, v. 48, n.1, p. 147-155. 2011.

LONDON, C. A.; KISSEBERTH, W. C.; GALLI, S. J.; GEISLER E .N.; HELFAND, S. C. Expression of Stem Cell Factor Receptor (c-kit) by the Malignant Mast Cells from Spontaneous Canine Mast Cell Tumours. *Journal of Comparative Pathology*, v. 115, p. 399-414. 1996.

LONDON, C. A.; GALLI, S. J.; YUUKI, T.; HU, Z. Q.; HELFAND, S. C; GEISLER E. N. Spontaneous canine mast cell tumors express tandem duplications in the proto-oncogene c-kit. *Experimental Hematology*. v. 27, p. 689–697.1999.

LONDON, C. A.; SEGUIN, B. Mast cell tumors in the dog. *Veterinary Clinical of North American – Small Animal Practice*, v.33, p.473-489, 2003.

LONDON, C. A. Kinase inhibitors in cancer therapy. *Veterinary and Comparative Oncology*. v.2, n.4, p. 177-193. 2004.

LONDON, C. A. Signal transduction and cancer. In: WITHROW, S. J.; VAIL, D. M. Withrow. *MacEwen's small animal clinical oncology*. 4. ed. St. Louis, Saunders Elsevier. 2007. p.242- 251.

LONDON, C. A. Tyrosine Kinase Inhibitors in Veterinary Medicine. *Topics in companion animal medicine*. v. 24, p. 106-112. 2009.

MA, Y.; LONGLEY, B. J.; WANG, X.; BLOUNT, J. L.; LANGLEY, K.; CAUGHEY, G.H.). Clustering of activating mutations in c-KIT's juxtamembrane coding region in canine mast cell neoplasms. *The Journal of Investigative Dermatology*. v. 112, n. 2, p.165 – 170. 1999.

METCALFE, D.; MEKORI, J.; ROTTEM, M. Mast cell ontogeny and apoptosis. *Exp Dermatol.* V. 4, p. 227-230.1995.

MISDORP, W. Veterinary Cancer Epidemiology. *The Veterinary Quarterly.* v. 18, n. 1, p. 32-36. 1996.

MORINI, M.; BETTINI, G.; PREZIOSI, R.; MANDROLI, L. C-kit gene product (CD117) immunoreactivity in canine and feline paraffin sections. *J Histochem Cytochem.* v. 52, n. 5, p. 705-708. 2004.

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

MURPHY, S. Mast Cell Tumors. In: DOBSON, L. B.; LASCELLES, B. D. X. *BSAVA Manual of Canine and Feline Oncology.* JM. Gloucester, British Small Animal Veterinary Association: 2007. p. 161-67.

MULLINS, M.; DERNELL, W.; WITHROW, S.; EHRHART, E.; THAMM, D.; LANA, S. 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). *JAVMA.* v. 228, n. 1, p. 91-95. 2006.

NAVEGA, P. R. S. Mastocitomas em canídeos: Estudo Retrospectivo. *Dissertação de Mestrado.* Universidade Técnica de Lisboa. Lisboa. 2011.

O'KEEFE, D. Canine Mast Cell Tumors. *Vet Clin Small Anim.* v.20, n.4, p. 1105-1115. 1990.

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

OKAYAMA, Y.; KAWAKAMI, T. Development, Migration, and Survival of Mast Cells. *Immunol Res*. v. 34, n. 2, p. 97-115. 2006.

OLIVEIRA, J. M. P. Aspectos patológicos do mastocitoma cutâneo canino – Relação com características epidemiológicas e clínicas e seu valor prognóstico. Tese de doutorado. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro. Vila Real. 2008.

OWEN, L. (1980). *TNM Classification of Tumors in Domestic Animals*. Genebra, World Health Organization.

OZAKI, K.; YAMAGAMI, T.; NOMURA, K.; NARAMA, I. Prognostic Significance of Surgical Margin, Ki-67 and Cyclin D1 Protein Expression in Grade II canine Cutaneous Mast Cell Tumor. *J. Vet. Med. Sci*. v. 69, n. 11, p. 1117-1121. 2007.

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

PATRINO, R.; MARECH, I.; ZIZZO, N.; AMMENDOLA, M.; NARDULLI, P.; GADALETA, C.; INTRONA, M.; CAPRIUOLO, G.; RUBINI, R. A.; RIBATTI, D.; GADALETA, C. D.; RANIERI, G. C-Kit Expression, Angiogenesis, and Grading in Canine Mast Cell Tumour: A Unique Model to Study C-Kit Driven Human Malignancies. V. 2014. 2014.

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

PREZIOSI, R.; SARLI, G.; PALTRINIERI, M. Multivariate Survival Analysis of Histological Parameters and Clinical Presentation in Canine Cutaneous Mast Cell Tumours. *Vet Research Commun.* v. 31, p. 287-96. 2007.

REGUERA, M.; RABANAL, R.; PUIGDEMONT, A.; FERRER, L. Canine Mast Cell Tumors Express Stem Cell Factor Receptor. *Am J Dermatopathol.* v. 22, n.1, p. 49-54. 2000.

REGUERA, M., FERRER, L., RABANAL, R. Evaluation of an intron deletion in the c-kit gene of canine mast cell tumors. *American Journal of Veterinary Research*, v. 63, n. 9, p. 1257-61. 2002.

RINGLE, D.J. Inflamação e reparo. In: JONES, T. C.; HUNT, R. D.; KING, N. W. *Patologia veterinária*. 6ª ed. São Paulo: Manole, 2000. p. 119-166.

ROBBIE-RYAN, M.; BROWN, M. A. The role of mast cells in allergy and autoimmunity. *Current Opinion in Immunology*, v. 14, n. 6, p. 728-733, 2002.

ROMANSIK, E.; REILLY, C.; KASS, P.; MOORE, P.; LONDON, C. Mitotic index is predictive for survival for canine cutaneous mast cell tumors. *Vet Pathol.* v. 44, p. 335-41. 2007.

ROSKOSKI JR., R. Signaling by Kit protein-tyrosine kinase- the stem cell factor receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* v. 337, p. 1-13. 2005.

SABATTINI, S.; SCARPA, F.; BERLATO, D.; BETTINI, G. Histologic Grading of Canine Mast Cell Tumor. Is 2 Better Than 3? v. 52, n. 1, p. 70-73. 2015.

SACHSENMAIER, C. Targeting protein kinases for tumor therapy. *Onkologie*, v.24, n.4, p. 346-355. 2001.

SCASE, T. J.; EDWARDS, D.; MILLER, J.; HENLEY, W.; SMITH, K.; BLUNDEN, A.; MURPHY, S. Canine Mast Cell Tumors: Correlations of Apoptosis and Proliferation markers with Prognosis. v. 20, p. 151-158. 2006.

SCOTT, M. A.; STOCKHMAN, S. L. Basophils and Mast Cells. In: FELDMAN, B. F.; ZINKL, J. G.; JAIN, N. C. Schalm's: Veterinary hematology. 5a ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. p. 308-317.

SÉGUIN, B.; BREGAZZI, V. S.; POWERS, B. E.; FETTMAN, M. J. Clinical outcome of dogs with grade-II mast cell tumors treated with surgery alone: 55 cases (1996 - 1999). *JAVMA*, v.218, n. 7, p. 1120-1123. 2001.

SIMÕES, J. P. C.; SCHONING, P.; BUTINE, M. Prognosis of Canine Mast Cell Tumors: A Comparison of Three Methods. *Veterinary Pathology*, v. 31, p. 637. 1994.

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

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

TAKEUCHI, Y.; FUJINO, Y.; WATANABE, M.; TAKAHASHI, M.; NAKAGAWA, T.; TAKEUCHI, A.; BONKOBARA, M.; KOBAYASI, T.; OHNO, K.; UCHIDA, K.; ASANO, K.; NISHIMURA, R.; NAKAYAMA, H.; SUGANO, S.; OHASHI, Y.; TSUJIMOTO, H.

Validation of the prognostic value of histopathological grading or c-kit mutation in canine cutaneous mast cell tumors: A retrospective cohort study. v.196, p. 492-498. 2013.

THAMM, D.; MAULDIN, E.; VAIL, D. Prednisone and vinblastine chemotherapy for canine mast cell tumor - 41 cases (1992-1997). J Vet Int Med. v. 13, p. 491-97. 1999.

THAMM, D.; VAIL, D.M. Mast Cell Tumors. In : Small Animal Oncology. M. E. WITHROW SJ. Philadelphia, WB Saunders Company: 261-82. 2001.

THARP, M. Mastocytosis. Curr Probl Dermatol. v. 10, p. 117-210. 1998.

TSAI, M.; TAKEISHI, T.; THOMPSON, H.; LANGLEY, K. E.; ZSEBO, K. M.; METCALFE, D. D.; GEISLER, E. N.; GALLI, S. J. Induction of mast cell proliferation, maturation, and heparin synthesis by the rat c-kit ligand, stem cell factor. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of American, v.88, p.6382–6386, 1991.

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

TURREL, J.; KITCHELL, B.; MILLER, L.; THÉON, A. Prognostic factors for radiation treatment of mast cell tumor in 85 dogs. J Am Vet Med Assoc. v. 193, n.8, p. 936-940. 1988.

VASCELLARI, M.; GIANTIN, M.; CAPELLO, K.; CARMINATO, A.; MORELLO, E. M.; VERCELLI, A.; GRANATO, A.; BURACCO, P.; DACASTO, M.; MUTINELLI, F. Expression of Ki67, BCL-2, and COX-2 in Canine Cutaneous Mast Cell Tumors: Association With Grading and Prognosis. v. 50, n. 1, p.110-121. 2012.

WEBSTER, J., KIUPEL, M., KANEENE, J., MILLER, R. ,YUZBASIYAN-GURKAN, V. The Use of KIT and Tryptase Expression Patterns as Prognostic Tools for Canine Mast Cell Tumors. *Vet Pathol* v. 41, p. 371-377. 2004.

WEBSTER, J. D.; KIUPEL, M; YUZBASIYAN-GURKAN, V.; Evaluation of the kinase domain of c-KIT in canine cutaneous mast cell tumors. *BMC Cancer*. v.1, n. 6, p. 85-92 .2006.

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

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

WITHROW, S. J.; VAIL, D. M. Withrow. *MacEwen's small animal clinical oncology*. 4. ed. St. Louis, Saunders Elsevier. 2007. 846p

WU, H.; HAYASHI, T.; INOUE, M. Immunohistochemical Expression of p27 and p21 in canine cutaneous Mast Cell Tumors and Histiocytomas. *Veterinary Pathology*, v. 41, p. 296-299. 2004.

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

YARDEN, Y.; ULLRICH, A., Growth factor receptor tyrosine kinases. *Annual Review of Biochemistry* v. 57, p. 443–478. 1988.

YEE, N. S.; PAEK, I.; BESMER, P. Role of kit-ligand in proliferation and suppression of apoptosis in mast cells: basis for radiosensitivity of white spotting and steel mutant mice. *The Journal of Experimental Medicine*, v.179, p.1777–1787, 1994.

ZAPPULLA, J. P.; AROCK, M.; MARS, L. T.; LIBLAU, R. S. Mast cells: new targets for multiple sclerosis therapy? *Journal of Neuroimmunology*, v. 131, p. 5-20, 2002.

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

APÊNDICES

A) Tabela completa dos dados

A) Tabela completa dos dados

Número	UENF	IDADE	LOCALIZAÇÃO	RAÇA	SEXO	PATNAIK	Kiupel	Ckit	KI67	MEDIA KI67	PCR
1	6898	Entre 7 e 9	Desconhecido	Fox Paulistinha	M	II	Baixo	Perimembranoso	Não Corou	-	-
2	6933	Entre 4 e 6	Disseminado	Bernesse	F	II	Baixo	Perimembranoso	Não Corou	-	-
3	6964	Entre 0 e 3	Genital	SRD	F	II	Baixo	Difuso	Não Corou	-	-
4	7042	Entre 10 e 12	Membro	Boxer	M	II	Baixo	Perimembranoso	Não Corou	-	-
5	7045	Entre 7 e 9	Disseminado	Boxer	F	II	Baixo	Focal	Não Corou	-	-
6	7265	Entre 10 e 12	Membro	Boxer	M	III	Baixo	Focal	Não Proliferativo	2	-
7	7341	Entre 4 e 6	Dorso	Pit Bull	F	II	Baixo	Focal	Não Corou	-	-
8	7366	Entre 4 e 6	Disseminado	Boxer	M	II	Baixo	Perimembranoso	Não Corou	-	-
9	7370	Entre 7 e 9	Desconhecido	Boxer	M	II	Baixo	Perimembranoso	Não Corou	-	-
10	7493	Entre 10 e 12	Membro	Pinscher	M	II	Baixo	Perimembranoso	Não Proliferativo	2	-
11	7690	Entre 10 e 12	Desconhecido	Pinscher	M	II	Baixo	Perimembranoso	Não Corou	-	-
12	7763	Entre 7 e 9	Ventre	SRD	M	I	Baixo	Perimembranoso	Não Proliferativo	5,3	-
13	7768	Entre 10 e 12	Desconhecido	Maltês	F	III	Alto	Difuso	Não Corou	-	-
14	7836	Entre 4 e 6	Membro	Pit Bull	F	II	Baixo	Difuso	Não Corou	-	-
15	7838	Entre 4 e 6	Membro	Labrador	M	II	Baixo	Perimembranoso	Não Corou	-	-
16	8011	Entre 10 e 12	Ventre	Pinscher	M	II	Baixo	Perimembranoso	Não Corou	-	-
17	8141	Entre 7 e 9	Membro	Dachshound	F	II	Baixo	Perimembranoso	Não Corou	-	-
18	8164	Desconhecido	Membro	Boxer	M	II	Baixo	Perimembranoso	Não Corou	-	-
19	8176	Entre 10 e 12	Dorso	SRD	M	II	Baixo	Focal	Não Corou	-	-
20	8238-1	Entre 7 e 9	Disseminado	Golden	F	I	Baixo	Perimembranoso	Não Corou	-	-
21	8618-1	Entre 7 e 9	Pescoço	Rottweiler	M	II	Alto	Difuso	Não Corou	-	-
22	8623	Entre 10 e 12	Desconhecido	Boxer	F	II	Baixo	Perimembranoso	Não Corou	-	-
23	8635	Entre 10 e 12	Genital	Boxer	M	II	Alto	Difuso	Não Corou	-	-
24	8728	Entre 4 e 6	Membro	Fox Paulistinha	F	II	Baixo	Perimembranoso	Não Corou	-	-
25	8792	Entre 10 e 12	Ventre	SRD	M	III	Baixo	Difuso	Não Proliferativo	2	normal

26	8882-I	Entre 10 e 12	Disseminado	Labrador	M	II	Alto	Difuso	Não Corou	-	normal
27	8886-3	Maior que 12	Disseminado	SRD	M	II	Baixo	Perimembranoso	Não Proliferativo	5,5	normal
28	8906	Entre 7 e 9	Ventre	SRD	F	II	Baixo	Focal	Não Corou	-	-
29	9055-1	Maior que 12	Cabeça	SRD	M	II	Alto	Focal	Proliferativo	24,3	-
30	9224	Entre 10 e 12	Membro	Bichon Frise	F	II	Alto	Difuso	Não Corou	-	normal
31	9402	Entre 4 e 6	Disseminado	Boxer	M	II	Baixo	Perimembranoso	Não Corou	-	-
32	9592	Desconhecido	Membro	Bichon Frise	F	II	Baixo	Perimembranoso	Não Corou	-	normal
33	9891	Entre 7 e 9	Genital	Akita	M	II	Baixo	Difuso	Não Corou	-	normal
34	9901	Entre 4 e 6	Membro	Fox Paulistinha	F	I	Baixo	Perimembranoso	Não Corou	-	-
35	9925	Entre 10 e 12	Ventre	Labrador	M	II	Alto	Focal	Não Corou	-	normal
36	10365	Entre 0 e 3	Dorso	Pastor	M	II	Baixo	Perimembranoso	Não Corou	-	normal
37	10459	Entre 7 e 9	Desconhecido	Boxer	M	I	Baixo	Focal	Não Proliferativo	0	normal
38	10528	Entre 7 e 9	Membro	Labrador	F	II	Baixo	Perimembranoso	Não Proliferativo	0	normal
39	10531	Entre 10 e 12	Desconhecido	SRD	M	II	Alto	Difuso	Não Proliferativo	5	normal
40	10546	Entre 7 e 9	Dorso	SRD	M	I	Baixo	Perimembranoso	Não Corou	-	normal
41	10561	Entre 7 e 9	Membro	Pit Bull	M	III	Alto	Difuso	Não Proliferativo	2	normal
42	10624	Entre 0 e 3	Membro	SRD	M	II	Alto	Focal	Não Corou	-	normal
43	10675	Maior que 12	Dorso	SRD	F	III	Alto	Difuso	Não Proliferativo	1	normal
44	10774	Maior que 12	Membro	Pinscher	M	I	Baixo	Perimembranoso	Não Corou	-	normal
45	10877	Entre 10 e 12	Genital	Pinscher	M	III	Alto	Difuso	Não Corou	-	normal
46	11208	Entre 10 e 12	Genital	Labrador	M	II	Alto	Perimembranoso	Não Proliferativo	3	normal
47	11604	Entre 7 e 9	Dorso	Boxer	F	II	Baixo	Perimembranoso	Não Proliferativo	11	normal
48	11627	Entre 10 e 12	Genital	Pinscher	M	III	Alto	Difuso	Proliferativo	26,4	normal
49	11639	Entre 10 e 12	Membro	Pug	F	II	Baixo	Perimembranoso	Proliferativo	25	mutante
50	11650	Entre 10 e 12	Genital	Labrador	M	II	Alto	Difuso	Proliferativo	27,6	normal
51	11683	Entre 7 e 9	Cabeça	SRD	M	III	Alto	Difuso	Proliferativo	24	mutante
52	11759	Entre 10 e 12	Dorso	Boxer	F	III	Alto	Focal	Não Proliferativo	0	normal
53	11831	Entre 4 e 6	Ventre	Golden	M	II	Baixo	Perimembranoso	Não Corou	-	normal

54	11997-1	Entre 10 e 12	Genital	Labrador	M	II	Baixo	Difuso	Proliferativo	30	normal
55	12094	Maior que 12	Ventre	Pinscher	F	II	Baixo	Focal	Não Proliferativo	8	-
56	12149-1	Maior que 12	Desconhecido	SRD	F	II	Baixo	Focal	Não Proliferativo	2	normal
57	12326	Entre 7 e 9	Membro	Fox Paulistinha	F	II	Baixo	Difuso	Proliferativo	26	normal
58	12403-1	Entre 10 e 12	Membro	Boxer	F	III	Alto	Focal	Proliferativo	100	normal
59	12447	Entre 4 e 6	Membro	SRD	F	II	Baixo	Perimembranoso	Não Proliferativo	3,6	normal
60	12481	Desconhecido	Membro	SRD	F	II	Baixo	Perimembranoso	Não Proliferativo	2,3	normal
61	12553	Entre 7 e 9	Desconhecido	Boxer	M	II	Alto	Focal	Proliferativo	26	mutante