

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
COLEGIADO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**PROPOSTAS TERAPÊUTICAS PARA O MASTOCITOMA CANINO
BASEADAS EM FATORES PROGNÓSTICOS CLÍNICOS, ANATOMO-
PATOLÓGICOS, IMUNO-HISTOQUÍMICOS E GENÉTICOS**

RODRIGO DOS SANTOS HORTA

**Belo Horizonte – MG
2016**

RODRIGO DOS SANTOS HORTA

**PROPOSTAS TERAPÊUTICAS PARA O MASTOCITOMA CANINO
BASEADAS EM FATORES PROGNÓSTICOS CLÍNICOS, ANÁTOMO-
PATOLÓGICOS, IMUNO-HISTOQUÍMICOS E GENÉTICOS**

Tese apresentada à Escola de Veterinária da
Universidade Federal de Minas Gerais, como
parte dos requisitos para obtenção do título de
Doutor em Ciência Animal.

Área: Medicina e Cirurgia Veterinárias.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Baracat de Araújo.

Co-orientadores: Prof. Geovanni Dantas Cassali
Dra. Gleidice Eunice Lavalle
Profa. Jane Margaret Dobson

**Belo Horizonte – MG
2016**

H821p Horta, Rodrigo dos Santos, 1986-
Propostas terapêuticas para o mastocitoma canino baseadas em fatores prognósticos clínicos, anátomo-patológicos, imuno-histoquímicos e genéticos / Rodrigo dos Santos Horta. – 2016.
136 p. : il.

Orientador: Roberto Baracat de Araújo
Co-orientadores: Geovanni Dantas Cassali, Gleidice Eunice Lavalle, Jane Margaret Dobson
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária
Inclui bibliografia

1. Cão – Doenças – Tratamento – Teses. 2. Tumores em animais – Teses.
3. Radioterapia – Teses. 4. Quimioterapia – Teses. I. Araújo, Roberto Baracat de.
II. Cassali, Geovanni Dantas. III. Lavalle, Gleidice Eunice. IV. Dobson, Jane Margaret.
V. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. VI. Título.

CDD – 636.708 96

FOLHA DE APROVAÇÃO

RODRIGO DOS SANTOS HORTA

Tese submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de DOUTOR em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração em MEDICINA E CIRURGIA VETERINÁRIAS.

Aprovada em 28 de Janeiro de 2016, pela banca constituída pelos membros:

Roberto Barakat de Araújo

Prof. Roberto Barakat de Araújo
Presidente – Orientador

Renata Afonso Sobral

Drª. Renata Afonso Sobral
Onco Cane Veterinária - SP

Felipe Augusto Ruiz Sueiro

Dr. Felipe Augusto Ruiz Sueiro
Laboratório Veterinário VET PAT-SP

Felipe Pierezan

Prof. Felipe Pierezan
Escola de Veterinária da - UFMG

Rubens Antônio Carneiro

Prof. Rubens Antônio Carneiro
Escola de Veterinária da - UFMG

Gleidice Eunice Lavalle

Drª. Gleidice Eunice Lavalle
Hospital Veterinário - UFMG

Geovanni Dantas Cassali

Prof. Geovanni Dantas Cassali
Instituto de Ciências Biológicas - UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Escola de Veterinária
Av. Antônio Carlos, 6627 -
Caixa Postal 567 - CEP 30123-970
Belo Horizonte - Minas Gerais
Telefone: (31) 3409-2057/2059(fax)
www.vet.ufmg.br
E-mail: cap@vet.ufmg.br



AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço à Deus, pelo caminho que me foi trilhado e pelas pessoas especiais que coloca em meu caminho.

Ao professor Roberto Baracat e Geovanni Cassali pela orientação, apoio, incentivo e amizade.

À Dra. Gleidice Lavallo, minha mestre, orientadora, professora, colega e amiga, expresso minha eterna admiração e gratidão, por ter me ensinado a Medicina Veterinária que sempre sonhei, por me mostrar a importância do amor pelos animais e por ter acreditado em mim durante todo esse tempo.

À profa. Jane Dobson, pela confiança, por ter me recebido na *University of Cambridge*, e ter sido tão disponível nos ensinamentos e orientação.

Agradeço também aos amigos que fiz na *University of Cambridge (Queen's Veterinary School Hospital)* e *University of London (Royal College of Veterinary Surgeons)*, especialmente Antonio Giuliano, Aleksandra Marcinowska, Tess Hoather, Ana Ortiz, Victor Ortiz, Maciek, Gonçalo, Valentina, Ben, Jin, Anna, Cheryl, Elizabeth, Andy, Karina e Francisca.

Ao Laboratório VETPAT e PROGEN Biotecnologia, principalmente Felipe Sueiro, Camila, Elaine e Fábio, por viabilizarem a pesquisa de mutações no gene *c-kit*.

À equipe do Laboratório de Patologia Comparada do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, em especial, Lidianne, Rúbia, Stéfane, Fernanda Camargo, Fernanda Freitas, Tatiany, Breno, Diego, Karine, Conrado e prof. Enio.

Aos alunos Larissa e Frederico, pelo interesse, amizade e ajuda no acompanhamento dos pacientes.

Aos meus pacientes e seus respectivos responsáveis, por tudo que me ensinam todos os dias, especialmente Tobias, Maria, Mel, Jade, Pipoca, Yoshi e Lina.

Ao CNPq e CAPES por terem financiado meus estudos no Brasil e no Reino Unido, respectivamente.

Aos meus pais, por me ensinarem a importância do trabalho e da perseverança. Meus irmãos, parte do que sou hoje. À família Pádua que me acolheu à vários anos, pela compreensão e pelos momentos inesquecíveis que sempre me proporcionam. Aos meus amigos, em especial Sânzio, Lívia, Graciela, Lissandra, Gustavo, Fernanda, Gabriela, Guilherme Brant, Nathália, Ayla, Guilherme Caro, Bernardo, Stephanie, Aline, Luiz, Erick e Leila, por toda a alegria que me proporcionam, mesmo nos momentos mais difíceis.

À Mariana, linda esposa e a melhor escolha que já fiz. Agradeço pelo incentivo, amor e paciência nesse longo processo, por me ensinar todos os dias o que é mais importante na vida, e também pela ajuda na contagem de Ki-67. Foi mais difícil do que esperávamos, mas a distância só nos deixa mais próximos.

À Susie, minha inspiração na profissão que escolhi, por me mostrar tudo o que um cão pode ser.

**“O Rio? É doce.
A Vale? Amarga.
Ai, antes fosse
Mais leve a carga.
Entre estatais
E multinacionais,
Quantos ais!**

**A dívida interna
A dívida externa
A dívida eterna.**

**Quantas toneladas exportamos
De ferro?
Quantas lágrimas disfarçamos
Sem berro?”**

Carlos Drummond de Andrade (1984)

**“A natureza pode suprir todas as
necessidades do homem, menos a
sua ganância.”**

Mahatma Gandhi

LISTA DE ABREVIÇÕES

ABC transporters – *ATP-binding cassette transporters* (transportadores de cassetes de ligação ao ATP).

AgNOR – *Argyrophilic nucleolar organizer regions* (regiões organizadoras nucleares argirofílicas).

ALT – Alanina aminotransferase.

AST – Aspartato aminotransferase.

ATP – Adenosina trifosfato.

Bcr-Abl – *Breakpoint cluster region-Abelson*.

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais.

CD31 – *Cluster of differentiation 31* (agrupamento de diferenciação 31).

CD31/34⁺ – *Cluster of differentiation 34⁺* (agrupamento de diferenciação 34⁺).

CD 117 – *Cluster of differentiation 117* (agrupamento de diferenciação 117).

CDKN1A/1B – Ciclina dependente de kinase 1A/1B.

COX-2: ciclo-oxigenase 2.

CSF-1R – *Colony-stimulating factor-1 receptor* (receptor do fator estimulador de colônia-1).

DDR1/2 – *Discoidin domain-containing receptor 1/2* (receptor do domínio de discoidina 1/2).

DNA – *Deoxyribonucleic acid* (ácido desoxirribonucleico).

DMT – Dose máxima tolerada.

DUSP – *dual specificity phosphatase* (fosfatase de dupla especificidade).

Erk – *Extracellular signal-regulated kinase* (quinase reguladora de sinal extracelular).

FA – fosfatase alcalina.

FAP – *Fibroblast activating protein* (proteína ativadora de fibroblasto).

FGF – *Fibroblasts growth factor* (fator de crescimento de fibroblastos).

Flt-3 – *FMS-like tyrosine kinase 3*.

GC – Glicocorticóides.

GDP – Guanosina difosfato.

GGT – Gama-glutamyl-transferase.

GTP – Guanosina trifosfato.

GRB-2 – *Growth factor receptor bound protein-2* (proteína ligante de fator de crescimento-2).

GSK-3 – *Glycogen synthase kinase-3* (quinase glicogênio-sintase-3).

HE – Hematoxilina-eosina.

HPF – *High power field* (campo de maior aumento – 40x).

ILD – Intervalo livre de doença.

ITD – *Internal tandem duplication* (duplicação interna em tandem).

JNK – *c-Jun N-terminal kinase*.

KITr – *KIT receptor* (receptor KIT ou receptor do fator de células tronco).

LYn – *Lck/Yes novel tyrosine kinase*.

MAPK – *Mitogen-activated protein kinase* (proteína-quinase ativada por mitógeno).

Md – Mediana.

MDM-2 – *Murine double minute-2*.

MMP-2/9 – *Matriz metalloproteinase-2/9* (metaloproteinase de matriz 2/9).

mTOR – *Mechanistic/mammalian target of rapamycin* (alvo mecânico/mamífero da rapamicina).

NFKb – *Nuclear factor kappa b* (fator nuclear kappa b).

OMS – Organização Mundial de Saúde.

OR – *Odd ratio* (razão de chance).

p – Nível de significância.

PAAF – Punção aspirativa por agulha fina.

PCNA – *Proliferating cell nuclear antigen* (antígeno nuclear de proliferação celular).

PDGF – *Platelet-derived growth factor* (fator de crescimento derivado de plaquetas).

PDGFR α/β – *Platelet-derived growth factor receptor α/β* (receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas α/β).

PI3K – *Phosphatidylinositol 3-kinase*.

PIP3 – *Phosphatidyl inositol-3, 4, 5-trifosfato*.

QM – Quimioterapia metronômica.

QT – Quimioterapia.

QVSH – *Queen's Veterinary School Hospital*.

RAF – *Rapidly accelerated fibrosarcoma*.

RAS – *Rat sarcoma*.

RNA – Ribonucleic acid (ácido ribonucleico).

r_s – correlação de Spearman.

RT – Radioterapia.

SCF – *Stem cell factor* (fator de célula-tronco).

SG – Sobrevida global

SHC – *Src homology-2 domain containing*.

SLAP – *Src-like adaptor protein* (proteína adaptadora semelhante a Src)

SON - *Son of sevenless*.

SRC – *Sarcoma de Rous*.

TAF - *tumour associated fibroblast* (fibroblasto associado ao tumor)

TKI – *Tyrosine-kinase inhibitor* (inibidor tirosina-quinase).

TTPA – Tempo de tromboplastina parcial ativada.

TP – Tempo de protrombina.

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais.

VEGF – *Vascular endothelial growth factor* (fator de crescimento endotelial vascular).

VEGFR – *Vascular endothelial growth factor receptor* (receptor do fator de crescimento endotelial vascular).

SUMÁRIO

RESUMO	17
ABSTRACT	17
INTRODUÇÃO.....	19
REVISÃO DE LITERATURA.....	20
Distúrbios proliferativos dos mastócitos	20
Biologia dos mastócitos.....	20
Incidência e fatores de risco	21
Etiologia	21
Comportamento biológico e apresentação clínica.....	24
Síndromes paraneoplásicas	26
Diagnóstico e estadiamento	26
Fatores prognósticos.....	28
Tratamento.....	34
MATERIAL E MÉTODOS	39
Critérios de inclusão e exclusão.....	39
Tratamento cirúrgico	40
Avaliação anátomo-patológica.....	40
Avaliação imuno-histoquímica	41
Pesquisa de mutações no exon 11 do gene <i>c-kit</i>	42
Tratamento médico	44
Avaliação da resposta e toxicidade	46
Análise estatística.....	46
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	48
ESTUDO I – TRATAMENTO DO MASTOCITOMA CANINO MENSURÁVEL COM GLICOCORTICÓIDES E CORRELAÇÃO COM ASPECTOS CLÍNICOS, ANATOMO-PATOLÓGICOS, IMUNO-HISTOQUÍMICOS, GENÉTICOS E COM O PROGNÓSTICO	
Introdução.....	48
Resultados.....	49
Discussão.....	53
Conclusões.....	56
ESTUDO II – ESTABELECIMENTO DO RISCO DE RECORRÊNCIA OU METÁSTASE ASSOCIADO AO MASTOCITOMA CANINO	
Introdução.....	57
Resultados.....	57

Discussão.....	74
Conclusões.....	79
ESTUDO III – QUIMIOTERAPIA ADJUVANTE PARA O MASTOCITOMA CANINO DE RISCO INTERMEDIÁRIO A ELEVADO	
Introdução.....	80
Resultados.....	81
Discussão.....	90
Conclusões.....	92
ESTUDO IV – ANÁLISE DE RISCO E RESPOSTA CLÍNICA DE CÃES COM MASTOCITOMA CUTÂNEO TRATADOS COM EXCISÃO CIRÚRGICA MARGINAL INTENCIONAL E RADIOTERAPIA	
Introdução.....	93
Resultados.....	94
Discussão.....	96
Conclusões.....	98
ESTUDO V – INIBIDORES TIROSINA-QUINASE PARA DOENÇA MENSURÁVEL E TRATAMENTO ADJUVANTE DO MASTOCITOMA CANINO	
Introdução.....	99
Resultados.....	100
Discussão.....	107
Conclusões.....	109
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	110
REFERÊNCIAS.....	111
ANEXOS	127
Anexo 1 – Certificado emitido pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA).....	127
Anexo 2 – Certificado emitido pelo <i>Department's Ethics and Welfare Committee</i>	128
Anexo 3 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido utilizado no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Minas Gerais	129
Anexo 4 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido utilizado no <i>Queen's Veterinary School Hospital na University of Cambridge (Statement and agreement for estimated cost of treatment)</i>	131
Anexo 5 – Achados anátomo-patológicos (microscopia) em mastocitomas caninos.....	132
Anexo 6 – Padrões de expressão imuno-histoquímica de KITr.....	133
Anexo 7 – Expressão imuno-histoquímica de Ki-67.....	133
Anexo 8 – Resultados obtidos após a amplificação do segmento de interesse no mastocitoma canino, após separação em gel de agarose 1,2% e revelação utilizando o <i>Blue Green Loading Dye</i>	134
Anexo 9 – Posicionamento dos pacientes para radioterapia adjuvante	135

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Desenho esquemático do receptor KIT (KITr), incluindo os exons responsáveis pela codificação de cada segmento (adaptado de Webster et al., 2006a).	22
Figura 2	Desenho esquemático representando o mastócito e as vias celulares ativadas a partir da ativação do receptor KIT (c-KitR) pelo fator de células-tronco (SCF, stem cell factor) (adaptado de Marech et al., 2014).	23
Figura 3	Sequência de nucleotídeos do exon 10 ao exon 12 (5' → 3') do gene <i>c-kit</i> (adaptado de Zemke et al., 2002 e Jones et al., 2004).	43
Figura 4	Mastocitoma de grau 2/baixo grau anterior à citorredução, medindo 2,0x0,6cm (A) e após o tratamento com prednisolona, medindo 1,4x0,4cm (B), com redução de no mínimo 50% (remissão parcial).	52
Figura 5	Representação gráfica da sobrevida global de 62 cães com mastocitoma submetidos ao tratamento neoadjuvante com corticosteróides	53
Figura 6	Representação gráfica da sobrevida global de 134 cães com mastocitoma, conforme o estadiamento clínico, de I a IV, proposto pela Organização Mundial de Saúde (A), e com divisão do estágio III em III.1 e III.2, na ausência ou presença, respectivamente, de envolvimento dos linfonodos regionais (B).	69
Figura 7	Representação gráfica da sobrevida global de 134 cães com mastocitoma, conforme histórico de recorrência tumoral.	69
Figura 8	Representação gráfica da sobrevida global de 134 cães com mastocitoma, conforme o sistema de graduação histológico proposto por Patnaik et al. (1984).	70
Figura 9	Representação gráfica da sobrevida global de 134 cães com mastocitoma, conforme o sistema de graduação histológico proposto por Kiupel et al. (2011).	70
Figura 10	Representação gráfica da sobrevida global de 134 cães com mastocitoma, conforme a distribuição histológica predominante (cordão ou manto).	71
Figura 11	Representação gráfica da sobrevida global de 134 cães com mastocitoma, conforme a presença/intensidade de necrose intratumoral.	71
Figura 12	Representação gráfica da sobrevida global de 134 cães com mastocitoma, conforme o número de células multinucleadas (valor de corte = 9 células multinucleadas em 10 campos de maior aumento).	72
Figura 13	Representação gráfica da sobrevida global de 134 cães com mastocitoma, conforme índice mitótico (valor de corte = 2 figuras mitóticas em 10 campos de maior aumento).	72
Figura 14	Representação gráfica da sobrevida global de 134 cães com mastocitoma, conforme o percentual de Ki-67 (valor de corte = 5,6%).	72
Figura 15	Representação gráfica da sobrevida global de 134 cães com mastocitoma, conforme o padrão de expressão de KITr.	73
Figura 16	Representação gráfica da sobrevida global de 134 cães com mastocitoma, conforme o status mutacional do exon 11 do gene <i>c-kit</i> .	73
Figura 17	Representação gráfica do intervalo livre de doença (A) e sobrevida global (B) de 99 cães com mastocitoma, conforme o risco de recorrência e disseminação tumoral	89
Figura 18	Representação gráfica do intervalo livre de doença (A) e sobrevida global (B) de 48 cães com mastocitoma de alto risco de recorrência ou	89

disseminação, conforme o uso de quimioterapia adjuvante, em dose máxima tolerada.

Figura 19	Representação gráfica do intervalo livre de doença para 21 cães com mastocitoma cutâneo submetidos à RT adjuvante de acordo com a avaliação histológica do linfonodo (medianas não atingidas, $p=0,1$).	96
Figura 20	Representação gráfica da sobrevida para 31 cães com mastocitoma de alto risco, de acordo com o uso de inibidores tirosina-quinase na adjuvância (Md = 267 dias) ou no tratamento de doença macroscópica (Md = 103 dias) ($p = 0,004$).	104
Figura 21	Cão da raça Bulldog francês, apresentando metástase de mastocitoma em linfonodo pré-escapular direito (A), com remissão completa após 12 dias de tratamento (B).	105
Figura 22	Cão da raça Bulldog Francês apresentando mastocitoma na região do prepúcio (A), com resposta favorável ao mesilato de masitinib, resultando em remissão parcial com 10 dias (B) e 30 dias de tratamento (C). Observar a persistência de nódulos satélites na pele próximo ao prepúcio (C).	105
Figura 23	Representação gráfica da sobrevida para 24 pacientes submetidos ao tratamento com inibidores tirosina-quinase, devido ao diagnóstico de mastocitoma canino, inoperável (doença mensurável) de acordo com a resposta inicial ao tratamento.	105
Figura 24	Representação gráfica da sobrevida para 31 casos de mastocitoma canino submetidos ao tratamento com inibidores tirosina-quinase, considerando o histórico de recorrência tumoral.	106
Figura 25	Representação gráfica da sobrevida para 28 pacientes submetidos ao tratamento do mastocitoma canino com inibidores tirosina-quinase, de acordo com o estadiamento clínico e classificados nos estágios II (Md = 182 dias), III.1 (Md = 125 dias) e III.2 (Md = 80 dias) ($p = 0,1$).	106

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Estadiamento clínico proposto pela Organização Mundial de Saúde para o mastocitoma em cães (adaptado de Owen, 1980)	28
Tabela 2	Sistema de classificação histológica das metástases do mastocitoma canino em linfonodos (adaptado de Weishaar et al., 2014)	29
Tabela 3	Sistema de graduação proposto por Patnaik et al. (1984), para o mastocitoma canino.	30
Tabela 4	Sistema de graduação proposto por Kiupel et al. (2011), para o mastocitoma canino.	30
Tabela 5	Informações individuais de 62 cães submetidos ao tratamento neoadjuvante com glicocorticóides objetivando citorredução de mastocitoma	49
Tabela 6	Resposta aos glicocorticóides conforme os principais aspectos clínicos, anatomo-patológicos, imuno-histoquímicos e genéticos estudados.	52
Tabela 7	Fatores prognósticos clínicos, anátomo-patológicos, imuno-histoquímicos e genéticos de 149 cães com mastocitoma.	59
Tabela 8	Correlação entre os fatores prognósticos clínicos, anátomo-patológicos, imuno-histoquímicos e genéticos de 149 cães com mastocitoma.	66
Tabela 9	Proposta de modificação do estadiamento clínico do mastocitoma cutâneo e subcutâneo em cães.	69
Tabela 10	Fatores prognósticos clínicos, anátomo-patológicos, imuno-histoquímicos e genéticos de 98 cães com mastocitoma, classificados nos grupos de risco elevado, intermediário e baixo.	82
Tabela 11	Fatores prognósticos para o mastocitoma, em 98 cães, de acordo com o risco de recorrência ou metástase	88
Tabela 12	Informações individuais de 21 cães com mastocitoma submetidos à radioterapia adjuvante.	95
Tabela 13	Toxicidade aguda e tardia relacionada à radioterapia adjuvante em 21 cães com mastocitoma.	96
Tabela 14	Aspectos clínicos, anátomo-patológicos, imuno-histoquímicos e genéticos de 31 cães submetidos ao tratamento com inibidores tirosina-quinase nos cenários adjuvante e neoadjuvante.	101
Tabela 15	Fatores prognósticos relevantes para o mastocitoma canino.	110

RESUMO

Essa tese teve como objetivo avaliar a eficiência de fatores prognósticos e de diferentes abordagens terapêuticas do mastocitoma canino, considerando a elevada incidência e heterogeneidade de apresentação clínica e comportamento biológico dessa neoplasia, constituindo um guia para prognóstico e tratamento. Foram incluídos cães referenciados ao Hospital Veterinário (Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil) e *Queen's Veterinary School Hospital (University of Cambridge, Reino Unido)*, com diagnóstico histopatológico de mastocitoma. Foram avaliados fatores prognósticos clínicos, anátomo-patológicos, imuno-histoquímicos e genéticos, resultando na realização de cinco estudos distintos. O estudo 1 (n = 62) demonstrou elevada taxa de resposta aos glicocorticóides (64,5%), no tratamento de doença mensurável, e evidenciou o impacto negativo no prognóstico, na ausência de resposta a esses fármacos. No estudo 2 (n = 149), foi avaliada a importância dos diferentes fatores prognósticos, com a proposta de uma modificação no estadiamento clínico preconizado pela Organização Mundial de Saúde, definição de novos valores de corte para o índice mitótico e percentual de Ki-67. O estudo 3 (n = 98) evidenciou o benefício da quimioterapia em dose máxima tolerada, no controle do mastocitoma de alto risco, enquanto o estudo 4 (n = 21), demonstrou elevada eficácia da radioterapia adjuvante no controle, a longo prazo, de mastocitomas de risco intermediário. Por fim, ficou demonstrada, no estudo 5 (n = 31), a eficácia dos inibidores tirosina-quinase em pacientes com risco elevado, no tratamento de doença mensurável, inoperável, mas também no cenário adjuvante, embora o uso de glicocorticóides e agentes antineoplásicos possa comprometer essa resposta.

Palavras-chave: Cães, neoplasias, estadiamento tumoral, antígeno Ki-67, proteína proto-oncogênica kit, proteínas tirosina-quinase, duplicação gênica, corticosteróides, quimioterapia, radioterapia.

ABSTRACT

The objective of this thesis was to evaluate the effectiveness of prognostic factors and different therapeutic approaches towards canine mast cell tumour, considering its high incidence and heterogeneity in clinical presentation and biological behavior, representing a guideline for prognosis and treatment. It included dogs referred to the Veterinary Hospital (Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil) and *Queen's Veterinary School Hospital (University of Cambridge, United Kingdom)*, with histological diagnosis of mast cell tumour. Evaluated prognostic factors included clinical, histological, immunohistochemical and genetic features, resulting in five distinct studies. Study 1 (n = 62) demonstrated a high response rate to glucocorticoids (64.5%) in the treatment of measurable disease, and showed a negative impact on prognosis in the absence of response to these drugs. In study 2 (n = 149), the importance of different prognostic factors was evaluated, with a proposal of a modification for the World Health Organization's recommended clinical staging, definition of new cut-off values for mitotic index and Ki-67. Study 3 (n = 98) showed the benefit of chemotherapy at maximum tolerated dose, in the control of high-risk mast cell tumours, while the study 4 (n = 21) demonstrated a high efficacy of adjuvant radiotherapy in the long-term control, of mast cell tumours of intermediate risk. Finally, it was demonstrated in the study 5 (n = 31), the effectiveness of tyrosine kinase inhibitors in patients at high risk, in the treatment of gross, unresectable disease, but also in the adjuvant setting, although the use of glucocorticoids and antineoplastic agents may compromise such response.

Key-words: Dogs, neoplasms, tumour staging, Ki-67 antigen, proto-oncogenic protein kit, tyrosine-kinase proteins, gene duplication, glucocorticoid, chemotherapy, radiotherapy.

INTRODUÇÃO

O mastocitoma, ou tumor de mastócitos, é uma neoplasia mesenquimal, formada a partir de mastócitos, podendo ocorrer nas apresentações cutânea e extracutânea (Welle et al, 2008; London e Thamm, 2013). Neoplasias do tecido tegumentar são freqüentes nos cães, compreendendo aproximadamente 1/3 dos casos em oncologia, sendo que, o mastocitoma corresponde a 16-21% das neoplasias cutâneas e subcutâneas (De Nardi et al., 2002; London e Thamm, 2013), constituindo o terceiro tumor mais comum, nesse órgão, precedido pelo lipoma e adenoma, porém a neoplasia tegumentar maligna de maior incidência nessa espécie (Villamil et al., 2011).

O comportamento biológico variado e, por vezes agressivo, torna essa patologia um desafio para o clínico de pequenos animais (Gil da Costa, 2015). O crescente interesse acerca dessa neoplasia resultou no estabelecimento de uma crescente lista de fatores prognósticos e, até mesmo preditivos, capazes de, respectivamente, predizer o comportamento tumoral e inferir o uso de tratamentos específicos (Dobson e Scase, 2007; London e Thamm, 2013; Gil da Costa, 2015). Inúmeros fatores prognósticos foram propostos, incluindo estadiamento clínico (Blackwood et al., 2012), raça (McNiel et al., 2004; London e Thamm, 2013), localização tumoral (Hillman et al., 2010; London e Thamm, 2013), histórico de recorrência tumoral (Bostock, 1973; Patnaik et al., 1984), duas graduações histológicas (Patnaik et al., 1984; Kiupel et al., 2011), contagem de figuras mitóticas (Romansik et al., 2007), porcentagem de imuno-expressão de Ki-67 (Maglennon et al., 2008; Strefezzi et al., 2010), padrão de imunoexpressão do receptor KIT (KITr) (Kiupel et al., 2004; Webster et al., 2006a) e presença de mutações no gene *c-kit*, que pode, inclusive, direcionar o tratamento para o uso de pequenas moléculas inibidoras da tirosina kinase (Zemke et al., 2002; Webster et al., 2006b; Webster et al., 2008). Entretanto, observou-se a independência desses fatores prognósticos e, ainda assim, grande parte do conhecimento gerado sobre os mastocitomas caninos foi obtida de estudos com caracterização insuficiente dos tumores e falha na padronização dos tratamentos (Dobson e Scase, 2007).

Um amplo espectro de tratamentos adjuvantes e neoadjuvantes foram propostos envolvendo glicocorticóide (GC), radioterapia (RT), quimioterapia (QT) – com destaque para os protocolos envolvendo os fármacos vimblastina, lomustina, ciclofosfamida e hidroxiuréia – e inibidores tirosina kinase (TKIs, *tyrosine kinase inhibitors*) – incluindo masitinib e toceranib. Entretanto, ainda faltam critérios para a tomada de decisões e escolha do tratamento mais adequado para esses pacientes (Warland et al., 2015).

O objetivo desse estudo foi avaliar e reunir os fatores prognósticos nos mastocitomas caninos, agrupando-os conforme o risco de recorrência ou metástase, e instituição do tratamento mais apropriado, para posterior análise do intervalo livre de doença (ILD) e sobrevida global (SG), consituindo um guia para prognóstico e tratamento dessa neoplasia.

REVISÃO DE LITERATURA

Distúrbios proliferativos dos mastócitos:

Os distúrbios proliferativos dos mastócitos incluem, além do mastocitoma, a mastocitose sistêmica e a leucemia mielóide de mastócitos (Bain, 1999).

O termo mastocitose é utilizado para descrever processos de causa desconhecida, caracterizados pela proliferação sistêmica de mastócitos neoplásicos ou não-neoplásicos, com aumento dessas células na circulação sanguínea (mastocitemia), medula óssea, linfonodos, baço e fígado (Lund e Park, 1978; Stockham et al., 1983, London, 2010).

A leucemia mielóide de mastócitos, mais frequentemente diagnosticada em gatos do que em cães, é uma doença rara na Medicina Veterinária, eventualmente associada à mastocitose sistêmica (Davies et al., 1981). Apesar da inexistência de critérios de classificação, seu diagnóstico é baseado na identificação de concentrações de mastócitos iguais ou superiores a 10%, dentre os leucócitos, no sangue periférico de animais com mastocitose sistêmica (Davies et al., 1981; London, 2010), ou quando são identificados mais de 1% de mastócitos nas células nucleadas da medula óssea (Fox, 1998). Na Medicina, no entanto, o paciente deve, necessariamente, apresentar mastócitos atípicos circulantes, com características citoquímicas de mastócitos e infiltração difusa de mastócitos atípicos na medula óssea (London, 2010).

Proliferações não neoplásicas de mastócitos, ou simplesmente hiperplasias, similares à urticária pigmentosa em humanos, podem ocorrer em cães de idades variáveis, cursando com prurido, mas com cura espontânea ou remissão completa e duradoura após o uso de GCs (Davis et al., 1992; Welle et al., 2008; London e Thamm, 2013).

Biologia dos mastócitos:

Mastócitos são células hematopoiéticas derivadas de progenitores pluripotentes CD34+ da medula óssea (Kirshenbaum et. al., 1991), que circulam no sangue e migram para o tecido conjuntivo, onde sofrem maturação e desempenham funções relacionadas ao sistema imunológico (Lemarié et. al., 1995). Podem ser observados, ocasionalmente, na medula óssea e, raramente, no sangue periférico, onde sua presença é considerada anormal e pode indicar doença inflamatória, necrose, injúria tissular e anemia regenerativa grave (Friederichs e Young, 2013). Estão presentes na maioria dos órgãos e tecidos das diferentes espécies animais, sendo encontrados, em maior concentração, em locais que possuem contato primário com antígenos externos, como a pele, pulmões e trato gastrointestinal (Page e Foreman, 1993). Uma quantidade discreta de mastócitos pode ser encontrada, também, na região paracortical (zona de linfócitos T) dos linfonodos (Lund e Park, 1978; Tomita et. al., 2003).

Morfológicamente, os mastócitos podem ser reconhecidos por serem células relativamente grandes, fusiformes ou esféricas, contendo núcleo redondo ou ovóide e citoplasma repleto de grânulos de coloração vermelha arroxeada, evidenciados pelo Giemsa ou Azul de Toluidina (metacromáticos), mas também pelo Panótico (Friederichs e Young, 2013). Esses grânulos armazenam mediadores inflamatórios que incluem histamina, heparina, enzimas proteolíticas, fatores de crescimento, fatores quimiotáticos, citocinas (fator de necrose tumoral-alfa, interleucina-6) e metabólitos do ácido araquidônico, que conferem aos mastócitos importante função nas reações imunológicas (quimiotaxia de neutrófilos e eosinófilos, indução de resposta inata), inflamatórias (aumento da permeabilidade vascular, vasodilatação, aumento do tempo de

coagulação sanguínea, cicatrização de feridas) e alérgicas (prurido, modulação da resposta anti-parasitária) do organismo (Galli et. al., 2005).

A ligação da imunoglobulina E ao receptor presente na membrana dos mastócitos é um importante mecanismo de ativação dessas células, no entanto, a maturação, diferenciação e degranulação dos mastócitos é modulada, principalmente, pelo fator de mastócito/célula-tronco (mast/stem cell factor, SCF), ou simplesmente ligante KIT (London e Thamm, 2013). Mastócitos completamente diferenciados mantêm a capacidade mitótica, de forma que mastocitomas de baixo grau também apresentam potencial para proliferação (Cury et. al., 1998). Citocinas, anti-inflamatórios esteroidais e não-esteroidais também exercem efeito importante na função dos mastócitos e a destruição dessas células por agentes quimioterápicos pode resultar em degranulação química, conforme descrito em pacientes tratados com doxorubicina (London e Thamm, 2013).

Incidência e fatores de risco:

O mastocitoma ocorre, principalmente, em cães idosos, com idade média de oito a nove anos, sendo relatado, entretanto, em pacientes jovens, sem predileção sexual (London e Thamm, 2013). Cães sem raça definida representam a maior parte da população acometida por essa patologia, no entanto, algumas raças parecem apresentar maior risco para o desenvolvimento de mastocitomas cutâneos, como é o caso daquelas que apresentam o Buldogue como ancestral comum (ex.: Boxer, Boston terrier e Buldogue inglês) e das raças Labrador, Golden retriever, Cocker spaniel, Schnauzer, Beagle, Rhodesian, Weimaraner e Shar-pei (Welle et. al., 2008; London e Thamm, 2013).

Etiologia

A causa para o desenvolvimento do mastocitoma canino não é bem definida, mas existem evidências de origem multifatorial, sendo que a maior incidência dessa patologia em determinadas raças, sugere, a existência de fatores de risco genético (London e Thamm, 2013).

As alterações genéticas envolvidas na carcinogênese do mastocitoma canino ainda não são completamente compreendidas. Apesar da importância de alterações na função do gene supressor de tumor p53 na espécie humana, mutações foram identificadas em um pequeno número de pacientes com mastocitoma, embora, alterações na função da proteína p53, possam estar relacionadas a outros mecanismos como a superexpressão do proto-oncogene MDM-2, cuja proteína está relacionada ao transporte da p53 para o citoplasma, onde esta deveria ser degradada (Strefezzi et al., 2009). A superexpressão dos inibidores de ciclina dependentes de quinase CDKN1A (gene p21) e CDKN1B (gene p27), induzida por p53, parece, estar relacionada, respectivamente, à progressão e desenvolvimento inicial do mastocitoma em cães (Strefezzi et al., 2009; London e Thamm, 2013).

A anormalidade molecular mais bem descrita no mastocitoma canino envolve a atividade do receptor KIT (KITr;), codificado pelo proto-oncogene *c-kit*, (Strefezzi et al., 2009; London e Thamm, 2013), cujo mapeamento, na espécie canina, permitiu sua identificação, no cromossomo 13, entre os nucleotídeos 1661 a 1787 (NCBI, National Center for Biotechnology Information). Trata-se de uma proteína tirosina-quinase, transmembrana, do tipo III, cujo substrato é identificado como SCF. Segundo Roskoski (2005) essa proteína apresenta uma porção extracelular composta por cinco domínios do tipo imunoglobulina (codificados pelos exons 1-9), um segmento transmembranar único (codificado pelo exon 10) e outro intracelular. A porção intracelular do receptor é formada por um domínio justamembranar de regulação

negativa (codificado pelos exons 11 e 12) e um domínio tirosina-quinase citoplasmático dividido em um sítio de ligação ao ATP (codificada pelo exon 13) e um lobo fosfotransferase (codificado pelo exon 17), conforme demonstrado na figura 1.

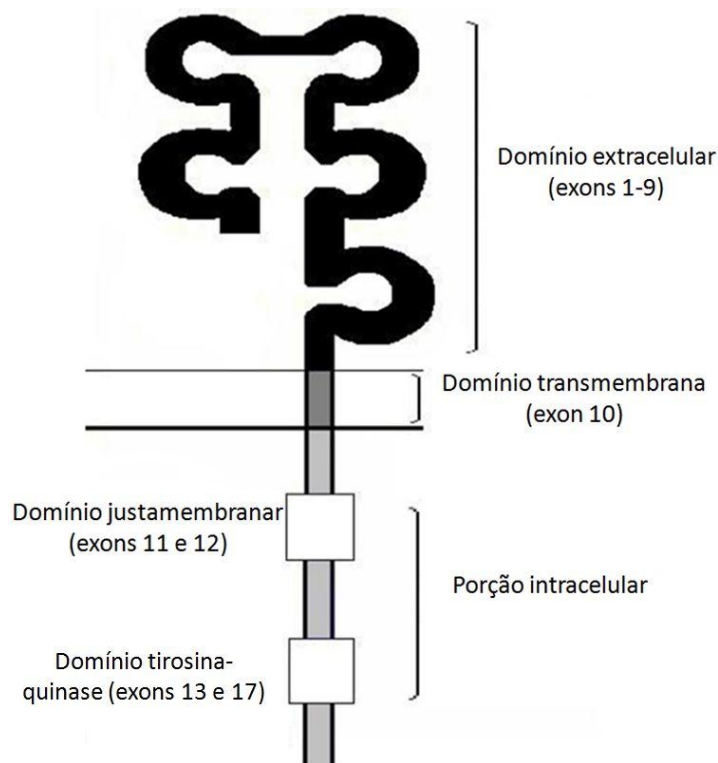


Figura 1 – Desenho esquemático do receptor KIT (KITr), incluindo os exons responsáveis pela codificação de cada segmento (adaptado de Webster et al., 2006a).

A interação entre SCF e KITr induz a dimerização do receptor, com conseqüente ativação do domínio tirosina-quinase, que sofre autofosforilação e promove a fosforilação de substratos endógenos, com ativação de inúmeras vias celulares específicas, que resultam na diferenciação, proliferação, sobrevivência e ativação celular, conforme demonstrado na figura 2 (Roskoski, 2005; London e Thamm, 2013; Marech et al., 2014).

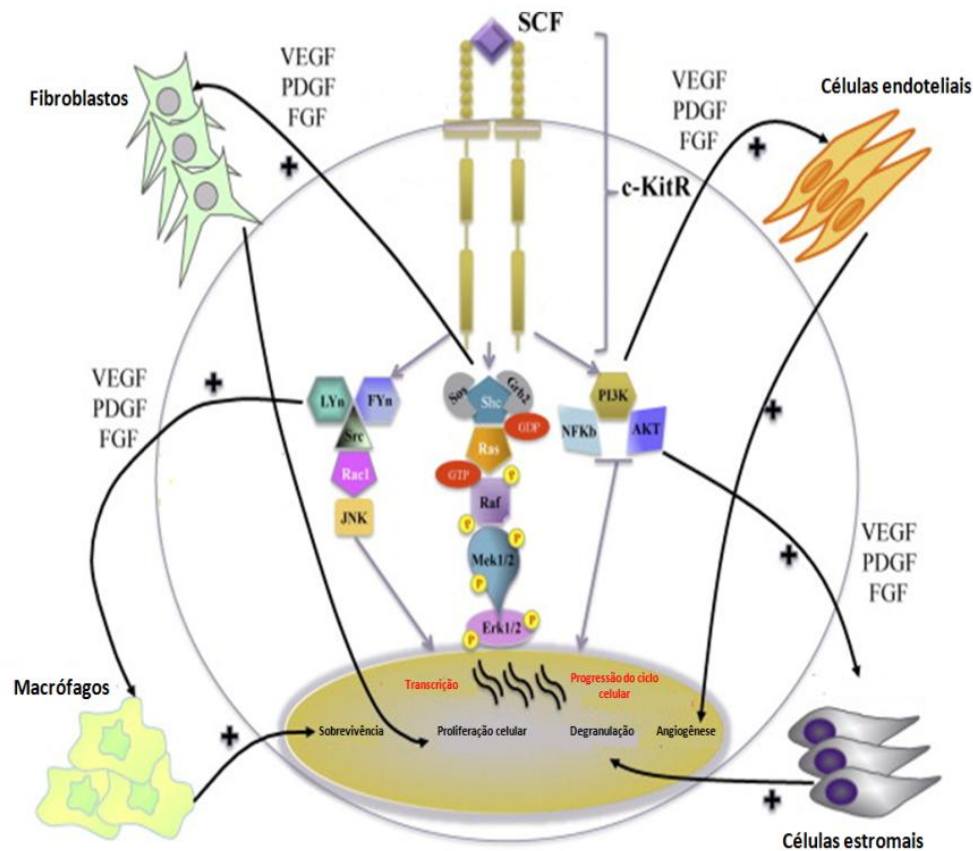


Figura 2 – Desenho esquemático representando o mastócito e as vias celulares ativadas a partir da ativação do receptor KIT (c-KitR) pelo fator de células-tronco (SCF, stem cell factor) (adaptado de Marech et al., 2014). A via MAPK (mitogen-activated protein kinase) está representada pelas proteínas-quinases Erk (extracellular signal-regulated kinase) e JNK (c-Jun N-terminal kinase). Receptores ativados resultam no recrutamento de subunidades adaptadoras como SHC (src homology-2 domain containing), proteína ligante de fator de crescimento-2 (GRB-2, growth factor receptor bound protein-2) e proteína SON (son of sevenless), o que resulta na transferência de um grupo fosfato à proteína RAS (rat sarcoma), do tipo guanilil-ciclase (ativada após transformação do GDP em GTP). A cascata atinge a proteína-quinase RAF (rapidly accelerated fibrosarcoma), que é fosforilada pela proteína RAS, com conseqüente fosforilação e ativação das proteínas-quinases MEK-1 e MEK-2 e, posteriormente, Erk-1 e Erk-2. De forma alternativa, ocorre ativação das proteínas-quinases LYN (Lck/Yes novel tyrosine kinase), Fyn e SRC (sarcoma de Rous), que provocam a fosforilação e ativação da proteína guanilil-ciclase Rac1 e, posteriormente JNK. A via AKT, está relacionada à ativação da proteína-quinase AKT (proteína-quinase B). Receptores ativados resultam na estimulação de proteínas de ligação ao PI3K (phosphatidyl inositol 3-kinase), como p85 e p110, resultando na formação do segundo mensageiro phosphatidyl inositol-3, 4, 5-trifosfato (PIP3) que termina no recrutamento do fator nuclear kappa b (NFkB, nuclear factor kappa b) e AKT, provocando sua fosforilação. A proteína AKT, no entanto, resulta na ativação de inúmeras vias secundárias, relacionadas a sobrevivência e proliferação celular, com destaque para a via mTOR (mechanistic/mammalian target of rapamycin), p21, p27 e quinase glicogênio-sintase-3 (GSK-3, glycogen synthase kinase-3). O resultado final da ativação das vias MAPK e AKT é a estimulação de fatores de transcrição relacionados à sobrevivência, proliferação e degranulação dos mastócitos, intensificados devido à estimulação constitutiva do receptor KIT ou aumento de sua expressão. A degranulação resulta na liberação de substâncias pró-angiogênicas intrínsecas dos mastócitos, com destaque para triptase, fator de crescimento endotelial vascular (VEGF, vascular endothelial growth factor), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF, platelet-derived growth factor) e fator de crescimento de fibroblastos (FGF, fibroblasts growth factor), com ação nas células estromais, macrófagos, células endoteliais e fibroblastos.

Mutações no *c-kit*, podem resultar em ganho de função, por desregulação (ativação constitutiva), aumento da expressão, ou maior ativação das vias sinalizadas pelo KITr, muitas vezes, independente da ligação ao substrato, e estão associadas à patogênese de diversas doenças no cão e na espécie humana (Jones et al., 2004). Na espécie humana, 90% dos pacientes com tumor estromal gastrointestinal, apresentam mutações no gene *c-kit*, principalmente no exon 11 (Sleijfer et al., 2008), enquanto mutações no exon 17 estão associadas a mastocitose sistêmica (Webster et al., 2006a). A ativação constitutiva de KITr, associada às mutações, também foram identificadas em pacientes humanos com leucemia mieloide aguda, melanoma, linfoma de células T sinovial e seminomas (Roskoski, 2005).

No mastocitoma canino, alterações no padrão de expressão de KITr foram investigadas em inúmeros estudos, e mutações no gene *c-kit* podem ser identificadas em aproximadamente 9-40% dos pacientes, com importância na carcinogênese e progressão da doença, podendo influenciar na decisão terapêutica (Zemke et al., 2002; Jones et al., 2004; Webster et al., 2006b, Letard et al., 2008; Welle et al., 2008; Avery, 2012).

Historicamente o mastocitoma tem sido associado a inflamações crônicas decorrentes da aplicação de substâncias irritantes (Peterson, 1985; Cayate et al., 1995), no entanto, isso justifica apenas parcialmente a epidemiologia e distribuição das lesões, no cão (London e Thamm, 2013). A existência de receptores citosólicos em mastócitos para estrógeno e progesterona influencia na função celular, por mecanismos ainda não esclarecidos (London e Thamm, 2013). Não existem evidências do envolvimento de agentes virais e, apesar do mastocitoma ter sido transplantado em condições laboratoriais, para cães jovens e imunossuprimidos, nenhuma partícula viral foi observada e a epidemiologia da doença, também não apoia a ocorrência de transmissão horizontal (Downing et al., 2002; London e Thamm, 2013).

Comportamento biológico e apresentação clínica

Indiscutivelmente, a característica mais problemática do mastocitoma canino é a imprecisão de seu comportamento biológico, que pode variar desde uma patologia indolente até uma doença altamente maligna e metastática (Dobson e Scase, 2007).

A grande maioria dos mastocitomas ocorre como formações solitárias dermoepidérmicas, superficiais, que se movimentam juntamente com a pele, ou subcutâneas, nas quais é possível mover a pele sobrejacente, livremente, acima do tumor (Couto, 2010). O mastocitoma cutâneo ocorre com uma distribuição de 50-60% no tronco, 25-40% nos membros e 10-15% na cabeça e pescoço, com menor frequência na bolsa escrotal, períneo, dorso e cauda (Welle et al., 2008).

Macroscopicamente, o mastocitoma cutâneo pode mimetizar qualquer lesão primária ou secundária da pele, incluindo pápula, nódulo, tumor, erosão, úlcera e crosta (Welle et al., 2008; Couto, 2010). Considerando as limitações inerentes à avaliação clínica de lesões neoplásicas, a aparência macroscópica do mastocitoma pode ser correlacionada à sua graduação histológica (Welle et al., 2008). Lesões de baixo grau, bem diferenciadas, tendem a se apresentar como nódulos solitários, bem delimitados, de um a quatro centímetros de diâmetro, presentes por mais de seis meses antes da busca por assistência veterinária (Welle et al., 2008; London e Thamm, 2013). Estas normalmente não são ulceradas, mas podem apresentar consistência macia à firme e áreas de alopecia. Quando localizados no subcutâneo, a consistência normalmente é macia, sendo indistinguíveis, macroscopicamente, dos lipomas comuns (Welle et al., 2008; Couto, 2010). Mastocitomas de alto grau, indiferenciados, apresentam tamanho variável, mas o crescimento rápido, normalmente, é acompanhado de ulceração e irritação dos tecidos

adjacentes (Welle et al., 2008; London e Thamm, 2013). Em alguns casos os nódulos podem apresentar-se eritematosos ou hiperpigmentados com inflamação e edema do tecido adjacente. Mastocitomas localizados nos membros posteriores, principalmente em cães da raça Shar-pei, podem apresentar crescimento exagerado com deformação e necrose do membro (Welle et al., 2008). A manipulação excessiva de um mastocitoma cutâneo pode levar à degranulação das células com liberação de histamina e outras substâncias vasoativas, o que resulta em vasodilatação, edema e eritema no tecido circundante ao tumor, caracterizando um fenômeno conhecido como sinal de Darier (Welle et al., 2008; London e Thamm, 2013).

A metástase ocorre preferencialmente por via linfática e, embora o verdadeiro potencial metastático seja desconhecido, todo mastocitoma, independente de sua graduação, é passível de metastização, mas esse processo ocorre, de fato, em aproximadamente 20% dos mastocitomas caninos (London e Thamm, 2013). Entretanto, embora a metástase ocorra em menos de 10-15% dos mastocitomas bem diferenciados (Welle et al., 2008; Giantin et al., 2014), pode ocorrer em mais de 90% dos tumores indiferenciados, normalmente com envolvimento de linfonodos regionais, podendo ocorrer metástases no fígado e baço, sendo raro o acometimento pulmonar (Welle et al., 2008; London e Thamm, 2013). Mastocitomas de alto grau podem permitir o crescimento de pequenos nódulos satélites nos tecidos adjacentes conforme o tumor se dissemina pelos vasos linfáticos da pele (Dobson e Scase, 2007; Welle et al., 2008). 10-15% dos pacientes podem desenvolver lesões múltiplas, de forma concomitante ou sequencial, sendo virtualmente impossível determinar se este fenômeno representa uma forma atípica de metástase ou tumores independentes (London e Thamm, 2013). A invasão da medula óssea corresponde à doença em seu estadiamento final, que caracteriza uma leucemia mielóide de mastócitos, resultando em dramática redução na sobrevida do paciente (Owen, 1980; Dobson e Scase, 2007; Welle et al., 2008; London e Thamm, 2013).

Embora os mastócitos sejam encontrados em abundância nos pulmões e no trato gastrointestinal, o mastocitoma visceral primário é raro no cão, provavelmente, devido à menor exposição à agentes carcinogênicos (Daleck et. al., 2009). No entanto, sítios primários extracutâneos já foram relatados no trato gastrointestinal (Ozaki et. al., 2002), ureter (Steffey et. al., 2004), medula espinhal (Moore et. al., 2002), laringe (Crowe et. al., 1986) e traquéia (Harvey e Sykes, 1982). Normalmente, o mastocitoma visceral, no cão, representa um foco metastático de uma lesão cutânea indiferenciada primária, acompanhando linfadenopatia e hepatoesplenomegalia (O'Keefe et. al., 1987). Nesses casos podem ser evidenciadas efusões cavitárias contendo elevada concentração de mastócitos neoplásicos (North e Banks, 2009; London e Thamm, 2013).

Mastocitomas primários de linfonodos são extremamente raros, mas existem relatos de acúmulos não neoplásicos de mastócitos em nódulos linfáticos de cães (Lund e Park, 1978; Tomita et. al., 2003), podendo progredir para uma alteração maligna, sem a existência de outros focos tumorais (Patnaik et. al., 1982). Na espécie humana, a migração de mastócitos não neoplásicos em direção à pele, linfonodos e outros órgãos está associada a processos inflamatórios e lesões teciduais diversas, nas quais os mastócitos atuam inibindo a progressão da doença (Hochegger et. al., 2005) e processos fisiológicos semelhantes, também, podem ocorrer no cão. Agentes carcinogênicos, como a radiação ultravioleta, podem ativar a migração de mastócitos em direção aos linfonodos, influenciando na resposta imune adaptativa (Byrne et. al., 2008). O acúmulo de mastócitos nos linfonodos mediastinais de seres humanos com câncer pulmonar, parece influenciar na progressão da doença a partir da liberação de componentes anti-

tumorais, embora também esteja associado com o aumento da angiogênese (Tomita et. al., 2003).

Síndromes paraneoplásicas

As síndromes paraneoplásicas representam um grupo diverso de manifestações clínicas associadas a uma neoplasia benigna ou maligna (Bergman, 2013). Essas alterações ocorrem em sítios distantes do tumor ou de suas metástases (Mangieri, 2009) e não podem ser explicadas apenas pela existência de um tumor em determinado órgão ou por alterações nas funções desses órgãos (Brasileiro Filho et al., 2009).

A degranulação dos mastócitos e liberação de substâncias ativas podem provocar sinais sistêmicos caracterizados como síndromes paraneoplásicas, ocorrendo em mais da metade dos cães com mastocitoma, com maior gravidade em pacientes com a doença em estágio avançado (Teske et. al., 2007).

A liberação de heparina promove efeito anticoagulante, o que pode favorecer a ocorrência de hemorragias de maior magnitude durante a cirurgia, enquanto, a ação de enzimas proteolíticas e aminas vasoativas podem provocar deiscência ou atraso na cicatrização de feridas cirúrgicas (Dobson e Scase, 2007; London e Thamm, 2013). A liberação de histamina resulta em estímulo de receptores H1 e H2 em macrófagos, com liberação do fator de supressão fibroblástica, que reduz a fibroplasia, retardando a cicatrização (Welle et al., 2008).

A histamina estimula também os receptores H₂ das células parietais do estômago, o que provoca excessiva secreção de ácido clorídrico, que pode resultar em gastrite crônica com espessamento da mucosa gástrica, redução do apetite, vômitos e emagrecimento (Welle et al., 2008; London e Thamm, 2013). Danos vasculares concomitantes podem favorecer a ocorrência de úlceras pépticas caracterizadas por anorexia, hematemesa, melena, hematoquezia, anemia, dor abdominal, e, em alguns casos, perfuração intestinal com peritonite (Dobson e Scase, 2007; London e Thamm, 2013). Mastócitos neoplásicos apresentam 25-50 vezes mais histamina do que mastócitos normais, resultando em concentração plasmática elevada dessa substância em até 75% dos cães com mastocitoma, o que resulta em aumento da concentração de ácido clorídrico no estômago, exercendo um sinal de retroalimentação negativo sobre as células G do antro da mucosa gástrica, com redução dos níveis plasmáticos de gastrina, embora apenas 30% desenvolvam sinais gastrointestinais (Welle et al., 2008; London e Thamm, 2013)). Em raras situações, a liberação de histamina, e outras substâncias vasoativas, pode, ainda, resultar em colapso circulatório e choque (London e Thamm, 2013).

Diagnóstico e estadiamento

A citologia, indicada sempre que a decisão terapêutica possa ser alterada, é a conduta de escolha para o diagnóstico do mastocitoma, sendo a punção aspirativa por agulha fina (PAAF) o método de coleta mais difundido (Friedrichs e Young, 2013). O procedimento é ideal em uma abordagem inicial do paciente, pois é simples, minimamente invasivo e permite um melhor planejamento clínico-cirúrgico (Lavallo et al., 2003; Friedrichs e Young, 2013). Os linfonodos regionais também devem ser investigados, principalmente quando houver alteração de forma, consistência ou volume (Horta et al., 2013). Entretanto, concentrações variáveis de mastócitos podem ser observadas em linfonodos normais, em até 24% dos cães hígidos (Bookbinder et al., 1992). Diante desse impasse, critérios citológicos para o diagnóstico de metástases em linfonodos foram propostos por Krick et al. (2009), entretanto, os casos iniciais ou suspeitos permaneceram classificados como possível ou provável metástase.

Uma vez estabelecido o diagnóstico e o envolvimento de linfonodos regionais, é importante prosseguir com o estadiamento clínico, com a finalidade de definir a extensão da doença naquele paciente, conforme preconizado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e disposto na tabela 1 (Owen, 1980). A pesquisa de metástases distantes consiste na investigação dos sítios metastáticos mais frequentemente acometidos pelo mastocitoma, com destaque para fígado e baço, com auxílio da ultrasonografia abdominal e, no caso de exames suspeitos, da citologia aspirativa guiada por ultrassom, embora concentrações variáveis de mastócitos possam ocorrer, também, nesses órgãos (London e Thamm, 2013). Segundo Warland et al. (2014), as recomendações anteriores sobre a realização do mielograma, para o estadiamento clínico de cães com mastocitoma, são incoerentes, tendo em vista a natural presença de mastócitos na medula óssea de cães saudáveis e a ausência de critérios para caracterização da invasão medular, e, embora Fox (1998) tenha sugerido que a presença de dez mastócitos em 1000 células nucleadas na medula óssea (1%) seja altamente sugestiva de invasão medular, esse tipo de progressão é, em geral, um evento tardio, com grave impacto clínico, em pacientes com mastocitoma (London e Thamm, 2013; Warland et al., 2014).

Hemograma, urinálise e análises bioquímicas incluindo provas de função renal, lesão e função hepática são importantes para avaliação do estado geral do paciente, portador de doença crônica, apesar de não influenciarem no estadiamento clínico proposto pela OMS (London e Thamm, 2013). Anemia pode ocorrer em decorrência do seqüestro esplênico de hemácias (esplenomegalia), sangramentos gastrointestinais e invasão de medula óssea, no entanto mais frequentemente é consequência da doença crônica, com etiologia multifatorial resultante do seqüestro de ferro, redução da meia-vida dos eritrócitos e decréscimo da eritropoiese (Feldman et al., 1981; Miller et al., 2009).

Apesar da elevada taxa de concordância com a citologia, o exame histopatológico não pode ser dispensado após a excisão cirúrgica, pois é essencial para se determinar o grau de diferenciação e invasão do tumor, precisar as margens cirúrgicas e definir o nível de comprometimento de linfonodo regionais eventualmente removidos (Lavalle et al., 2003; London e Seguin, 2003; London e Thamm, 2013; Weishaar et al., 2014).

As características morfológicas dos mastócitos facilitam a caracterização dessas células pelo patologista, no entanto, muitas vezes, o elevado grau de indiferenciação da neoplasia torna desafiador o diagnóstico baseado apenas na citologia ou histologia de rotina (Friedrichs e Young, 2013). A utilização de colorações especiais como o Azul de Toluidina ou Giemsa podem auxiliar no diagnóstico citológico e histológico do mastocitoma, por apresentarem maior afinidade pelos grânulos, no entanto, algumas vezes, o diagnóstico só pode ser realizado com auxílio da imuno-histoquímica (Fernandez et. al., 2005).

A célula neoplásica, por mais indiferenciada que se encontre mantém a expressão de determinados filamentos intermediários citoplasmáticos, receptores de membrana e moléculas nucleares, permitindo a marcação imuno-histoquímica e definição da histogênese com diagnóstico definitivo para tumores anaplásicos e metástases (Linder, 1990).

A vimentina, expressa nos mastócitos, representa um dos principais filamentos intermediários presente nas células mesenquimais (Werner et. al., 2005), enquanto a proteína serina quinase triptase, de função ainda desconhecida, é consistentemente identificada nos mastócitos, com elevada sensibilidade e especificidade para o diagnóstico, embora sem importância prognóstica (Kiupel et al., 2004). KITr é expresso, também de forma consistente, em mastócitos neoplásicos

e não neoplásicos (Araújo et al., 2012; Horta et al., 2012), influenciando no prognóstico dos pacientes com mastocitoma (Kiupel et al., 2004), embora seu epítipo CD117, possa ser identificado, também, pela reação imuno-histoquímica, em diferentes fases de progressão dos melanomas (Newman et al., 2011) e, ocasionalmente, em linfomas epiteliotrópicos e outras neoplasias hematopoiéticas (Giantin et al., 2013).

A avaliação imuno-histoquímica, por ser um método muito preciso auxilia, mas não é suficiente para se alcançar o diagnóstico definitivo de neoplasias indiferenciadas, que deve-se basear nas informações obtidas pelo clínico e pelo patologista (Horta et al., 2012).

Tabela 1 – Estadiamento clínico proposto pela Organização Mundial de Saúde para o mastocitoma em cães (adaptado de Owen, 1980)

Estágio	Descrição
I	Tumor único, confinado à derme, sem envolvimento de linfonodos regionais.
II	Tumor único, confinado à derme, com envolvimento de linfonodos regionais.
III	Tumores múltiplos ou grandes e infiltrativos, com ou sem envolvimento de linfonodos regionais.
IV	Qualquer tumor com metástase distante, incluindo invasão medular e presença de mastócitos no sangue periférico.

a,b: presença ou não de sinais sistêmicos.

Fatores prognósticos

Fatores prognósticos são parâmetros mensuráveis no momento do diagnóstico de uma neoplasia e que permitem prever o comportamento biológico e a evolução clínica do paciente. Algumas vezes, os fatores prognósticos assumem um caráter preditivo do tratamento a ser instituído, pois permitem a seleção de tratamentos direcionados para características individuais de determinados tumores (Abreu e Koifman, 2002). Apesar dos inúmeros fatores prognósticos propostos para o mastocitoma canino, existe baixa correlação entre eles e nenhum, isoladamente é capaz de prever seu comportamento biológico (London e Thamm, 2013).

O estadiamento clínico proposto pela OMS encontra-se diretamente relacionado ao prognóstico do paciente, no entanto, a verdadeira influência dos estágios II e III ainda é questionada (Dobson e Scase, 2007; Welle et al., 2008; London e Thamm, 2013).

O linfonodo regional é, frequentemente, o primeiro sítio metastático do mastocitoma canino (estágio II), representando um fator prognóstico desfavorável (Dobson e Scase, 2007; Welle et al., 2008; Hume et al., 2011; London e Thamm, 2013). Em um estudo conduzido por Hume et al. (2011), com 43 cães, portadores de mastocitomas de alto grau, foi observada SG de 194 dias para os pacientes com metástases em linfonodos regionais, em comparação a 503 dias para aqueles que não apresentaram metástases. O tratamento do linfonodo, envolvendo cirurgia, RT e/ou QT resultou em uma SG de 240 dias, enquanto aqueles pacientes que não foram tratados atingiram a mediana com 42 dias (Hume et al., 2011). Entretanto, ainda existem dificuldades na identificação e definição da importância das metástases em linfonodos, quando a arquitetura do órgão ainda está preservada, e pacientes com diagnóstico precoce de metástase regional podem apresentar elevada sobrevida após a exérese cirúrgica do linfonodo envolvido (Hume et al., 2011; London e Thamm, 2013; Weishaar et al., 2014). Weishaar et al. (2014) propôs, portanto, uma classificação histológica considerando o nível de comprometimento do linfonodo pelo mastocitoma em quatro categorias, conforme demonstrado na tabela 2. Esse estudo demonstrou, ainda, diferença no prognóstico ao comparar os pacientes com classificação HN0/1 (mediana não atingida) e aqueles com classificação HN2/3 (mediana de 804 e 1824 para ILD e SG,

respectivamente), sendo que 90% e 56% dos pacientes destes dois grupos, respectivamente, atingiram sobrevida de dois anos.

Tabela 2 – Sistema de classificação histológica do envolvimento de linfonodos pelo mastocitoma canino (adaptado de Weishaar et al., 2014)

Grau	Descrição	Critérios histopatológicos
HN0	Não metastático.	0-3 mastócitos isolados nos seios (subcapsular, paracortical ou medular) e/ou parênquima do linfonodo por campo 40x.
HN1	Pré-metastático	Mais que três mastócitos isolados nos seios (subcapsular, paracortical ou medular) e/ou parênquima do linfonodo por campo 40x, em no mínimo quatro campos.
HN2	Metástase inicial.	Agregados de mastócitos (mais que três células) nos seios (subcapsular, paracortical ou medular) e/ou parênquima, ou cordões sinusóides de mastócitos
HN3	Metástase avançada.	Alteração da arquitetura do linfonodo, com focos de mastócitos organizados em manto ou cordão.

Outra falha no estadiamento do mastocitoma canino reside no estágio III. A verdadeira influência de múltiplas lesões na evolução clínica, ainda deve ser elucidada, pois este fenômeno pode estar relacionado à ocorrência de metástases satélites e disseminação da doença, de forma multicêntrica – com impacto no prognóstico – ou, simplesmente, ao aparecimento de novas lesões independentes (“de novo” mastocitomas), sendo o histórico clínico fundamental para a compreensão da doença em cada paciente (Thamm et al., 1999; Dobson e Scase, 2007; Welle et al., 2008; London e Thamm, 2013).

A graduação histológica é, ainda, o fator prognóstico mais consistente e confiável para predição do comportamento biológico do mastocitoma canino, sendo os sistemas desenvolvidos por Bostock (1973) e Patnaik et al. (1984), os métodos tradicionalmente mais utilizados (Dobson e Scase, 2007; London e Thamm, 2013).

Ao considerar três graus de diferenciação, sendo tumores bem diferenciados classificados como grau 3 (Bostock, 1973) ou grau 1 (Patnaik et al., 1984), os tumores moderadamente diferenciados como grau 2 (Bostock, 1973; Patnaik et al., 1984) e tumores indiferenciados como grau 1 (Bostock, 1973) ou grau 3 (Patnaik et al., 1984), os autores foram capazes de prever o comportamento dessas neoplasias, sendo que mastocitomas indiferenciados resultaram em taxas metastáticas de 55 a 96% (Bostock, 1973). No estudo conduzido por Strefezzi et al. (2010), considerando apenas pacientes em que a excisão cirúrgica do tumor foi completa, a SG dos cães com tumores pouco diferenciados foi de 261 dias e dos pacientes com mastocitoma de grau 2 foi de 969 dias, enquanto nenhum paciente com mastocitoma bem diferenciado veio a óbito por motivo da doença. No entanto, esses sistemas de graduação não são capazes de detectar uma porcentagem expressiva (15-30%) de mastocitomas bem ou moderadamente diferenciados capazes de levar o paciente ao óbito (London e Thamm, 2013). O sistema proposto por Patnaik et al. (1984), considera a extensão e organização do tumor, pleomorfismo e granulação celular, presença de hemorragia, edema e necrose, células multinucleadas e figuras de mitose, entretanto, não estabelece critérios rígidos para a classificação (tabela 3), o que resulta em predomínio dos mastocitomas de grau 2 e variações entre observadores, principalmente ao que se refere aos tumores de diferenciação intermediária (Kiupel et al., 2004; Kiupel et al., 2011), mas apesar disso, permanece como o sistema mais utilizado pelos patologistas (Araújo et al., 2012).

Em um estudo realizado por Kiupel et al. (2011), 95 mastocitomas foram submetidos à avaliação histológica por 28 patologistas de 16 instituições, resultando em 53% de mastocitomas de grau 2, sendo que a concordância entre os profissionais foi de 75% para o grau

3 e 64% para os graus 1 e 2 inferindo baixo poder prognóstico. A partir desse estudo, foi proposta uma nova classificação baseada em critérios objetivos, e com apenas dois graus histológicos, sendo baixo e alto grau de indiferenciação, conforme demonstrado na tabela 4 (Kiupel et al., 2011). No estudo conduzido por Takeuchi et al. (2013), utilizando o sistema de Patnaik, não foi observada diferença na SG dos pacientes com mastocitoma de grau 1 e 2, mas aqueles com tumores de grau intermediário atingiram a mediana com 530 dias, superior àquela observada para os pacientes com tumores de grau 3 (208 dias). Ao utilizar o sistema de Kiupel, Takeuchi et al. (2013) demonstraram diferenças importantes na SG dos pacientes com mastocitomas de alto grau (Md = 208 dias) e baixo grau (Md = 1452 dias). Resultados semelhantes foram obtidos por Sbattini et al. (2014), que não observaram diferenças no prognóstico entre os pacientes com mastocitomas de grau 1 e 2, segundo a classificação de Patnaik, no entanto, quando a graduação de Kiupel foi utilizada, 14,4% dos mastocitomas de grau 2 apresentaram características de tumores de alto grau, de forma a permitir a identificação dos tumores de grau 2 que, de fato, apresentavam pior prognóstico. No entanto, embora tenha tido excelente aceitação por patologistas e clínicos, o sistema proposto por Kiupel também apresenta falhas e deve ser melhor validado, tendo em vista que, pacientes com tumores de alto grau podem, freqüentemente apresentar bom prognóstico, enquanto aqueles com tumores de baixo grau ainda podem enfrentar progressão desfavorável da doença (Giantin et al., 2014).

Tabela 3 – Sistema de graduação proposto por Patnaik et al. (1984), para o mastocitoma canino.

Grau	Descrição
I	Células neoplásicas confinadas à derme superficial, arranjadas em manto ou cordão e separadas por bandas de colágeno. O pleomorfismo celular é baixo e pode-se visualizar grânulos intracitoplasmáticos em grande quantidade. Figuras mitóticas raras ou ausentes
II	Células neoplásicas infiltradas na derme profunda e tecido subcutâneo, podendo invadir a musculatura esquelética, arranjadas em manto ou cordão e separadas por estroma colagenoso que pode estar espesso ou hialinizado (colagenólise). O pleomorfismo celular é moderado e raras células multinucleadas podem estar presentes. O índice mitótico varia de 0 a 2 mitoses por campo. Áreas de edema e necrose podem estar presentes.
III	Células neoplásicas se estendem para o subcutâneo e tecidos adjacentes. O pleomorfismo celular e nuclear é acentuado e os grânulos intracitoplasmáticos são dificilmente visualizados sem o auxílio de colorações histoquímicas (Giemsa ou azul de toluidina), sendo comum a identificação de células binucleadas. Figuras mitóticas frequentes, variando de 3 a 6 por campo. Edema, hemorragia e necrose são mais acentuadas.

Tabela 4 – Sistema de graduação proposto por Kiupel et al. (2011), para o mastocitoma canino.

Característica	Baixo grau	Alto grau
Figuras mitóticas	Até 6 figuras mitóticas em 10 campos (aumento de 1000x).	Mais de 6 figuras mitóticas em 10 campos (aumento de 1000x).
Células binucleadas	Até 2 células binucleadas em 10 campos (aumento de 1000x).	Mais de 2 células binucleadas em 10 campos (aumento de 1000x).
Núcleos bizarros (forma irregular, presença de edentações e segmentações)	Até 2 núcleos bizarros em 10 campos (aumento de 1000x).	Mais de 2 núcleos bizarros em 10 campos (aumento de 1000x).
Cariomegalia (núcleos duas vezes maiores que o esperado)	Menos de 10% das células neoplásicas.	Mais de 10% das células neoplásicas.

* Apenas um critério é suficiente para classificação como alto grau.

A influência da desregulação do KITr no prognóstico do mastocitoma canino foi investigada a partir da avaliação imuno-histoquímica do epítipo CD117 em amostras histopatológicas (London e Thamm, 2013). Diferentes padrões de imunomarcagem são descritos para mastócitos normais e neoplásicos (Reguera et al., 2000). Mastócitos não neoplásicos apresentam imunomarcagem membranar fraca e citoplasmática ausente, enquanto nos mastocitomas pode

ocorrer perda da expressão de membrana e aumento da expressão citoplasmática da proteína KITr, principalmente nas adjacências do núcleo (Reguera et al., 2000; Kiupel et al., 2004).

De acordo com Kiupel et al. (2004), os mastocitomas podem ser classificados em três grupos, com diferenças no prognóstico, considerando os padrões de expressão imuno-histoquímica para KITr. Dessa forma, KIT I corresponde à imunomarcção membranar dos mastócitos neoplásicos. A intensidade da coloração para este padrão pode variar desde àquela descrita para mastócitos não neoplásicos até marcações membranares fortes, com mínima coloração citoplasmática. O padrão KIT II pode ser caracterizado pela imunomarcção citoplasmática focal ou puntiforme, inicialmente perinuclear, com perda da coloração na membrana dos mastócitos neoplásicos. O padrão KIT III, por sua vez, corresponde à coloração citoplasmática difusa dos mastócitos neoplásicos, impedindo a visualização de outras características do citoplasma. O padrão de coloração deve ser atribuído para cada mastocitoma a partir daquele mais elevado, presente em pelo menos 10% das células neoplásicas (contagem de 100 células em aumento de 40x) ou em grandes agrupamentos de células neoplásicas dentro do tumor. As células localizadas nas bordas da lesão não devem ser consideradas para a classificação, para evitar a avaliação em células contendo possíveis artefatos da técnica. Os padrões II e III de imunomarcção representam uma localização aberrante desse receptor e encontram-se relacionados à maior risco de recorrência local e distante, e menor sobrevida, indicando pior comportamento biológico (Kiupel et al., 2004; Webster et al., 2006b; Webster et al., 2008). Apesar da maior taxa de expressão aberrante de KITr nos tumores pouco diferenciados, não existe relação entre o padrão de expressão e o grau histológico (Kiupel et al., 2011; Araújo et al., 2011). Em um estudo realizado por Araújo et al. (2011), com 78 mastocitomas, classificados segundo Patnaik et al. (1984) em grau 1 (34/78), 2 (27/78) e 3 (17/78), o padrão KIT I foi observado em 70,6% dos mastocitomas bem diferenciados, 59,3% dos mastocitomas de grau 2 e 11,8% dos mastocitomas pouco diferenciados; KIT II foi identificado em 29,4% dos mastocitomas bem diferenciados, 25,9% dos mastocitomas de grau 2 e 41,2% dos mastocitomas pouco diferenciados; enquanto o padrão KIT III não foi observado em mastocitomas de grau 1, mas ocorreu em 14,8% dos mastocitomas de grau 2 e 47,1% dos mastocitomas de grau 3. Entretanto, estudos recentes demonstraram fraca associação entre o padrão de expressão de KITr e o prognóstico de cães com mastocitoma (Giantin et al., 2012; Costa Casagrande et al., 2015).

A pesquisa de mutações no gene *c-kit*, em mastocitomas caninos, permitiram a identificação de alterações pontuais (adições ou substituições), duplicações e deleções nos exons 2, 5-11, 15 e 17, no entanto, mutações com ganho de função e impacto no prognóstico foram identificadas apenas nos exon 11 e 8 (Letard et al., 2008; Takeuchi et al., 2013). Takeuchi et al. (2013), incluiu a avaliação completa do gene *c-kit*, no mastocitoma de 47 cães, resultando na identificação de 34 mutações (72,3%), no entanto, apenas 21,2% ocorreram no exon 11 (sendo duplicações internas em tandem em 17%, deleção em 2,1% e translocação em 2,1%), 14,9% no exon 9 (inserções) e 6,4% no exon 8 (duplicações internas em tandem).

As duplicações internas em tandem (*internal tandem duplications*, ITD), localizadas no exon 11, comprometem a função de KITr, particularmente do domínio justamembranar de regulação negativa, de forma que a autofosforilação e ativação do receptor passa a ocorrer de forma constitutiva, independente da ligação ao substrato (Jones et al., 2004). De fato, representam as principais alterações genéticas identificadas no mastocitoma canino, ocorrendo com uma incidência de 9% (Zemke et al., 2002), 15% (Webster et al., 2006b), 17% (Takeuchi et al., 2013) e 33% (Downing et al., 2002). No estudo conduzido por Webster et al. (2006b), 6/9 ITD

no exon 11 do *c-kit* ocorreram em mastocitomas apresentando expressão aberrante de KITr, no entanto, tratam-se de eventos distintos e 80% dos pacientes com alterações na expressão de KITr não apresentaram mutações nesse locus gênico. Essas mutações são mais frequentemente detectadas em mastocitomas de graduação elevada, e raramente são identificadas em tumores bem diferenciados, com impacto no prognóstico do paciente (Zemke et al., 2002; Webster et al., 2006b; Webster et al., 2008; Avery, 2012; Takeuchi et al., 2013). Downing et al. (2002) observaram que mastocitomas com padrão mutante de duplicação gênica no exon 11, apresentaram risco relativo de recorrência e disseminação duas vezes maior que aqueles sem mutação. Em outro estudo, conduzido por Takeuchi et al. (2013), com 47 pacientes submetidos à cirurgia e diagnosticados com mastocitoma, oito apresentaram padrão mutante de duplicação gênica no exon 11 do gene *c-kit*, com intervalo livre de progressão da doença atingindo a mediana em 130 dias, enquanto os 39 pacientes sem mutação, atingiram a mediana em 345 dias.

Os exons 8 e 9 são responsáveis pela formação do quinto domínio extracelular tipo imunoglobulina no KITr, e mutações nesses loci são relevantes em doenças proliferativas, em seres humanos, particularmente na mastocitose sistêmica (exon 8) e tumor estromal gastrointestinal (exons 8 e 9), nas quais, podem favorecer a ligação ao SCF, resultando em maior ativação do receptor (Webster et al., 2006a). Apesar de epidemiologicamente relevantes no mastocitoma canino (Letard et al., 2008; Takeuchi et al., 20013), o impacto no prognóstico e tratamento deve, ainda, ser melhor explorado (Takeuchi et al., 2013).

A proliferação celular descontrolada se destaca entre as principais características de malignidade de uma neoplasia (Webster et al., 2007; Souza et al., 2008; Hanahan e Weinberg, 2011). O índice de proliferação celular, definido pela fração de crescimento (ou número de células em proliferação), em relação ao tempo de geração (velocidade de proliferação), é um fator prognóstico importante para diferentes tipos neoplásicos (Webster et al., 2007) e, apesar das inúmeras metodologias propostas para a avaliação da fração de crescimento, deve-se considerar também a influência do tempo de geração (Webster et al., 2007). A contagem das regiões organizadoras nucleares argirofílicas (*argyrophilic nucleolar organizer regions*, AgNOR), a partir da coloração histoquímica com impregnação pela prata, permite a identificação de estruturas relacionadas à transcrição do RNA ribossômico, o que resulta em uma avaliação, pouco precisa, da fração de crescimento, pois está relacionada, também, com a atividade metabólica e transcricional, mas apresenta elevada correlação com o tempo de geração em culturas celulares (Amorim, 2009). Dessa forma, embora pouco utilizada na rotina, uma avaliação fidedigna da proliferação celular só pode ser obtida pela associação das avaliações de fração de crescimento e tempo de geração (Webster et al., 2007).

A fração de crescimento, amplamente estudada nos mastocitomas caninos, pode ser avaliada na histologia de rotina, a partir da contagem de figuras mitóticas e a partir da imuno-histoquímica pela detecção do antígeno nuclear de proliferação celular (*proliferating cell nuclear antigen*, PCNA), expresso principalmente na fase S do ciclo celular e a proteína Ki-67 (reconhecida principalmente pelo anticorpo monoclonal MIB-1), expressa em todas as fases, exceto G0 (Webster et al., 2007; Webster et al., 2008; Strefezzi et al., 2010; Horta et al., 2012). O PCNA possui meia-vida muito longa, o que pode resultar em superestimação do número de células em divisão (Amorim, 2009), sendo o Ki-67 o marcador quantitativo não-subjetivo mais preciso para marcação do índice de proliferação celular, com valor prognóstico independente no mastocitoma canino (Dobson e Scase, 2007; Strefezzi et al., 2010; Horta et al., 2012; Vascellari et al., 2012). De acordo com Romansik et al. (2007), mastocitomas que apresentam a média de figuras mitóticas, obtida a partir da contagem em dez campos (40x), superior a cinco encontram-

se associados à redução da sobrevida do paciente e pior prognóstico, embora mastocitomas com menos de cinco figuras mitóticas possam, também, comportar-se de maneira agressiva. No estudo realizado por Webster et al. (2007), a contagem das células com imunomarcagem positiva para o MIB-1 foi realizada em cinco campos 10mmx10mm, selecionados de acordo com o maior número de células marcadas e, considerados “*hot-spots*”, utilizando-se uma gradícula 10x10, de 1cm², em objetiva de 40x. Observou-se que mastocitomas com mais de 23 células marcadas para MIB-1 em um ou mais campos “*hot-spots*”, encontram-se associados à maiores taxas de recorrência local (Webster et al., 2007). Strefezzi et al. (2010) não observaram diferenças no prognóstico dos pacientes com mastocitoma, de acordo com a marcação do PCNA, mas observaram taxas de mortalidade de 14,3% e 55,6% em pacientes com Ki-67 inferior ou superior a 7%, respectivamente, a partir da contagem de 500 células neoplásicas, em objetiva de 40x. No estudo conduzido por Maglennon et al. (2008), com mastocitomas de grau intermediário, foi proposto um valor de corte de apenas 1,8%, em relação ao prognóstico de mastocitomas de grau 2.

Outros marcadores prognósticos também têm sido propostos, com destaque para a ploidia de DNA, avaliada pela citometria de fluxo, sendo os tumores diplóides associados ao estadiamento mais avançado, no entanto, sem influência na sobrevida (Dobson e Scase, 2007; London e Thamm, 2013). A densidade de microvasos, avaliada com o auxílio de marcadores imuno-histoquímicos para a molécula de adesão celular endotelial plaquetária (CD31), encontra-se associada à invasão tecidual e índice mitótico (London e Thamm, 2013). Mastocitomas caninos expressam as metaloproteinases de matriz 2 (*matriz metalloproteinase-2*, MMP-2) e 9 (*matriz metalloproteinase-9*, MMP-9), relacionadas à degradação da lâmina basal, o que favorece a invasão e metástase, sendo observado aumento da expressão da proenzima MMP-9 nos tumores de alto grau (Leibman et al., 2000; Dobson e Scase, 2007). De forma semelhante, o aumento da expressão da proteína ativadora de fibroblasto (*fibroblast activating protein*, FAP) em fibroblastos associados ao tumor (*tumour associated fibroblast*, TAF), podem estar relacionados a um pior prognóstico para os mastocitomas caninos (Giuliano et al., 2015). A COX-2 (ciclo-oxigenase 2), expressa de forma indutiva em determinados processos neoplásicos, encontra-se relacionada à progressão tumoral, pois além de manter a resposta inflamatória, favorecendo o processo de carcinogênese, provoca a inibição da apoptose, redução da adesão celular, destruição da membrana basal, aumento da proliferação celular e da angiogênese (Costa et al., 2002; Prada et al., 2012; Mutsaers, 2013). No entanto, apesar da elevada expressão de COX-2 nos mastocitomas caninos (78-86%), não foi observado impacto na sobrevida e não houve diferença entre os graus histológicos, o que sugere baixo poder prognóstico e preditivo desse marcador (Prada et al., 2012; Vascellari et al., 2012).

Em determinadas raças de cães, com destaque para aquelas que possuem o Buldogue como ancestral comum, o mastocitoma tende a apresentar melhor comportamento biológico (London e Thamm, 2013). Uma situação contrária pode ser observada em cães da raça Shar-pei, principalmente para tumores de crescimento exagerado, deformação, necrose e ulceração (Welle et al., 2008; London e Thamm, 2013).

A localização tumoral também representa um fator prognóstico em potencial (Dobson e Scase, 2007; London e Thamm, 2013). Mastocitomas conjuntivais apresentam bom prognóstico, no entanto, aqueles localizados na pina da orelha, regiões inguinal, prepucial, escrotal, subungueal e junções mucocutâneas, incluindo cavidade oral, cavidade nasal e períneo, têm sido historicamente associados a um prognóstico desfavorável, embora existam também relatos de tumores com bom comportamento biológico nessas regiões (Dobson e Scase, 2007; Welle et al.,

2008; London e Thamm, 2013). Segundo Thompson et al. (2011), mastocitomas restritos ao tecido subcutâneo, sem aderências à pele, apresentaram prognóstico favorável, sendo que em 306 cães, ocorreram metástases e recorrência local, respectivamente, em apenas 4 e 8% dos pacientes. Pacientes com mastocitomas primários de vísceras ou que apresentam sinais clínicos de anorexia, melena, eritema generalizado e edema associados à degranulação dos mastócitos apresentam prognóstico reservado à desfavorável (Dobson e Scase, 2007; London e Thamm, 2013).

Michels et al. (2002) e Miller et al. (2014) não observaram qualquer vantagem, em termos de ILD e SG, em pacientes com mastocitoma que tiveram evidências histológicas de margens livres e essa, provavelmente não é uma informação relevante para o prognóstico do mastocitoma canino, embora estudos controlados sejam necessários para se definir a real importância da obtenção de margens cirúrgicas livres nesses pacientes.

Por fim, a recorrência dos mastocitomas após a excisão cirúrgica encontra-se claramente associada a um prognóstico reservado, sendo o planejamento cirúrgico adequado, fundamental para promover o aumento da sobrevida desses pacientes (Bostock, 1973; Patnaik et al., 1984; Thamm et al., 1999; Michels et al., 2002).

Tratamento

Tendo em vista a extensa lista de fatores prognósticos estabelecidos para o mastocitoma canino e a ampla variação do comportamento biológico, a tomada de decisões a respeito do tratamento é complexa, devendo ser baseada nas informações prognósticas e preditivas estabelecidas pela literatura (London e Thamm, 2013; Warland et al., 2015).

A cirurgia é o tratamento de escolha para os tumores localizados na pele, em regiões que permitam ampla excisão (Dobson e Scase, 2007; London e Thamm, 2013). Historicamente, margens cirúrgicas de três a cinco centímetros, em cada direção do tumor, inclusive na profundidade, têm sido recomendadas (Dobson e Scase, 2007; London e Thamm, 2013). A excisão incompleta do mastocitoma é historicamente associada ao maior risco de recorrência local, no entanto, existem evidências de que as margens cirúrgicas não constituem um pré-requisito para o controle, a longo prazo, de mastocitomas bem diferenciados (Dobson e Scase, 2007), da mesma forma, que tumores de alto grau, possam recidivar, apesar da constatação de margens cirúrgicas completas, pelo despreendimento de células neoplásicas no sítio cirúrgico durante a manipulação do tumor e ressecção dos tecidos (Rogers, 1996; Dobson e Scase, 2007). Um estudo realizado por Simpson et al. (2004) demonstrou que 75% dos mastocitomas de grau 2 foram completamente excisados a um centímetro, mas que todos foram completamente excisados com margens cirúrgicas de dois centímetros, concluindo que margens laterais de dois centímetros e profundas de apenas um plano fascial são adequadas para a excisão completa de mastocitomas bem a moderadamente diferenciados. Resultados semelhantes foram obtidos por Fulcher et al. (2006).

Tratamentos adjuvantes devem ser realizados em pacientes selecionados, incluindo aqueles que apresentem tumores de alto grau, estadiamento avançado ou reúnam fatores prognósticos desfavoráveis, mas também aqueles em que não foi possível obter margens livres de células neoplásicas ou quando a obtenção de margens cirúrgicas resultaria na necessidade de procedimentos agressivos ou mutilantes, com elevado prejuízo funcional e estético, como é o caso das amputações (Dobson e Scase, 2007; London e Thamm, 2013).

A RT é o tratamento adjuvante de escolha para os mastocitomas de grau 2 em que a excisão cirúrgica completa não foi possível (Dobson e Scase, 2007). A combinação de cirurgia e radiação ionizante parece ser muito eficaz nesse contexto com 94 a 97% dos casos atingindo doze meses livres de doença (Al-Sarraf et al., 1996; Frimberger et al., 1977). Pacientes com mastocitoma de alto grau não respondem bem a essa modalidade terapêutica, pois, apesar da RT prevenir a recorrência local, esses animais apresentam elevado risco de desenvolvimento de doença metastática (Rogers, 1996).

Existem poucas indicações para a RT em tratamentos neoadjuvantes, mas em pacientes com tumores inoperáveis, o tratamento pode promover a citorredução, melhorar a qualidade de vida do paciente e permitir uma posterior intervenção cirúrgica (Rogers, 1996; Dobson et al., 2004; Dobson e Scase, 2007).

A QT apresenta aplicação limitada no mastocitoma canino, tendo em vista que a maioria dos tumores de graduação baixa a intermediária são tratados adequadamente apenas com cirurgia ou com a associação de radioterapia (Dobson e Scase, 2007). Entretanto, a QT adjuvante é adequada para mastocitomas classificados como grau 3 de Patnaik, mas também àqueles de grau intermediário, na existência de metástase em linfonodos ou à distância e/ou elevada fração de crescimento (Blackwood et al., 2012), com o objetivo de estender a sobrevida e prevenir a recorrência tumoral (Blackwood et al., 2012). Alternativamente, pode ser indicada na prevenção de recidivas locais, após a exérese incompleta de tumores de graduação baixa a intermediária, quando a ampliação das margens cirúrgicas ou a RT não representam opções viáveis (Thamm et al., 1999; Davies et al., 2004).

Inúmeros fármacos foram propostos, no entanto, o uso da QT permanece empírico, pela ausência de estudos controlados (Dobson e Scase, 2007; London e Thamm, 2013). Apesar do número reduzido de estudos, a combinação de vimblastina e prednisona parece ter se tornado a QT de escolha no tratamento adjuvante do mastocitoma canino (Dobson e Scase, 2007; Webster et al., 2008). No estudo conduzido por Thamm et al. (2006), com 61 pacientes de alto risco (mastocitomas de grau elevado ou intermediário, acometimento de linfonodos regionais e localização muco-cutânea), o tratamento adjuvante com vimblastina na dose de $2\text{mg}/\text{m}^2$ a cada sete ou 14 dias, por via intravenosa, e prednisona, resultou em SG de 1374 dias para os pacientes com tumores de alto grau, enquanto todos os pacientes com mastocitoma de grau 2 atingiram sobrevida superior a três anos. Em 20 pacientes de alto risco, o tratamento adjuvante com prednisona em associação à vimblastina ($2\text{mg}/\text{m}^2$, por via intravenosa) e lomustina ($27\text{-}90\text{mg}/\text{m}^2$, por via oral), alternadas a cada duas semanas, resultou em ILD e SG de 35 e 48 semanas, respectivamente (Cooper et al., 2009). Outro estudo, com 24 pacientes de alto risco, avaliou a resposta à QT adjuvante com prednisona em associação à vimblastina ($2\text{-}2,2\text{mg}/\text{m}^2$, por via intravenosa) e ciclofosfamida ($200\text{-}250\text{mg}/\text{m}^2$, por via oral, durante quatro dias, iniciando no oitavo dia após administração de vimblastina) a cada três semanas, resultando em um SG de 2092 dias (Camps-Palau et al., 2007).

Inúmeros estudos avaliaram a eficácia da QT neoadjuvante na citorredução do mastocitoma canino, com destaque para o uso de GCs (London e Thamm, 2013). Os corticosteróides são, de fato, capazes de inibir a proliferação e induzir a apoptose de mastócitos *in vitro*, e reduzir a taxa de proliferação celular, no entanto, uma resposta anti-tumoral aparente pode decorrer de redução do edema e inflamação peritumoral (Takahashi et al., 1997; Dobson e Scase, 2007; London e Thamm, 2013). A resposta aos GCs é dose-dependente (Takahashi et al., 1997; Schmidt et al., 2004), o que justifica, parcialmente, a ampla variação observada por diferentes autores. Em um

estudo conduzido por McCaw et al. (1994), com 21 cães tratados com prednisona na dose de 1mg/kg, apenas um paciente teve resposta completa e quatro tiveram resposta parcial de curta duração, semelhante ao resultado obtido por Rassnick et al. (1999), enquanto Dobson et al. (2004), observaram resposta em 75% (18/24) dos pacientes tratados com prednisolona na dose de 40 mg/m² por 14 dias. Alternativamente, Fan e De Lorimier (2005) orientaram aplicações intralesionais ou sistêmicas do corticosteróide de longa duração triancinolona, nas doses de 1mg/cm ou 0,22mg/kg (sem exceder 6mg por animal), com intervalos de sete, 14 ou 21 dias. Apesar de controverso, os GCs, principalmente a prednisona e prednisolona permanecem como agentes anti-tumorais importantes quando associados à cirurgia, RT e QT, podendo, inclusive, prevenir a degranulação de mastócitos quando os tratamentos são realizados na presença de doença macroscópica (London e Thamm, 2013). Ainda no cenário neoadjuvante, respostas mensuráveis foram observadas em 7% (2/27), 28% (13/46), 38% (8/21), 42% (8/19), 47% (7/15), 57% (21/37) e 59% (10/17) dos pacientes tratados, respectivamente, com vincristina (McCaw et al., 1997), hidroxiuréia (Rassnick et al., 2010), lomustina (Rassnick et al., 1999), vimblastina em associação à prednisona (Thamm et al., 1999), lomustina em associação à vimblastina (Cooper et al., 2009), e com a associação de múltiplos agentes incluindo vincristina, ciclofosfamida, hidroxiuréia e prednisona (Gerritsen et al., 1998). Alternativamente às doses convencionais, ou dose máxima tolerada (DMT), Taylor et al. (2009) propôs a utilização do clorambucila, em dose metronômica (5 mg/m² a cada 48 horas, por via oral), como forma de tratamento, paliativa, para mastocitomas inoperáveis, resultando em aumento do ILD e SG.

Os mastócitos, particularmente aqueles bem diferenciados, apresentam sensibilidade excepcional ao meio hiposmótico, de forma que a injeção de soluções hipotônicas, no sítio tumoral, após a excisão cirúrgica incompleta, possa destruir as células neoplásicas, contribuindo para o tratamento da doença residual (Grier et al., 1990; Grier et al., 1995). No estudo realizado por Lavalle (2001), aplicações intralesionais semanais de água destilada foram efetivas no controle da doença residual dos pacientes com mastocitomas de graduação baixa a intermediária, após excisão cirúrgica incompleta. De forma semelhante, Neyens et al. (2004) realizaram o tratamento de 17 cães cuja excisão cirúrgica do mastocitoma foi incompleta, e apenas dois pacientes desenvolveram recorrência local durante o estudo. No entanto, outros autores não demonstraram benefício da técnica e seu uso permanece controverso (Jaffe et al., 2000; Dobson e Scase, 2007; Brocks et al., 2008).

O advento das terapias de alvo molecular revolucionou o tratamento do câncer na Medicina, e estão disponíveis também na Medicina Veterinária, na qual se destaca o uso de TKIs no tratamento do mastocitoma canino (London, 2009; Avery, 2012). TKIs podem ser anticorpos monoclonais – com ação externa à célula, em receptores transmembrana, caracterizando terapias direcionadas (alvo molecular específico) – ou pequenas moléculas – capazes de penetrarem no meio intracelular atuando em moléculas citoplasmáticas e transmembranares com propriedades químicas semelhantes, caracterizando terapias multidirecionadas (Pawson, 2002; Amora e Scholar, 2005). Na Medicina Veterinária os esforços se concentraram, principalmente, no desenvolvimento de pequenas moléculas, com destaque para o mesilato de masitinib e fosfato de toceranib (London, 2009). Ambos apresentam semelhanças com uma pequena molécula desenvolvida para a utilização na espécie humana, denominada imatinibe. Na Medicina, esse fármaco é amplamente utilizado no tratamento do tumor estromal gastrointestinal e leucemia mieloide crônica (positiva para o cromossomo Filadélfia), pela sua ação nas proteínas KITr, Bcr-Abl (*Breakpoint cluster region-Abelson*), receptores do domínio de discoidina 1/2 (*discoidin domain-containing receptor 1/2*, DDR1/2), receptor do fator estimulador de colônia-1 (*colony-stimulating factor-1 receptor*, CSF-1R) e PDGFRα/β (Tniguchi et al., 1999; Din e Woll,

2008; London, 2009). Na Medicina Veterinária, um estudo realizado com 21 cães com mastocitoma, envolveu a administração do imatinibe, na dose de 10mg/kg, diariamente, resultando em redução do tamanho tumoral em dez cães, sendo que nos cinco animais que apresentaram mutações no gene *c-kit*, a resposta foi de 100% (Isotani et al., 2008). Yamada et al. (2011) avaliou a eficácia do mesilato de imatinibe em um cão com mastocitoma localizado no coxim plantar, com mutação confirmada no gene *c-kit*, metástase em linfonodo poplíteo e mastócitos neoplásicos na corrente sanguínea. Após 14 dias do tratamento foi observada redução significativa do tumor primário e não foram mais evidenciados mastócitos no sangue periférico, no entanto, na oitava semana, observou-se o aparecimento de metástases satélite e o retorno da mastocitemia, resultando no óbito do paciente. O imatinib apresenta uma hepatotoxicidade marcante em cães, mas parece ser bem tolerado em gatos (Isotani et al., 2008; London, 2009).

O masitinib, por sua vez, foi desenvolvido para utilização no cão. Trata-se de um TKI capaz de atingir as proteínas-quinases KITr, PDGFR α/β (*platelet-derived growth factor receptor α/β*), LYN (*Lck/Yes novel tyrosine kinase*), Fyn, Lck e as vias controladas por essas moléculas (Ogilvie et al., 2011). Em um estudo realizado com 202 cães com mastocitomas de graduação elevada ou intermediária não metastáticos (estadiamento I e II) e não ressecáveis, o masitinib, na dose diária de 12,5mg/kg, resultou em atraso no tempo de progressão da doença e aumento da sobrevida, quando comparado ao grupo placebo, sendo que o resultado foi mais pronunciado nos pacientes com mutações no gene *c-kit* (Hahn et al., 2008). Mais tarde, com 132 animais deste mesmo estudo, observou-se que o masitinibe preveniu o aparecimento de metástases em linfonodos e órgãos distantes, aumentando significativamente a porcentagem de pacientes vivos após 12 e 24 meses do diagnóstico (Hahn et al., 2010). Em pacientes com doença metastática ou não ressecável, obteve-se uma SG de 630 dias (ILD de 453 dias) naqueles que responderam ao masitinib (remissão parcial ou completa) e 137 dias naqueles que não responderam (doença estável ou progressiva) (Smrkovski et al., 2013). Inúmeros estudos demonstraram maior eficácia do masitinib quando utilizado como primeira opção, sugerindo que outras formas de tratamento possam, de alguma forma, induzir resistência, principalmente naqueles que não apresentam mutações no *c-kit* (Hahn et al., 2008). No estudo conduzido por Smrkovski et al. (2013), apesar da ausência de significância estatística, observou-se resposta em 57% dos pacientes que utilizaram o masitinib como primeira linha e 25% naqueles em que foi instituído como terapia de resgate. Efeitos colaterais, em geral leves a moderados, podem ocorrer em até 61,5% dos pacientes tratados, com destaque para hepatotoxicidade, nefropatia com perda de proteína, vômito e/ou diarreia e neutropenia (London, 2009; Smrkovski et al., 2013).

O toceranib, também desenvolvido para a utilização na Medicina Veterinária, provoca a inibição de KITr, PDGFR α/β , VEGFR (*vascular endothelial growth factor receptor*) e Flt-3 (*FMS-like tyrosine kinase 3*), apresentando, portanto, ação antitumoral direta e ação antiangiogênica (London, 2009). Em um estudo realizado com 86 cães com mastocitoma recidivante ou metastático, o toceranib foi administrado na dose de 3,25mg/kg, a cada 48 horas, durante seis semanas, e resultou em resposta parcial ou completa em 37,2% dos cães tratados (London et al., 2009). Como esperado, a maior taxa de resposta foi observada nos pacientes com mutações detectadas no gene *c-kit* (60% versus 31,3%). O fosfato de toceranib pode causar neutropenia leve à moderada e, em raras situações, fraqueza muscular (London, 2009; London et al., 2009).

A resistência aos inibidores de tirosina-quinase pode ocorrer após uma resposta inicial favorável, em decorrência de novas mutações no gene *c-kit* ou da expressão de proteínas relacionadas à resistência à múltiplas drogas, como a glicoproteína P, conforme relatado por

Antonescu et al. (2005) em tumores estromais gastrointestinais humanos tratados com imatinibe.

Cães com mastocitoma, apresentando sinais sistêmicos ou evidências de metástase devem ser medicados com anti-histamínicos (bloqueadores H_1), a exemplo da prometazina, difenidramina, e bloqueadores H_2 , como a cimetidina, ranitidina ou famotidina, na tentativa de redução dos efeitos colaterais causados pela degranulação dos mastócitos (Daleck et. al., 2009). O omeprazol também pode ser empregado, pois inibe a secreção de ácido clorídrico no estômago. Terapia suporte, com fluidoterapia e nutrição parenteral, deve ser instituída, conforme a necessidade para pacientes mais debilitados (London e Thamm, 2013).

Apesar dos avanços no diagnóstico, prognóstico e tratamento do mastocitoma canino ainda faltam diretrizes para o estabelecimento da conduta terapêutica. A realização de ensaios clínicos é uma demanda urgente para que abordagens baseadas em evidências possam ser utilizadas pelo clínico na escolha do tratamento mais apropriado para cada situação.

MATERIAL E MÉTODOS

CrITÉrios de inclusão e exclusão

Essa pesquisa foi realizada com uma metodologia retrospectiva e prospectiva, envolvendo uma parceria entre a Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG, Brasil) e *University of Cambridge* (Reino Unido). Foram incluidos cães referenciados ao Hospital Veterinário da UFMG, entre 2011 e 2015 (prospectivo) e *Queen's Veterinary School Hospital* (QVSH) localizado na *University of Cambridge*, entre 2006 e 2014 (prospectivo apenas para os animais atendidos no segundo semestre de 2014), com diagnóstico histopatológico de mastocitoma cutâneo nas respectivas instituições de ensino. Para melhor padronização da amostra, foram incluidos apenas os pacientes oriundos da *University of Cambridge*, que foram tratados com RT e TKIs, modalidades até então indisponíveis no Brasil.

Exames pré-cirúrgicos incluíram eletrocardiograma, hemograma, coagulograma (tempo de tromboplastina parcial ativada – TTPA e tempo de protrombina – TP) e provas bioquímicas séricas (proteína total e frações, uréia, creatinina, fosfatase alcalina – FA, alanina aminotransferase – ALT, aspartato aminotransferase – AST e gama-glutamil-transferase – GGT) para avaliação do risco anestésico. Todos os pacientes foram submetidos ao estadiamento clínico usual mediante ultrasonografia abdominal e avaliação citológica dos linfonodos regionais que apresentaram alterações na forma, volume e/ou consistência. Entretanto, não foi realizada punção, para análise citológica, de fígado, baço e medula óssea. Linfonodos que não apresentaram alterações macroscópicas ou no exame citológico, não foram excisados para avaliação histopatológica. Metástases na pele foram caracterizadas na presença de três ou mais lesões, sendo denominadas de metástase satélite, aquelas localizadas na proximidade de lesões maiores (Dobson e Scase, 2007).

Foram avaliados 149 pacientes, entretanto, o número de animais, em cada estudo, variou de acordo com os critérios de inclusão e exclusão pré-estabelecidos. Falhas na adesão ao tratamento e assiduidade durante o acompanhamento clínico foram condições que não permitiram a permanência do paciente nessa pesquisa.

O estudo I avaliou a resposta de cães com mastocitoma cutâneo e subcutâneo, ao uso de GCs, na existência de doença mensurável, correlacionado-a com fatores prognósticos e avaliando sua influência na SG. Alterações relevantes no hemograma, função renal e bioquímica hepática foram contrárias ao uso neoadjuvante de GCs em altas doses e esses pacientes foram, portanto, excluídos. Também foram excluídos os pacientes, que apesar de terem recebido o tratamento citorredutor, não foram submetidos à cirurgia para biópsia incisional ou excisional, após o rápido curso de GCs.

O estudo II incluiu, independente do tratamento instituído, cães com mastocitoma submetidos à avaliação do risco de recorrência ou disseminação tumoral a partir de fatores prognósticos.

O estudo III avaliou a resposta  QT adjuvante e foi conduzido apenas com pacientes atendidos no Hospital Veterinário da UFMG, incluindo cães com diagnóstico histopatológico de mastocitoma cutâneo ou subcutâneo, sem sinal de doença macroscópica, após a excisão cirúrgica.

O estudo IV avaliou a resposta  RT hipofracionada e incluiu apenas cães referenciados ao QVSH, na *University of Cambridge*, com diagnóstico histopatológico de mastocitoma cutâneo.

Pacientes no estágio I, apesar da suspeita de metástase em linfonodos regionais, pela citologia, apresentando mastocitomas solitários em regiões de difícil obtenção de margens cirúrgicas livres de células neoplásicas, foram selecionadas para a excisão marginal, intencional, seguida de radioterapia pós-operatória. Foram excluídos os pacientes que apresentaram mastocitomas de grau 3 de Patnaik, ou metástase avançada (HN3) nos linfonodos avaliados histologicamente.

O estudo V avaliou a resposta à TKIs em cães com diagnóstico histopatológico de mastocitoma cutâneo, na presença de doença macroscópica, inoperável (estágio III), ou elevado risco de recorrência ou metástase após excisão cirúrgica, definido a partir da classificação como grau 3 de Patnaik, ou grau intermediário, na presença de metástase regional ou distante, diagnosticada por histopatologia, ITD no exon 11 do gene *c-kit*, avaliada pela PCR, e/ou primariamente localizado na mucosa ou junção mucocutânea.

Esse estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFMG, protocolo n° 384/2013 – anexo 1) e *Department's Ethics and Welfare Committee (University of Cambridge*, protocolo n° CR138 – anexo 2). O responsável por cada animal assinou um “Termo de Consentimento Livre e Esclarecido” (anexos 3 e 4) autorizando a participação nesses estudos.

Tratamento cirúrgico

Os pacientes foram submetidos a jejum alimentar de 12 horas e hídrico de duas horas, a fim de evitar êmese trans-operatória ou pós-operatória e pneumonia por aspiração (Selmi et al., 2009). O protocolo de anestesia geral foi definido pelo anestesista, conforme os exames pré-cirúrgicos.

De uma forma geral, excisões elípticas foram realizadas na pele, respeitando margens laterais de 2-3 centímetros, seguida de dissecação na profundidade, objetivando ao menos uma fáscia muscular (Fulcher et al., 2006). A sutura foi realizada com fios absorvíveis de poliglecaprone ou polidioxanona, calibre 0 a 2-0, com padrão Sultan, para redução do espaço morto. As bordas da ferida foram aproximadas e coaptadas em um segundo plano com o mesmo tipo de fio, calibre 2-0 ou 3-0, mas com padrão de sutura contínuo simples. A sutura de pele foi realizada em padrão simples interrompido, com fios de náilon calibre 3-0. Em casos específicos foi necessária à amputação de membros ou cauda, conforme a localização e tamanho do tumor, objetivando um tratamento eficaz, mas sempre preservando a qualidade de vida do paciente. Dependendo do estadiamento, apresentação e evolução clínica do paciente, o mesmo foi conduzido apenas para biópsia incisional (estadiamento avançado, apresentação clínica ou citologia sugestiva de tumores pouco diferenciados). Para os pacientes que reuniram os critérios de inclusão no estudo IV, uma excisão marginal, intencional, foi realizada, objetivando a complementação com RT adjuvante.

Os tecidos removidos foram acondicionados em formalina 10% para o exame histopatológico, imuno-histoquímico e molecular subsequente.

Avaliação anátomo-patológica

A avaliação anátomo-patológica foi conduzida por dois observadores treinados, sendo um patologista, no Laboratório de Patologia Comparada, do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG.

Os espécimes cirúrgicos foram avaliados macroscopicamente quanto ao tamanho do fragmento e tamanho tumoral, consistência e coloração. As bordas do fragmento foram pintadas com tinta

nanquim e utilizadas para avaliação microscópica das margens cirúrgicas. Cortes longitudinais foram realizados para inclusão em parafina e preparação das lâminas histológicas coradas pelo azul de toluidina e hematoxilina-eosina (HE).

A avaliação microscópica dos tumores primários incluiu avaliação das margens cirúrgicas, extensão e distribuição predominante (cordão ou manto), caracterização subjetiva do edema, hemorragia, necrose, colagenólise, cistomatose, desmoplasia e infiltração eosinofílica (discreto, moderado, intenso), contagem de células multinucleadas, figuras mitóticas (em 10 campos de maior aumento), cariomegalia e núcleos bizarros. A graduação foi realizada de acordo com critérios histomorfológicos definidos por dois estudos distintos: Patnaik et al. (1984) e Kiupel et al. (2011). Mastocitomas subcutâneos também foram incluídos e, salva as devidas considerações sobre extensão, foram graduados de acordo com os demais parâmetros.

A avaliação dos linfonodos seguiu os critérios propostos por Weishaar et al. (2014), considerando o nível de comprometimento do linfonodo pelo mastocitoma em quatro categorias: não metastático (HN0), suspeito (HN1), metástase inicial (HN2) ou avançada (HN3).

Avaliação imuno-histoquímica

As reações imuno-histoquímicas foram realizadas no Laboratório de Patologia Comparada, do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, e analisadas por um único patologista treinado.

Secções histológicas de 4 µm foram obtidas de porções representativas de cada tumor e fixadas em lâminas gelatinizadas. Os cortes foram desparafinizados e rehidratados em uma sequência de alcoóis. A recuperação antigênica foi realizada com solução tampão de citrato pH 6,0 (Target Retrieval Solution Citrate pH 6¹, Dako Cytomation) em calor pressurizado (20-25 mmHg, 125 °C/2 minutos). A peroxidase endógena foi bloqueada por imersão em peróxido de hidrogênio a 3% enquanto o bloqueio da proteína foi realizado com Protein Block² (Thermo Scientific Ultravision). Em seguida, foi realizada a incubação, a 4°C, por 16 horas (*overnight*), com anticorpo policlonal de coelho CD117³ (1:800, Dako Cytomation), para avaliação do KITr, ou anticorpo monoclonal de camundongo MIB-1⁴ (1:25, Dako Cytomation), para avaliação da proteína Ki-67 (índice de proliferação celular). Posteriormente, o anticorpo secundário (Advance HRP Link⁵, Dako Cytomation) foi incubado em câmara úmida por 30 minutos e a reação foi amplificada pelo polímero (Advance HRP Enzyme⁶, Dako Cytomation). A revelação da reação foi obtida pelo cromógeno 3,3-diaminobenzidina tetrahydroclorido (Liquid DAB + Substrat Chromogen System⁷, Dako Cytomation) e a contracoloração foi realizada com Hematoxilina de Harris.

O padrão de imunomarcção para KITr foi avaliado, a partir a contagem de 100 células em objetiva de 40x, conforme preconizado por Kiupel et al. (2004) e Araújo et al. (2012). A porcentagem de células em proliferação foi avaliada pela imunoreatividade para Ki-67, a partir da contagem em 500 células neoplásicas (Sousa et al., 2008), em cinco campos de maior marcação (*hot spots*) em objetiva de 40x. Como controles positivos foram utilizadas amostras de

¹ Target Retrieval Solution Citrate pH 6, Dako - Carpinteria, CA, USA

² Protein Block, Thermo Scientific Ultravision

³ CD117, Dako - Carpinteria, CA, USA

⁴ MIB-1, Dako - Carpinteria, CA, USA.

⁵ Advance HRP Link, Dako - Carpinteria, CA, USA.

⁶ Advance HRP Enzyme, Dako - Carpinteria, CA, USA.

⁷ Liquid DAB + Substrat Chromogen System, Dako - Carpinteria, CA, USA.

mastocitoma canino previamente testadas e os controles negativos foram obtidos por substituição do anticorpo primário pelo soro normal.

Pesquisa de mutações no gene *c-kit*

As pesquisas de mutações no exon 11 do gene *c-kit* foram conduzidas pela PROGEN Biotecnologia, no laboratório VETPAT.

Quatro a oito fragmentos do tecido tumoral, com 5µm cada, foram cortados dos respectivos blocos de parafina e utilizados para extração do DNA, pelo método da proteinase K, utilizando o kit comercial ReliaPrep™ FFPE gDNA Miniprep System (Promega)⁸. A desparafinização foi realizada, previamente, a partir da adição de 300 µL de óleo mineral e incubação a 80 °C, por um minuto.

Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados no flanqueamento da amplificação do fragmento de interesse no gene *c-kit* (exon 11 – nucleotídeos 1661 a 1787 do cromossomo 13), demonstrada na figura 3, foram delineados com auxílio do software BLAST (Basic Local Alignment Search Tool®, NCBI) e fabricados pela Invitrogen⁹, sendo *c-kit* F: 5'-ATCTGTCTCTCTTTTCTCCCC-3', senso, envolvendo os nucleotídeos 1633 a 1655 (intron 10 do cromossomo 13) e *c-kit* R: 5'-TGGGGTTCCCTAAAGTCATTGT-3', antisenso, envolvendo os nucleotídeos 1857 a 1835 (final do exon 11 e início do intron 11). O produto gerado por estes pares apresenta 225 pb na ausência de mutações (*c-kit* nativo).

⁸ ReliaPrep™ FFPE gDNA Miniprep System, Promega – Madison, USA.

⁹ Invitrogen™ - São Paulo, SP, Brasil.

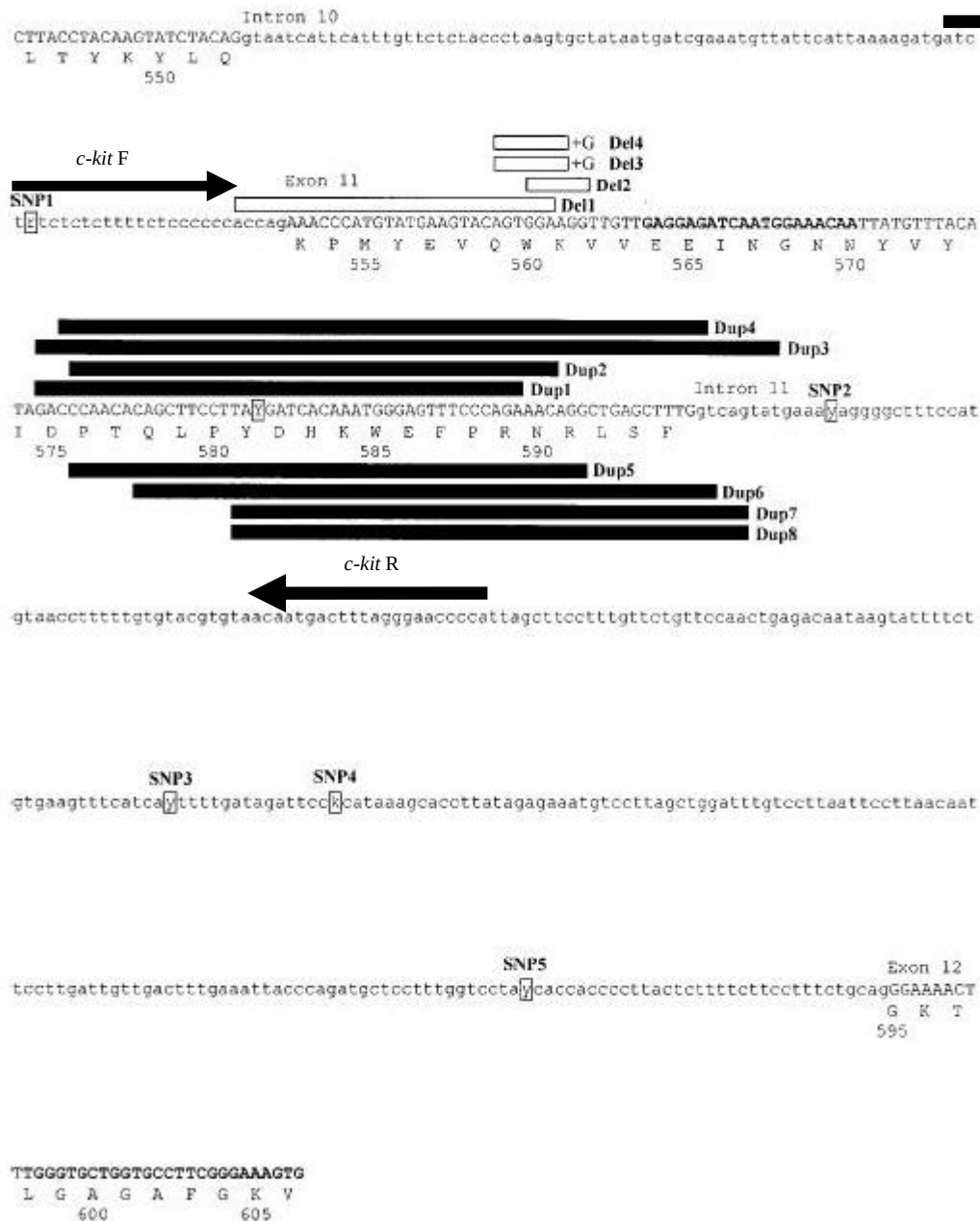


Figura 3 – Sequência de nucleotídeos do exon 10 ao exon 12 (5' → 3') do gene *c-kit* (adaptado de Zemke et al., 2002 e Jones et al., 2004). Letras minúsculas referem-se aos introns e maiúsculas aos exons. O pleomorfismo individual de nucleotídeos estão representados pelas letras R (A ou G), Y (C ou T) e K (G ou T). Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados estão demonstrados nas setas (*c-kit F* e *c-kit R*). Deleções e duplicações conhecidas estão representadas em barras sem preenchimento e sólidas, respectivamente.

As reações foram preparadas em um volume total de 25 µL, contendo 5 µL da amostra de DNA tecidual extraído, 12,5 µL da solução GoTaq® Probe qPCR Master Mix (Promega)¹⁰ e 4 µL de cada oligonucleotídeo iniciador (*c-kit* F e *c-kit* R). A programação no termociclador GenePro (BIOER Technology) incluiu a manutenção a 95 °C por cinco minutos, seguida de 30 ciclos de 94°C por 45 segundos para desnaturação das fitas de DNA, 63°C por 45 segundos para pareamento ou anelamento dos iniciadores e 72°C por um minuto para extensão, para finalmente ser mantido a 72°C por dez minutos para estabilização molecular.

O material amplificado foi homogenizado à solução tampão, corante e reveladora (fluorescente) *Blue Green Loading Dye* (LGC Biotecnologia)¹¹, constituindo 10µL na proporção 10:1, e aplicado em gel de agarose 1,2 %, com tampão Tris-borato-ácido etileno diamino tetracético, para separação dos produtos gerados em eletroforese a 100V, com amperagem livre, por 50-60 minutos, para posterior avaliação em luz ultravioleta. O padrão de peso molecular, constituído por GeneRuler 100 bp (Thermo Scientific)¹², *Blue Green Loading Dye* (LGC Biotecnologia) e água miliqué, na proporção 1:1:2, foi aplicado no mesmo volume.

Como controles positivos e negativos foram utilizados, respectivamente, amostras de tecido canino normal e água miliqué.

Tratamento médico

Para o estudo I, o tratamento de doença macroscópica com GCs foi realizado com prednisona¹³ ou prednisolona¹⁴, a critério do clínico, na dose de 40 mg/m², 7-10 dias antes da cirurgia, com o objetivo de promover a citorredução ou reduzir a inflamação peritumoral, facilitando a delimitação das margens cirúrgicas pelo cirurgião (Dobson et al., 2004; Stanclift et al., 2008). Alternativamente, em pacientes com mastocitomas solitários, apresentando obesidade, endocrinopatias ou doenças osteoartíticas, foram realizadas 1-2 aplicações, com intervalo de uma semana, de triancinolona¹⁵, na dose 0,22 mg/kg (sem exceder 6 mg por animal), conforme preconizado por Fan e De Lorimier (2005). Nos pacientes que puderam ser submetidos ao tratamento cirúrgico para exérese tumoral, tratamentos adjuvantes com radioterapia, quimioterapia ou inibidores tirosina-quinase foram recomendados, à critério de um oncologista, devido ao maior risco de recorrência ou disseminação tumoral atribuído àqueles que tiveram seus mastocitomas classificados como grau 3 de Patnaik, ou grau intermediário, na existência de metástase em linfonodos ou à distância e/ou elevada fração de crescimento estimada pelo índice mitótico (superior a 5 em 10 campos de maior aumento) ou percentual de Ki-6 (Blackwood et al., 2012; London e Thamm, 2013; Miller et al., 2014), mas também para àqueles da raça Shar-pei, com mastocitomas primários de mucosas ou junções muco-cutâneas, bolsa escrotal, prepúcio, períneo e vulva, com margens cirúrgicas histológicas comprometidas ou exíguas ou classificados como alto grau de Kiupel (London e Thamm, 2013). Pacientes com doença inoperável, após o curso rápido com GCs foram submetidos à biópsia incisional, para obtenção de informações prognósticas e preditivas, a partir da avaliação do perfil anátomo-patológico, imuno-histoquímico e genético, e submetidos ao tratamento mais adequado, com GC, QT ou TKI, de acordo com os recursos disponíveis.

¹⁰ GoTaq® Probe qPCR Master Mix, Promega – Madison, USA

¹¹ Blue Green Loading Dye, LGC Biotecnologia – Cotia, SP, Brasil.

¹² GeneRuler 100bp, Thermo Scientific – São Paulo, SP, Brasil.

¹³ Prednisona (genérico), Medley Indústria Farmacêutica Ltda – Campinas, SP, Brasil.

¹⁴ Prednisolone (genérico), Winthrop Pharmaceuticals Ltd – Guildford, Reino Unido.

¹⁵ Triancinolona (manipulado), BS Pharma – Belo Horizonte, MG, Brasil.

O estudo II avaliou a importância de fatores prognósticos clínicos, anatomo-patológicos, imuno-histoquímicos e genéticos, para a definição do risco de recorrência ou disseminação tumoral do mastocitoma canino, sendo as diferenças no tratamento avaliadas nos estudos subsequentes.

No estudo III, elevado risco de recorrência ou metástase (grupo 1) foi atribuído aos pacientes que tiveram seus mastocitomas classificados como grau 3 de Patnaik, mas também àqueles de grau intermediário, na existência de metástase em linfonodos ou à distância e/ou fração de crescimento estimada pelo índice mitótico (superior a 5 em 10 campos de maior aumento) ou percentual de Ki-67 (Blackwood et al., 2012; London e Thamm, 2013; Miller et al., 2014), além daqueles primários de mucosas ou junções muco-cutâneas (London e Thamm, 2013). Cães da raça Shar-pei, mastocitomas localizados na bolsa escrotal, prepúcio, períneo e vulva, ou com margens cirúrgicas histológicas comprometidas e exúguas, foram associadas a um risco intermediário (grupo 2). A QT sistêmica, em DMT, foi recomendada para pacientes sob elevado risco de recorrência ou disseminação, utilizando-se lomustina¹⁶, na dose de 60-90 mg/m², a cada 21 dias, por 3-4 sessões, ou sulfato de vimblastina¹⁷, na dose de 2 mg/m², a cada sete dias, por quatro sessões, e então a cada 14 dias, por mais quatro sessões (grupo 1a). A QT em dose metronômica, de curta duração, foi realizada com clorambucila¹⁸, na dose de 4-6 mg/m² a cada 48 horas, por oito semanas (grupo 2a). Todos os protocolos incluíram a administração de prednisona, na dose de 40 mg/m², diariamente, durante os primeiros sete dias, seguida por 25 mg/m², também diariamente, durante 30 dias e, por fim, na dose de 25 mg/m², a cada 48 horas, por mais 60 dias. Grupos controles foram formados a partir de pacientes classificados com risco intermediário à elevado, mas cujos responsáveis declinaram a instituição de tratamentos quimioterápicos (grupos 1b e 2b, para QT em DMT e QM, respectivamente). Pacientes de baixo risco foram apenas acompanhados e constituíram um grupo isolado (grupo 3).

Para o estudo IV, o tratamento radioterápico foi aplicado, na cicatriz do tumor primário, por um acelerador linear de 6-MV, em quatro frações de electrons a 800 cGy (dose total de 3200 cGy), a uma distância entre a fonte-superfície de 100 cm, a cada sete dias (Anexo 9). O plano de tratamento baseou-se nas mensurações pré-operatórias, permitindo margens laterais de 2-3 cm e profunda de pelo menos 1 cm. Uma vez se tratando de um tratamento adjuvante superficial, utilizou-se um plano não-gráfico, a partir de uma única porta lateral ou dorso-ventral. O objetivo do plano foi assegurar o recebimento de 95% da dose aplicada no alvo desejado. Um “bólus”, simulando as características de absorção e dispersão da radiação no tecido, com equivalência de 0,5-1,0 cm foi aplicado à superfície da pele para ajustar a profundidade e garantir uma distribuição uniforme da dose na área irradiada. Blocos de chumbo foram utilizados, em determinados casos, para proteger estruturas vitais ou com maior sensibilidade à radiação.

No estudo V, o tratamento, por via oral, com masitinib¹⁹ na dose de 8-12,5 mg/kg q 24 horas ou toceranib²⁰ na dose de 2,5-2,7 mg/kg q 48 horas foi realizado com intuito adjuvante, e mantido por no mínimo 4-6 meses ou até a progressão da doença. Pacientes com doença macroscópica, inoperável, foram submetidos à tratamento semelhante, porém, o mesmo foi mantido enquanto houvesse doença estável ou resposta clínica mensurável. O uso concomitante de prednisona ou

¹⁶ Lomustina (manipulado), Drogavet – Belo Horizonte, MG, Brasil.

¹⁷ Velban®, Antibióticos do Brasil Ltda (ABL) – Cosmópolis, SP, Brasil.

¹⁸ Leukeran®, GlaxoSmithKline Brasil Ltda (GSK) – Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

¹⁹ Masivet®, AB Science – Paris, France.

²⁰ Palladia®, Zoetis – New Jersey, United States of America.

prednisolona e inibidores da secreção ácido gástrica (omeprazol) foi encorajado nas fases iniciais do tratamento para controle dos efeitos paraneoplásicos do mastocitoma relacionados à degranulação.

Avaliação da resposta e toxicidade

No tratamento de doença macroscópica, a resposta tumoral aos GCs e TKI foi baseada nas mensurações do tumor primário antes e após o início do tratamento, conforme preconizado pela OMS (Miller et al., 1981): remissão completa (desaparecimento completo de doença mensurável), remissão parcial (redução do tamanho tumoral superior a 50%), doença estável (redução do tamanho tumoral inferior a 50% ou aumento inferior a 25%) ou progressiva (aumento do tamanho tumoral em mais de 25% ou aparecimento de novas lesões). O ILD, para os pacientes que atingiram remissão completa, e a SG, para todos os pacientes, foram considerados a partir da cirurgia (tratamento adjuvante) ou do início do uso do TKI (tratamento de doença macroscópica). A citologia foi utilizada para confirmação do diagnóstico no caso de doença progressiva com aparecimento de novas lesões. Efeitos colaterais relacionados ao uso dos GCs, quimioterápicos, TKI ou implementação da RT foram registrados.

Análise estatística

Toda a análise estatística foi realizada no GraphPad Prism (v.6.01). Foram consideradas significativas, diferenças com $p < 0,05$. Para as análises de ILD e SG, foram censurados os pacientes que não puderam ser acompanhados ou que vieram a óbito por razões não relacionadas ao mastocitoma.

Estudo I:

A correlação de Spearmann foi utilizada, com a finalidade de testar e medir a associação da resposta dos mastocitomas, aos GCs, com fatores clínicos (estadiamento clínico), anátomo-patológicos (gradações de Patnaik e Kiupel, índice mitótico), imuno-histoquímicos (percentual de Ki-67 e padrão de expressão de KITr) e genéticos (status mutacional do exon 11 do gene *c-kit*). As correlações significativas foram consideradas fortes quando ocorreram em mais de 49% da população estudada ($r_s > 0,07$), moderada, quando ocorreram em 9 a 49% ($0,3 < r_s < 0,7$), e fraca, quando ocorreram em menos de 9% da população ($r_s < 0,3$). A curva ROC foi utilizada para definir um ponto de corte com sensibilidade e especificidade satisfatória para a resposta aos GCs, quanto ao percentual de expressão de Ki-67.

A SG dos pacientes desse estudo foi estimada pela curva de Kaplan-Meier, e a comparação, conforme a resposta aos GCs, foi realizada pelo teste de longrank de Cox-Mantel.

Estudo II:

A correlação de Spearmann foi utilizada, com a finalidade de testar e medir a associação entre complicações relacionadas ao mastocitoma canino (apenas para pacientes com período de acompanhamento superior a 120 dias), fatores prognósticos clínicos (estadiamento clínico), anátomo-patológicos (gradações de Patnaik e Kiupel, avaliação da extensão e distribuição predominante, caracterização subjetiva do edema, hemorragia, necrose, collagenólise, cistomatose, desmoplasia e infiltração eosinofílica, contagem de células multinucleadas e figuras mitóticas), imuno-histoquímicos (percentual de Ki-67 e padrão de expressão de KITr) e genéticos (status mutacional do exon 11 do gene *c-kit*). As correlações significativas foram consideradas fortes quando ocorreram em mais de 49% da população estudada ($r_s > 0,07$), moderada, quando ocorreram em 9 a 49% ($0,3 < r_s < 0,7$), e fraca, quando ocorreram em menos de 9% da população ($r_s < 0,3$).

A curva ROC foi utilizada para definição de valores de corte, com sensibilidade e especificidade satisfatórias em relação ao prognóstico, para o número de células multinucleadas, índice mitótico e fração de crescimento estimada pelo Ki-67.

A curva de Kaplan-Meier foi utilizada para estimar a SG, que foi comparada, pelo teste de longrank de Cox-Mantel, apenas para os fatores prognósticos que se mostraram relevantes, pelos testes de correlação.

Estudo III:

Utilizando a curva de Kaplan-Meier, foram estimados o ILD e SG. As comparações, de acordo com o risco de recorrência ou metástase, e tratamento (dentro de cada grupo de risco), foram realizadas pelo teste de longrank de Cox-Mantel. A correlação de Spearmann foi utilizada, com a finalidade de testar e medir a associação da resposta dos mastocitomas de alto risco, à QT em DMT, com os fatores prognósticos avaliados. As correlações significativas foram consideradas fortes quando ocorreram em mais de 49% da população estudada ($r_s > 0,07$), moderada, quando ocorreram em 9 a 49% ($0,3 < r_s < 0,7$), e fraca, quando ocorreram em menos de 9% da população ($r_s < 0,3$).

Estudo IV:

Utilizando a curva de Kaplan-Meier, foram estimados o ILD e SG. As comparações, conforme as características clínicas, anatomo-patológicas, imunofenotípicas e genéticas, foram realizadas pelo teste de longrank de Cox-Mantel.

Estudo V:

Utilizando a curva de Kaplan-Meier, foram estimados o ILD (para pacientes submetidos ao tratamento no cenário adjuvante, ou que atingiram remissão completa) e SG. As comparações, conforme as características clínicas, anatomo-patológicas, imuno-histoquímicas e genéticas, foram realizadas pelo teste de longrank de Cox-Mantel. A correlação de Spearmann foi utilizada, com a finalidade de testar e medir a associação da resposta dos mastocitomas aos TKIs, com os fatores prognósticos avaliados. As correlações significativas foram consideradas fortes quando ocorreram em mais de 49% da população estudada ($r_s > 0,07$), moderada, quando ocorreram em 9 a 49% ($0,3 < r_s < 0,7$), e fraca, quando ocorreram em menos de 9% da população ($r_s < 0,3$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

ESTUDO I – TRATAMENTO DO MASTOCITOMA CANINO MENSURÁVEL COM GLICOCORTICÓIDES E CORRELAÇÃO COM ASPECTOS CLÍNICOS, ANATOMO-PATOLÓGICOS, IMUNO-HISTOQUÍMICOS, GENÉTICOS E COM O PROGNÓSTICO

Introdução

Glicocorticóides são hormônios esteroidais reconhecidos por sua potente propriedade anti-inflamatória (Oppong et al., 2013). Entretanto, são comumente utilizados, também, no tratamento de seres humanos e animais acometidos por uma variedade de neoplasias (Schlossmacher et al., 2011; Gustafon e Page, 2013).

Esses fármacos apresentam considerável efeito citostático (redução da fração de crescimento e da taxa de proliferação) e citotóxico (apoptose induzida por corticosteróides) em determinadas linhagens linfóides e mielóides, com destaque para linfócitos, mastócitos e eosinófilos, mas também em tecidos não hematopoiéticos, com ação em células do tecido ósseo e hipocampo (McCaw et al., 1994; Schmidt et al., 2004; Schlossmacher et al., 2011). Inversamente, resultam em aumento da sobrevivência (efeito anti-apoptótico) de certos tipos celulares, incluindo neutrófilos, precursores eritróides, fibroblastos, células da glândula mamária, ovários e fígado (Schlossmacher et al., 2011).

Na Medicina Humana, são utilizados, principalmente no tratamento das neoplasias linfóides, enquanto, na Medicina Veterinária, são empregados, também, no tratamento de mastocitomas e neoplasias do sistema nervoso central (Gustafon e Page, 2013). Inadvertidamente são utilizados em pacientes com câncer para o controle de edema, analgesia e redução de efeitos citotóxicos (Schlossmacher et al., 2011). Entretanto, seu uso deve ser criterioso, uma vez que seu efeito anti-apoptótico pode comprometer a eficácia de tratamentos anti-cancerígenos, enquanto sua ação pró-apoptótica pode ser potencializada com a administração concomitante de agentes citotóxicos (Gustafon e Page, 2013; Schlossmacher et al., 2011). O uso prolongado ou em doses elevadas resulta em efeitos colaterais previsíveis, primariamente relacionados ao desenvolvimento da síndrome de Cushing iatrogênica, incluindo poliúria e polidipsia, polifagia, hepatomegalia, letargia, cansaço, adelgaçamento da pele e redução do crescimento do pêlo. Outras complicações incluem hepatopatia esteróide, formação de úlceras gástricas, indução de diabetes melitos ou cetoacidose diabética, tromboembolismo pulmonar e infecções oportunistas (Rozanski, 2010).

Apesar dos avanços na definição do prognóstico e no tratamento dos mastocitomas caninos, os GCs permanecem como os fármacos mais utilizados e também mais eficazes (O' Keefe, 1990; Dobson e Scase, 2007; Stanclift e Gilson, 2008). O efeito desses fármacos sobre os mastócitos foram reconhecidos no início da década de 50 (Bloom et al., 1952) e, desde então, foram incorporados em protocolos neoadjuvantes, com o objetivo de promover citorredução, favorecendo a obtenção de margens cirúrgicas livres de células neoplásicas (Stanclift e Gilson, 2008) ou prevenir a degranulação induzida pela RT (Dobson et al., 2004). Corticosteróides são incluídos, também, em diversos protocolos quimioterápicos utilizados para o tratamento do mastocitoma canino, nos cenários neoadjuvante e adjuvante, com o intuito de potencializar o seu efeito (Davies et al., 2004; Camps-Palau et al., 2007; Taylor et al., 2009; Warland et al., 2015). Apesar da notoriedade desses fármacos, a sua utilização, como terapia única, foi pouco

estudada ou documentada (Dobson et al., 2004). Tradicionalmente, admite-se melhor resposta aos GCs em mastocitomas bem diferenciados (Rogers, 1996; Takahashi et al., 1997), entretanto a relação com os fatores prognósticos e o impacto na sobrevida desses pacientes não foi avaliada.

O objetivo desse estudo foi avaliar a resposta de cães, com mastocitoma cutâneo e subcutâneo, ao uso de GCs, na existência de doença mensurável, correlacionando-a com o estadiamento clínico, graduação histológica, índice mitótico, expressão imuno-histoquímica de ki-67 e KITr, e presença de duplicações no exon 11 do gene *c-kit*, além de avaliar o impacto da resposta aos GCs na SG desses pacientes.

Resultados

Foram incluídos nesse estudo 62 cães, com idade entre 48 e 197 meses ($117,1 \pm 34,5$) (tabela 5). Antes de serem submetidos ao tratamento cirúrgico para biópsia excisional ou incisional do mastocitoma, os pacientes foram tratados com prednisona ($n = 52$), ou prednisolona ($n = 8$), na dose de 40 mg/m², diariamente, por via oral, enquanto dois cães, por apresentarem obesidade ($n = 1$) ou endocrinopatia (hipotireoidismo, $n = 1$) receberam triancinolona intralesional, na dose de 0,22 mg/kg (máximo 6 mg por animal), a cada 7 dias.

Tabela 5 – Informações individuais de 62 cães submetidos ao tratamento com glicocorticóides objetivando citorredução de mastocitoma.

ID	Raça	Estágio	Graduação	MI	Ki-67	KITr	<i>c-kit</i> status (exon 11)	Tratamento	Sobrevida global	Resposta aos glicocorticóides
01	Golden Retriever	I	Grau 2 / Baixo grau	2	58,0%	II	Nativo	Cirurgia marginal, RT	524 †	DE ±
02	Pastor Alemão	I	Grau 2 / Baixo grau	2	2,3%	II	Nativo	Cirurgia marginal, RT	681	RP
03	Labrador	I	Grau 2 / Baixo grau	0	3,4%	I	Nativo	Cirurgia marginal, RT	503	RP
04	Golden Retriever	I	Grau 2 / Alto grau	0	13,0%	I	Nativo	Cirurgia marginal, RT	319	RP
05	Labrador	I	Grau 2 / Baixo grau	0	6,0%	II	Nativo	Cirurgia marginal, RT, masitinib	142 †	RP
06	Jack Russel Terrier	II	Grau 2 / Alto grau	8	21,0%	II	Nativo	Cirurgia, masitinib	267 †	DE
07	Labrador	I	Grau 3 / Alto grau	0	6,0%	II	Nativo	Cirurgia, masitinib	357	DE
08	Golden Retriever	II	Grau 2 / Alto grau	0	12,0%	II	Nativo	Cirurgia, masitinib	227	RP ±
09*	Pinscher	II	Grau 2 / Alto grau	3	2,0%	II	Nativo	Cirurgia, lomustina, clorambucila, masitinib	292 †	RP
10*	Poodle	III	Grau 2 / Alto grau	15	12,0%	II	ITD	Cirurgia, masitinib	213 †	DE ±
11	Schnauzer	III	Grau 2 / Baixo grau	1	35,0%	I	ITD	Cirurgia, masitinib	148 †	RP ±
12	Shar-pei	III	Grau 3 / Alto grau	44	91,2%	II	Nativo	Masitinib	427 †	DE
13	Labrador	II	Grau 2 / Baixo grau	2	5,6%	II	Nativo	Masitinib	161 †	RP
14	Border Collie	III	Grau 2 / Baixo grau	5	12,4%	II	Nativo	Masitinib	47 †	RP
15*	Bulldogue Francês	III	Grau 3 / Alto grau	20	58,0%	III	Nativo	Masitinib	131 †	DE

16*	Sem raça definida	III	Grau 2 / Baixo grau	1	44,7%	II	Nativo	Cirurgia, toceranib	30 †	DE ±
17*	Cocker Spaniel	III	Grau 3 / Alto grau	2	40,0%	III	Nativo	Cirurgia, toceranib	125 †	DE
18	SRD	III	Grau 2 / Baixo grau	2	13,0%	I	Nativo	Mastinib	123 †	DE
19	SRD	III	Grau 2 / Alto grau	3	52,0%	II	ITD	Lomustina, masitinib	120	DE
20*	Pinscher	III	Grau 2 / Baixo grau	4	40,0%	II	Nativo	Masitinib	42	RP
21	Labrador	I	Grau 1 / Baixo grau	2	4,0%	II	Nativo	Cirurgia	306	RP
22	SRD	I	Grau 1 / Baixo grau	3	5,1%	I	Nativo	Cirurgia, clorambucila	52	RP
23*	Boxer	III	Grau 2 / Alto grau	9	25,9%	I	ITD	Cirurgia, lomustina	40	RP
24*	Sem raça definida	II	Grau 3 / Alto grau	49	-	II	ITD	Cirurgia, lomustina, clorambucila	350	RP
25*	Sem raça definida	II	Grau 3 / Alto grau	6	19,1%	II	ITD	Cirurgia, lomustina	142 †	RP
26	Dogo Argentino	I	Grau 2 / Alto grau	1	5,5%	II	Nativo	Cirurgia, clorambucila	493	RP
27	Cocker Americano	I	Grau 2 / Baixo grau	0	13,5%	III	Nativo	Cirurgia, clorambucila	857	DE ±
28	Sem raça definida	III	Grau 2 / Alto grau	0	3,0%	II	Nativo	Cirurgia	152	DE ±
29	Sem raça definida	I	Grau 2 / Alto grau	14	12,0%	II	Nativo	Cirurgia	569	RP
30	Labrador	I	Grau 3 / Alto grau	72	51,2%	III	Nativo	Cirurgia	10	DE
31	Dachshund	I	Grau 2 / Alto grau	0	2,0%	II	Nativo	Cirurgia, clorambucila	1006	RP ±
32	Dachshund	I	Grau 2 / Alto grau	2	1,9%	II	Nativo	Cirurgia, lomustina	175	RP
33	Sem raça definida	I	Grau 2 / Baixo grau	0	1,8%	I	Nativo	Cirurgia, clorambucila	78	RP ±
34	Shar-pei	I	Grau 2 / Alto grau	2	15,0%	I	Nativo	Cirurgia	30	DE ±
35	Sem raça definida	I	Grau 2 / Alto grau	2	10,0%	II	Nativo	Cirurgia, lomustina, clorambucila	485	RP ±
36	Rottweiler	II	Grau 3 / Alto grau	40	30,0%	III	ITD	Prednisona	42 †	DE
37	Labrador	I	Grau 1 / Baixo grau	0	5,7%	II	Nativo	Cirurgia	351	RP
38*	Pug	III	Grau 2 / Alto grau	6	44,0%	I	Nativo	Cirurgia	90 †	RP
39	Labrador	I	Grau 2 / Baixo grau	2	7,0%	II	Nativo	Cirurgia, clorambucila	216	RP
40	Maltês	I	Grau 2 / Baixo grau	0	3,0%	II	Nativo	Cirurgia	306	RP
41	Sem raça definida	I	Grau 2 / Baixo grau	1	4,0%	II	Nativo	Cirurgia	20	RP
42	Labrador	I	Grau 2 / Alto grau	0	30,0%	III	Nativo	Cirurgia, vimblastina, clorambucila	543	DE
43	Pug	I	Grau 2 / Baixo grau	3	45,0%	II	Nativo	Cirurgia marginal, vimblastina, clorambucila	419	RP
44	Dachshund	I	Grau 2 / Baixo grau	4	2,0%	I	Nativo	Cirurgia marginal	165	RP
45	Shar-pei	I	Grau 2 / Baixo grau	4	26,0%	II	Nativo	Cirurgia	20	RP

46	Sem raça definida	I	Grau 2 / Baixo grau	3	11,0%	II	Nativo	Cirurgia, vimblastina	179	RP
47	Labrador	I	Grau 2 / Baixo grau	1	18,0%	III	Nativo	Cirurgia, vimblastina	235	DE
48	Sem raça definida	I	Grau 2 / Baixo grau	1	6,0%	I	Nativo	Cirurgia	516	RP
49	Sem raça definida	I	Grau 2 / Alto grau	14	2,6%	II	Nativo	Cirurgia, lomustina, clorambucila	393	RP
50	Yorkshire	I	Grau 2 / Baixo grau	3	38,0%	II	Nativo	Cirurgia	240	DE
51	Labrador	I	Grau 2 / Baixo grau	0	4,5%	I	Nativo	Cirurgia	180	RP
52*	Labrador	II	Grau 2 / Alto grau	5	47,0%	II	ITD	Cirurgia, lomustina, vimblastina	60	DE
53	Labrador	I	Grau 2 / Baixo grau	0	12,2%	II	Nativo	Cirurgia	622	RP
54	Golden Retriever	I	Grau 2 / Baixo grau	0	1,2%	I	Nativo	Cirurgia	257	RP
55	Sem raça definida	I	Grau 2 / Baixo grau	3	12,0%	I	Nativo	Cirurgia, vimblastina, clorambucila	496	PR
56	Golden Retriever	I	Grau 2 / Baixo grau	2	17,0%	I	Nativo	Cirurgia, vimblastina, clorambucila	490	RP
57*	Shar-pei	III	Grau 2 / Alto grau	6	7,0%	I	Nativo	Mastitinib	133 †	DE
58	Labrador	I	Grau 2 / Alto grau	1	10,0%	I	Nativo	Cirurgia	310	RP
59	Shih-tzu	I	Grau 2 / Baixo grau	0	12,0%	II	Nativo	Cirurgia, clorambucila	260	RP
60	Labrador	I	Grau 2 / Alto grau	1	2,0%	III	Nativo	Cirurgia	240	DE
61	Schnauzer	I	Grau 2 / Alto grau	3	42,0%	I	Nativo	Cirurgia, lomustina	195 †	DE
62	Bulldogue Francês	I	Grau 2 / Baixo grau	1	12,0%	II	Nativo	Cirurgia, clorambucila	246	DE

Estágios I a IV definidos pela Organização Mundial de Saúde (London e Thamm, 2013).
MI – mitotic index (índice mitótico), KITr – receptor KIT, sendo KIT I a expressão membranar, KIT II a expressão citoplasmática focal e KIT III a expressão citoplasmática difusa (Kiupel et al., 2004).
ITD – *internal tandem duplication* (duplicação interna em tandem), RT – radioterapia, RP – remissão parcial, DE – doença estável.
* Mastocitoma recorrente, † Óbito relacionado ao mastocitoma, ‡Atraso/deiscência na cicatrização.

Nenhum paciente apresentou remissão completa ou doença progressiva, mas observou-se resposta, com remissão parcial em 64,5% dos casos (40/62), demonstrada na figura 4, enquanto 35,5% (22/62) tiveram doença estável, durante o curso dos GCs. A exérese cirúrgica foi realizada, após o curso rápido de GCs, em 85,5% (53/62) desses pacientes, sendo 90% (36/40) naqueles com remissão parcial e 77,3% (17/22) naqueles com doença estável, mas não foi possível nos demais, submetidos apenas à biópsia incisional. Tratamentos adjuvantes foram instituídos em 66,7% (24/36) e 70,6% (12/17) dos pacientes com remissão parcial e doença estável, respectivamente, e incluíram RT (n = 4 e n = 1, respectivamente), QT (n = 17 e n = 6, respectivamente) e TKI (n = 3 e n = 5, respectivamente).

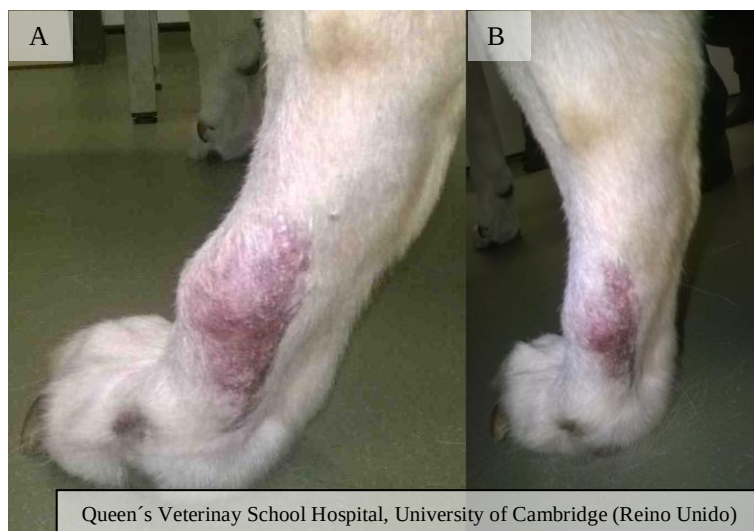


Figura 4 – Mastocitoma de grau 2/baixo grau anterior à citorredução, medindo 2,1x0,6cm (A) e após o tratamento com prednisolona, medindo 1,6x0,4cm (B), com redução de aproximadamente 50% (remissão parcial).

A resposta aos GCs e a associação, com os parâmetros clínicos, anatomo-patológicos, imuno-histoquímicos e genéticos avaliados, encontram-se dispostos na tabela 6. Características de menor interesse, também foram testadas, incluindo a raça, idade e localização tumoral, cujas diferenças não foram significativas. Também não foram observadas diferenças na resposta aos GCs em relação ao histórico de recorrência tumoral e estadiamento clínico, embora maiores taxas de resposta tenham sido observadas nos cães sem histórico de recorrência e no estágio inicial do mastocitoma, com uma tendência à significância para o estadiamento ($p=0,07$).

Tabela 6 – Resposta aos glicocorticóides conforme os principais aspectos clínicos, anatomo-patológicos, imuno-histoquímicos e genéticos estudados.							
	Remissão parcial	Doença estável	Total		Remissão parcial	Doença estável	Total
Histórico de recorrência tumoral				Status mutacional do exon 11 do gene <i>c-kit</i>			
Não	29 (72,5%)	11 (27,5%)	40	Nativo	36 (66,7%)	18 (33,3%)	54
Sim	6 (50,0%)	6 (50,0%)	12	ITD	4 (50,0%)	4 (50,0%)	8
Estadiamento clínico (Owen, 1980)				KITr			
I	29 (72,5%)	11 (27,5%)	40	KIT I	14 (77,8%)	4 (22,2%)	18
II	5 (62,5%)	3 (37,5%)	8	KIT II	27 (75,0%)	9 (25,0%)	36
III	6 (42,9%)	8 (57,1%)	14	KIT III	0 (0,0%)	8 (100,0%)	8
Graduação de Patnaik et al. (1984)				Infiltrado eosinofílico			
Grau 1	3 (100,0%)	0 (0,0%)	3	Discreto	20 (69,0%)	9 (31,0%)	29
Grau 2	35 (67,3%)	17 (32,7%)	52	Moderado	16 (80,0%)	4 (20,0%)	20
Grau 3	2 (28,6%)	5 (71,4%)	7	Intenso	6 (46,2%)	7 (53,8%)	13
Graduação de Kiupel et al. (2011)				Organização			
Baixo grau	25 (78,1%)	7 (21,9%)	32	Cordão	21 (91,3%)	2 (8,7%)	23
Alto grau	15 (50,0%)	15 (50,0%)	30	Manto	21 (53,9%)	18 (46,1%)	39
Índice mitótico				Ki-67 (n=61)			
Inferior a 5 em 10 hpf	35 (74,5%)	12 (25,5%)	47	Inferior a 6,5 %	20 (90,9%)	2 (9,1%)	22
Superior a 5 em 10 hpf	7 (46,6%)	8 (53,3%)	15	Superior a 6,5 %	19 (58,7%)	20 (51,3%)	39
Estágios de I a IV definidos pela Organização Mundial de Saúde (London e Thamm, 2013). KITr – receptor KIT, sendo KIT I a expressão membranar, KIT II a expressão citoplasmática focal e KIT III a expressão citoplasmática difusa (Kiupel et al., 2004). HPF – high power field (campo de maior aumento), ITD – <i>internal tandem duplications</i> (duplicações internas em tandem).							

Em relação ao quadro anátomo-patológico não houve correlação da resposta aos GCs à intensidade do edema intercelular, infiltrado eosinofílico, necrose e hemorragia. Entretanto, observou-se correlação moderada, com a forma predominante de organização tumoral, dentro de cada espécime, sendo que a distribuição em cordão apresentou maior probabilidade de resposta aos GCs, em relação à distribuição em manto (resposta parcial em 91,3% x 53,9% dos pacientes, respectivamente; $p = 0,02$, $r_s = 0,375$). As graduações de Patnaik et al. (1984) e Kiupel et al. (2011) também se correlacionaram à resposta aos corticosteróides ($p = 0,006$, $r_s = 0,346$ e $p = 0,02$, $r_s = 0,536$, respectivamente).

Apesar de não ter havido correlação com o índice mitótico, observou-se uma tendência à significância ($p = 0,1$), com menor resposta em pacientes com índice mitótico superior a cinco em 10 campos (40x), e obteve-se correlação, moderada e altamente significativa, com o percentual de Ki-67 ($p < 0,001$, $r_s = 0,536$), considerando-se 61 amostras, pois não foi possível realizar a marcação no material de um paciente, provavelmente por falha na preservação e recuperação antigênica. Ao se aplicar a curva ROC, obteve-se o ponto de corte de 6,5%, com sensibilidade de 90% e especificidade de 50% para a resposta aos GCs (OR = 1,866). A resposta aos corticosteróides se correlacionou, também, com a expressão de KITr ($p = 0,002$; $r_s = 0,380$), embora não tenha tido associação com o status mutacional do exon 11 do gene *c-kit*.

Em relação à SG, os pacientes que não responderam, de forma mensurável, aos GCs atingiram a mediana com 267 dias, enquanto aqueles que desenvolveram remissão parcial não atingiram a mediana. A resposta favorável aos corticosteróides esteve, portanto, associada ao aumento da SG dos pacientes, nesse estudo, conforme demonstrada na figura 5 ($p = 0,01$).

A biópsia excisional foi realizada em 51 pacientes, observando-se atraso da ferida cirúrgica em 3/51 (5,9%) e deiscência em 9/51 (17,6%).

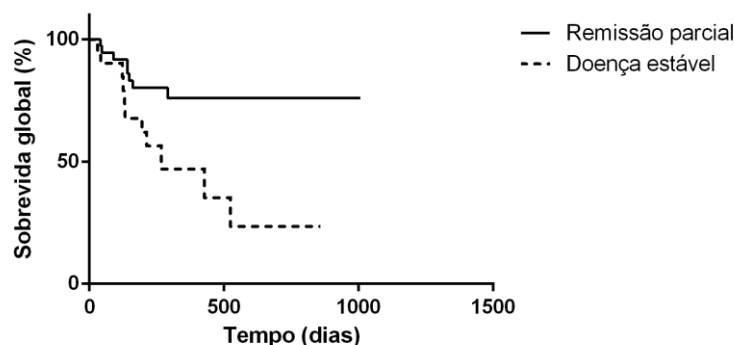


Figura 5 – Representação gráfica da sobrevida global de 62 cães com mastocitoma submetidos ao tratamento com corticosteróides, de acordo com a resposta obtida, sendo remissão parcial ($n = 40$, mediana não atingida) ou doença estável ($n = 22$, Md = 267 dias) com $p = 0,01$.

Discussão

A redução do número de mastócitos em tecidos normais é um efeito tradicionalmente conhecido dos GCs (Schlossmacher et al., 2011). De fato, respostas mensuráveis foram identificadas na maioria dos pacientes desse estudo (64,5%). Entretanto, conforme relatado por Stanclift e Gilson (2008), a citorredução, promovida pelos corticosteróides, no tratamento de doença macroscópica, é temporária e a cirurgia ou novas abordagens terapêuticas devem ser instituídas,

conforme preconizado na metodologia desse estudo, e por Warland et al. (2015), dentro de 7-10 dias.

De acordo com Takahashi et al. (1997) e Schmidt et al. (2004), a resposta aos GCs é dose-dependente, o que justifica, parcialmente, a ampla variação observada por diferentes autores. McCaw et al. (1994), obtiveram uma resposta clínica mensurável em apenas 25% (5/25) dos pacientes tratados com prednisona na dose de 1 mg/kg q 24 horas, semelhante ao resultado obtido por Rassnick et al. (1999), enquanto Dobson et al. (2004), observaram resposta em 75% (18/24) dos pacientes tratados com prednisolona na dose de 40 mg/m² por 14 dias, similar ao resultado observado nesse estudo, que utilizou a mesma dose. Conforme realizado neste estudo, a triancinolona pode ser utilizada, de forma segura, com aplicações intralesionais semanais na dose de 0,22 mg/kg (máximo 6 mg por animal), em pacientes com mastocitomas solitários, apresentando obesidade, endocrinopatias ou doenças osteoartíticas, com o objetivo de reduzir potenciais efeitos colaterais do fármaco administrado por via sistêmica (Fan e De Lorimier, 2005).

Bloom (1952) foi o primeiro pesquisador a relatar, de forma detalhada, uma resposta terapêutica favorável à cortisona, em um cão com mastocitoma, apresentando nódulos cutâneos múltiplos na região do ombro, pescoço e dorso, com redução do volume em aproximadamente 75% e remissão completa de algumas lesões. No entanto, a resposta aos GCs e a relação com fatores prognósticos foi pouco estudada. Conforme descrito por Takahashi et al. (1997), mastocitomas de graduação intermediária a baixa, frequentemente respondem ao uso de GCs. De uma forma geral, tumores bem diferenciados, com distribuição predominantemente em cordão, apresentando graduação baixa a intermediária, expressão membranar ou citoplasmática focal de KITr e fração de crescimento, avaliada pelo Ki-67, inferior a 6,5%, apresentaram maiores taxas de resposta aos GCs, nesse estudo. O ponto de corte, estabelecido, pela curva ROC, para o Ki-67 (6,5%), apresenta elevada sensibilidade, na definição daqueles que provavelmente irão responder aos GCs, atribuindo uma chance de aproximadamente 1,9x maior, naqueles pacientes com Ki-67 inferior a 6,5%. Entretanto, a especificidade de apenas 50% indica que pacientes com elevada expressão de Ki-67, podem, também, demonstrar resposta favorável ao uso desses fármacos.

GCs podem apresentar ação citotóxica, com indução da apoptose, no entanto, seu principal efeito farmacológico envolve a redução da fração de crescimento e taxa de proliferação celular, o que pode justificar as baixas taxas de remissão completa e reduzida aplicabilidade, como terapia isolada, nos cenários adjuvante e neoadjuvante para o mastocitoma canino (McCaw et al., 1994).

O mecanismo de ação dos GCs nas células neoplásicas ainda não é completamente compreendido, mas parece ser mediado por receptores celulares presentes no núcleo e também no citoplasma (Takahashi et al., 1997). Em mastócitos não neoplásicos, ativados em processos inflamatórios, os GCs são capazes de suprimirem sua função a partir da inibição de determinados fatores transcricionais, a exemplo de NFkB, resultando em redução da atividade de Erk1/2, por múltiplos mecanismos, que incluem a redução da expressão de proteínas adaptadoras – como SLAP (*Src-like adaptor protein*) – e aumento da expressão de fosfatases, com destaque para DUSPs 1, 2, 4 e 9 (*dual specificity phosphatase*), que promovem a desforilação de Erk1, mas também de MAPK (Obiri et al., 2012; Oppong et al., 2013). Entretanto, o mecanismo preciso de inibição dos mastócitos pelos GCs permanece desconhecido (Oppong et al., 2013).

Historicamente, a resistência natural aos GCs foi atribuída à perda de receptores celulares específicos (McCaw et al., 1994). Entretanto, um estudo “*in vitro*”, conduzido por Takahashi et al. (1997), com duas culturas celulares distintas, derivadas de mastocitomas cutâneos e do intestino de cães, demonstrou resposta apenas na primeira linhagem. O receptor foi detectado em ambos os tipos celulares, com similaridade no número de sítios de ligação e afinidade três vezes maior nas células derivadas de mastocitoma intestinal. Resultados semelhantes foram obtidos com culturas celulares linfóides humanas (Roseneau et al., 1971; Barrett et al., 1981). Os autores concluíram que a resposta aos GCs não pode ser inferida pela simples presença dos receptores e que a resistência tumoral pode ser atribuída, parcialmente, à existência de mutações pontuais nos genes responsáveis pela síntese dessas moléculas, resultando em falha na ativação transcricional, apesar da expressão e ligação regulares. Outros mecanismos incluem alterações na expressão da glicoproteína-P e proteínas resposta ao estresse (proteínas de choque térmico) (Kojika et al., 1996). É provável que a resposta aos corticosteróides seja perdida durante a progressão tumoral do mastocitoma canino, o que justifica, em parte, a menor resposta observada em tumores recidivantes, neste estudo. Conforme demonstrado nesses resultados, a sensibilidade aos esteróides constitui um fator prognóstico relevante para o mastocitoma canino. Os corticosteroides provavelmente estão relacionados com as fases iniciais do desenvolvimento tumoral e a perda dessa resposta, pode ocorrer, durante a progressão tumoral, o que infere em baixo poder terapêutico desses fármacos, em pacientes com doença avançada, apresentando mastocitomas pouco diferenciados e elevada expressão de Ki-67. Entretanto, novos estudos são necessários para avaliar a influência de GCs em protocolos quimioterápicos adjuvantes no mastocitoma canino.

A resposta do mastocitoma canino aos GCs esteve relacionada ao prognóstico desses pacientes, e a ausência de uma resposta favorável esteve relacionada à redução na sobrevida global. Tratamentos adjuvantes foram recomendados segundo o risco de recorrência ou metástase (London e Thamm, 2013), entretanto, não interferiram na curva de sobrevida global, uma vez que o percentual de cães tratados, no cenário adjuvante, foi similar nos grupos contendo pacientes que apresentaram remissão parcial ou doença estável após o curso rápido de GCs.

O uso de GCs pode facilitar o manejo do mastocitoma canino e melhorar as condições para a cirurgia (Stanclift e Gilson, 2008). Em determinados casos, principalmente na existência de doença inoperável ou metástase distante, pode-se optar pela realização de uma biópsia incisional (Warland et al., 2015), para obtenção de informações prognósticas e preditivas, inclusive para a resposta aos GCs, conforme descrito nesse estudo. Características anátomo-patológicas e imuno-histoquímicas distintas podem ser obtidas em biópsias realizadas antes e após o tratamento com GCs, mas não foi objetivo desse estudo avaliar essa diferença, tendo em vista a impossibilidade de se coletar uma amostra idêntica do tumor em tempos distintos.

Apesar desse estudo não ter incluído um grupo controle, as taxas de complicações pós-operatórias (23,5%) foram similares aquelas observadas por Killick et al. (2011) em relação ao mastocitoma canino (20%), sem a menção de tratamentos com corticosteróides, apontando reduzida interferência da terapia neoadjuvante com GCs nesses pacientes, da mesma forma que observado por Stanclift e Gilson (2008). Estudos controlados são necessários para avaliação do risco de deiscência ou atraso na cicatrização promovido pela utilização neoadjuvante de corticosteróides em cães com mastocitoma, embora o benefício da utilização desses fármacos, incluindo informação prognóstica e melhoria da condição cirúrgica, deva ser considerado.

Conclusões

Respostas clínicas mensuráveis podem ser obtidas em uma porcentagem significativa dos cães com mastocitoma submetidos ao tratamento com GCs, mas principalmente naqueles apresentando tumores bem diferenciados, de graduação intermediária a baixa, com distribuição, predominantemente em cordão, expressão membranar ou citoplasmática focal de KITr e reduzida fração de crescimento estimada pelo Ki-67. A resposta aos GCs pode representar um importante fator prognóstico para o mastocitoma canino.

ESTUDO 2 – ESTABELECIMENTO DO RISCO DE RECORRÊNCIA OU METÁSTASE ASSOCIADO AO MASTOCITOMA CANINO

Introdução

O câncer se destaca dentre as doenças dos cães devido a sua elevada incidência, morbidade e mortalidade (Gil da Costa, 2015). A pele e tecidos subcutâneos são os principais sítios primários de neoplasias em cães, compreendendo aproximadamente 1/3 dos processos neoplásicos nessa espécie, sendo que a porcentagem de malignidade pode se aproximar de 40% (Dobson et al., 2002; Hauck, 2013).

O mastocitoma é o segundo tumor maligno mais diagnosticado no Reino Unido, em uma população de 3242 cães cobertos por uma única companhia de seguro (Dobson et al., 2002), e representa 16-21% de todas as neoplasias cutâneas em cães (London e Thamm, 2013).

Entretanto, o mastocitoma é altamente heterogêneo quanto a sua apresentação clínica, potencial de recorrência e disseminação, representando um desafio para a definição de prognóstico e desenvolvimento de protocolos terapêuticos (O'Connell e Thomson, 2012; London e Thamm, 2013).

Diante desse quadro, inúmeros fatores prognósticos foram estudados e validados, incluindo: (1) informações clínicas, a exemplo do estadiamento (Blackwood et al., 2012), raça do paciente (McNiel et al., 2004; London e Thamm, 2013), localização tumoral (Hillman et al., 2010; London e Thamm, 2013) e histórico de recorrência (Bostock, 1973; Patnaik et al., 1984; Thamm et al., 1999; Michels et al., 2002); (2) critérios anatomo-patológicos, com destaque para as graduações tumorais propostas por Patnaik et al. (1984), incluindo três categorias (grau 1, 2 e 3), e Kiupel et al. (2011), com segregação em apenas duas categorias (baixo e alto grau), e índice mitótico (Romansik et al., 2007), embora outras informações histopatológicas também possam ser importantes para o prognóstico do paciente; (3) aspectos imuno-histoquímicos, com avaliação da expressão de Ki-67 (Maglennon et al., 2008; Strefezzi et al., 2010) e KITr (Kiupel et al., 2004; Webster et al., 2006a), mas também de metaloproteinases (MMP-2 e MMP-9) (Leibman et al., 2000) e proteínas ativadoras de fibroblastos (FAP – *fibroblast activating protein*) (Giuliano et al., 2015); e, por último, (4) aspectos genéticos, com maior ênfase as mutações que oferecem ganho de função ao oncogene *c-kit*, a exemplo das duplicações nos exon 11 (Zemke et al., 2002; Webster et al., 2006b; Webster et al., 2008; Avery, 2012), mas também nos exons 8 e 9 (Letard et al., 2008; Takeuchi et al., 2013), que podem, inclusive, predizer uma resposta terapêutica favorável à TKIs licenciados para a utilização em cães nos Estados Unidos e Europa (i.e. masitinib e toceranib) (Hahn et al., 2008; London et al., 2009). Entretanto, o grande número de fatores prognósticos propostos, torna a escolha e tomada de decisão difícil para o clínico de pequenos animais (Warland et al., 2015).

O objetivo desse estudo foi propor classes de risco para recorrência ou metástase em cães com mastocitoma, baseando-se em fatores prognósticos clínicos, anatomo-patológicos, imuno-histoquímicos e genéticos, avaliados individualmente, como forma de facilitar a tomada de decisões e a escolha de protocolos terapêuticos.

Resultados

Foram incluídos nesse estudo 149 cães, com idade entre 36 e 200 meses ($115,6 \pm 36,9$ meses), conforme discriminados na tabela 7.

Aproximadamente 19,5% dos cães incluídos neste estudo (29/149) não apresentaram raça definida, e os demais foram classificados em 34 raças distintas, com maior representação do Labrador (n = 30), seguido das raças Poodle (n = 10), Golden Retriever (n = 7), Pinscher (n = 7), Pit-bull (n = 6), Boxer (n = 5), Dachshund (n = 5) e Cocker Spaniel (n = 5).

O mastocitoma foi considerado solitário em 95,3% dos casos (142/149), sendo que 49,3% (70/142) estavam localizados nos membros e 27,5% (39/142) no tronco, seguido por sítios anatômicos mais específicos e de menor incidência: bolsa escrotal (9,9%), vulva (2,8%), períneo (2,8%), face (2,8%), prepúcio (2,1%), mucosa oral (2,1%) e orelha (0,7%).

Nos pacientes apresentando lesões múltiplas e/ou acometimento de linfonodos, considerou-se àquelas de pior prognóstico, baseando-se na graduação e índice mitótico. Nos pacientes em estágio avançado, com acometimento de linfonodo, o mesmo, quando removido cirurgicamente, foi também utilizado para a definição do padrão de expressão de KITr e status mutacinal no exon 11 do gene *c-kit*, sendo consideradas aquelas de pior prognóstico.

As correlações significativas entre os fatores prognósticos estudados, com seus respectivos índices de significância e coeficiente de Spearmann, encontram-se discriminados na tabela 8.

Tabela 7 – Fatores prognósticos clínicos, anátomo-patológicos, imuno-histoquímicos e genéticos de 149 cães com mastocitoma.													
ID	Raça	Idade	Estágio	Localização	Margem histológica	Graduação	MI	Ki-67	KITr	c-kit status (exon 11)	Tratamento adjuvante	Intervalo livre de doença	Sobrevida global
01*	Boxer	139	III.2	Membro	Comprometida	Grau 2 / Alto grau	9	25,9%	I	Nativo	Cirurgia, lomustina	40	40
02*	SRD	168	II	Tronco	Comprometida	Grau 2 / Alto grau	49	-	II	ITD	Cirurgia, lomustina, clorambucila	350	350
03*	SRD	97	II	Bolsa escrotal	Comprometida	Grau 2 / Alto grau	6	19,1%	II	ITD	Cirurgia, lomustina	109 †	142 †
04	SRD	168	III.1	Multicêntrico	Comprometida	Grau 2 / Alto grau	1	6,3%	II	Nativo	Cirurgia, lomustina, clorambucila	35 †	226 †
05	Schnauzer	144	III.2	Tronco	Comprometida	Grau 2 / Baixo grau	1	35,0%	II	ITD	Cirurgia, lomustina	122 †	148 †
06	Pit-bull	132	II	Membro	Livre	Grau 3 / Alto grau	4	44,0%	II	Nativo	Cirurgia, lomustina	60	60
07*	Pinscher	120	II	Membro	Comprometida	Grau 2 / Baixo grau	0	40,0%	II	ITD	Cirurgia, lomustina, clorambucila	120 †	258 †
08	Poodle	144	II	Bolsa escrotal	Comprometida	Grau 2 / Alto grau	18	3,0%	II	Deleção	Cirurgia, lomustina	30	30
09	Dachshund	156	I	Bolsa escrotal	Exígua	Grau 2 / Alto grau	2	1,9%	II	Nativo	Cirurgia, lomustina	175	175
10*	Poodle	72	II	Membro	Livre	Grau 2 / Alto grau	39	9,5%	III	Nativo	Cirurgia, lomustina	171 †	260 †
11*	Shiba	132	II	Membro	Livre	Grau 3 / Alto grau	14	2,9%	III	Nativo	Cirurgia, lomustina	52 †	52 †
12	SRD	149	I	Tronco	Livre	Grau 2 / Alto grau	2	10,0%	II	Nativo	Cirurgia, lomustina, clorambucila	485	485
13	Labrador	132	III.1	Bolsa escrotal	Comprometida	Grau 2 / Alto grau	2	17,2%	II	Nativo	Cirurgia, lomustina, lomustina metronômica	261 †	409
14	Pit-bull	108	III.1	Multicêntrico	Comprometida	Grau 2 / Alto grau	17	6,0%	II	Nativo	Lomustine (MTD and metronome)	120 †	284
15	Pinscher	132	I	Bolsa escrotal	Exígua	Grau 3 / Alto grau	4	13,0%	II	Nativo	Cirurgia, lomustina, clorambucila	686 †	778
16	Lhasa-apso	60	I	Tronco	Comprometida	Grau 2 / Alto grau	4	8,5%	II	Nativo	Cirurgia, lomustina, clorambucila	240	240

17	SRD	96	I	Membro	Comprometida	Grau 2 / Alto grau	14	2,6%	II	Nativo	Cirurgia, lomustina, clorambucila	393	393
18	Schnauzer	158	I	Membro	Comprometida	Grau 2 / Alto grau	3	42,0%	I	Nativo	Cirurgia, lomustina, masitinib	105 †	195 †
19	Labrador	120	II	Tronco	Comprometida	Grau 2 / Alto grau	5	47,0%	II	ITD	Cirurgia, lomustine, vimblastina	60	60
20	Labrador	120	I	Membro	Comprometida	Grau 2 / Alto grau	3	10,0%	I	Nativo	Cirurgia, lomustina, clorambucila	589	589
21	SRD	101	III.1	Vulva	Comprometida	Grau 2 / Alto grau	3	1,0%	II	Nativo	Cirurgia, lomustina, clorambucila	500	500
22	Fox Paulistinh	149	II	Membro	Comprometida	Grau 3 / Alto grau	50	10,5%	III	Nativo	Cirurgia, lomustina	76	76
23	Pit-bull	129	I	Membro	Exígua	Grau 2 / Alto grau	3	16,0%	II	Nativo	Cirurgia, lomustina	212	212
24	Labrador	146	I	Períneo	Comprometida	Grau 2 / Alto grau	0	30,0%	III	Nativo	Cirurgia, vimblastina, clorambucila	543	543
25	Labrador	140	III.2	Bolsa escrotal	Livre	Grau 2 / Alto grau	3	10,0%	II	Nativo	Cirurgia, vimblastina	122	122
26	Pug	143	I	Membro	Comprometida	Grau 2 / Baixo grau	3	45,0%	II	Nativo	Cirurgia, vimblastina, clorambucila	419	419
27	Lhasa-apso	132	I	Tronco	Comprometida	Grau 2 / Baixo grau	3	22,0%	II	Nativo	Cirurgia, vimblastina, clorambucila	488	488
28	Labrador	108	I	Tronco	Exígua	Grau 2 / Baixo grau	1	18,0%	III	Nativo	Cirurgia, vimblastina	235	235
29	SRD	134	I	Tronco	Comprometida	Grau 2 / Baixo grau	3	11,0%	II	Nativo	Cirurgia, vimblastina, clorambucila	179	179
30	Shih-tzu	36	I	Tronco	Comprometida	Grau 2 / Baixo grau	2	22,0%	II	Nativo	Cirurgia, vimblastina, clorambucila	260	260
31	SRD	144	I	Tronco	Livre	Grau 2 / Baixo grau	3	12,0%	I	Nativo	Cirurgia, vimblastina, clorambucila	496	496
32	Golden Retriever	84	I	Tronco	Livre	Grau 2 / Baixo grau	2	17,0%	I	Nativo	Cirurgia, vimblastina, clorambucila	490	490
33	Poodle	156	I	Bolsa escrotal	Livre	Grau 2 / Alto grau	15	12,0%	II	Nativo	Cirurgia	75 †	213 †

34	Labrador	164	III.1	Multicêntrico	Comprometida	Grau 2 / Alto grau	2	9,5%	II	Nativo	Cirurgia	60 †	60 †
35	SRD	162	I	Tronco	Livre	Grau 3 / Alto grau	41	21,6%	II	Nativo	Cirurgia	190 †	337 †
36	Cocker Spaniel	133	I	Membro	Livre	Grau 3 / Alto grau	3	40,0%	III	Nativo	Cirurgia	52 †	224 †
37	Pastor Alemão	132	II	Mucosa oral	Livre	Grau 2 / Alto grau	8	11,0%	II	Deleção	Cirurgia	134 †	134 †
38*	Pug	100	III.2	Períneo	Livre	Grau 2 / Alto grau	6	44,0%	I	Nativo	Cirurgia	15 †	90 †
39*	Fila Brasileiro	96	IV	Bolsa escrotal	Comprometida	Grau 2 / Alto grau	7	20,0%	III	Duplicação	Cirurgia	15 †	46 †
40	Fila Brasileiro	82	III.1	Vulva	Livre	Grau 2 / Baixo grau	2	5,5%	I	Nativo	Cirurgia	147	147
41	Weimaraner	72	III.1	Multicêntrico	Comprometida	Grau 2 / Alto grau	0	1,0%	I	Nativo	Cirurgia	106 †	669 †
42	Weimaraner	78	III.1	Multicêntrico	Comprometida	Grau 2 / Alto grau	1	10,5%	II	Nativo	Cirurgia	274 †	381 †
43	Cocker	120	III.2	Prepúcio	Comprometida	Grau 2 / Baixo grau	3	42,0%	I	Nativo	Cirurgia	83 †	83 †
44	SRD	120	III.1	Membro	Comprometida	Grau 2 / Alto grau	0	3,0%	II	Nativo	Cirurgia	152	152
45	SRD	99	I	Bolsa escrotal	Comprometida	Grau 3 / Alto grau	15	-	II	Nativo	Cirurgia	90	254
46	Cocker Spaniel	156	I	Face	Comprometida	Grau 3 / Alto grau	5	26,5%	II	Nativo	Cirurgia	107 †	107 †
47	Pit-bull	112	III.1	Multicêntrico	Comprometida	Grau 3 / Alto grau	2	2,2%	II	Nativo	Cirurgia, clorambucila	828	828
48	SRD	108	I	Membro	Livre	Grau 2 / Alto grau	14	12,0%	II	Nativo	Cirurgia	569	569
49	Pit-bull	110	I	Membro	Comprometida	Grau 1 / Baixo grau	0	1,2%	I	Nativo	Cirurgia, clorambucila	520	520
50	SRD	125	I	Membro	Comprometida	Grau 1 / Baixo grau	3	5,1%	I	Nativo	Cirurgia, clorambucila	52	52
51	Labrador	139	I	Membro	Comprometida	Grau 2 / Alto grau	1	4,5%	I	Nativo	Cirurgia, clorambucila	52	52
52	Cocker Spaniel	172	I	Membro	Comprometida	Grau 2 / Alto grau	0	12,4%	II	Nativo	Cirurgia, clorambucila	942	942
53	SRD	148	I	Membro	Comprometida	Grau 1 / Baixo grau	1	17,0%	III	Nativo	Cirurgia, clorambucila	213	213
54	Dogo Argentino	122	I	Membro	Comprometida	Grau 2 / Alto grau	1	5,5%	II	Nativo	Cirurgia, clorambucila	493	493
55	Cocker Americano	133	I	Tronco	Comprometida	Grau 2 / Baixo grau	0	13,5%	II	Nativo	Cirurgia, clorambucila	857	857

56	Labrador	96	I	Membro	Comprometida	Grau 2 / Alto grau	0	2,3%	I	Nativo	Cirurgia, clorambucila	365	365
57	Schnauzer	181	I	Membro	Comprometida	Grau 2 / Alto grau	0	2,1%	II	Nativo	Cirurgia, clorambucila	77	77
58	Bernese	48	I	Membro	Comprometida	Grau 2 / Alto grau	0	3,0%	III	Nativo	Cirurgia, clorambucila	426	426
59	Dachshund	120	I	Membro	Exígua	Grau 2 / Alto grau	0	2,0%	I	Nativo	Cirurgia, clorambucila	1006	1006
60	Labrador	132	I	Membro	Comprometida	Grau 2 / Alto grau	0	0,3%	I	Nativo	Cirurgia, clorambucila	847	847
61	SRD	144	I	Membro	Comprometida	Grau 2 / Baixo grau	0	1,8%	I	Nativo	Cirurgia, clorambucila	78	78
62	SRD	144	I	Tronco	Comprometida	Grau 2 / Alto grau	2	2,6%	II	Nativo	Cirurgia, clorambucila	60	60
63	Weimaraner	111	I	Membro	Comprometida	Grau 2 / Alto grau	0	1,0%	I	Nativo	Cirurgia, clorambucila	536	536
64	Labrador	136	I	Membro	Exígua	Grau 2 / Baixo grau	2	7,0%	II	Nativo	Cirurgia, clorambucila	216	216
65	Poodle	140	I	Tronco	Comprometida	Grau 2 / Baixo grau	2	2,7%	I	Nativo	Cirurgia, clorambucila	271	271
66	Pinscher	120	I	Vulva	Comprometida	Grau 2 / Baixo grau	0	4,0%	I	Nativo	Cirurgia, clorambucila	256	256
67	Labrador	120	I	Tronco	Comprometida	Grau 2 / Alto grau	3	4,5%	II	Nativo	Cirurgia, clorambucila	372 †	437
68	Poodle	72	I	Tronco	Livre	Grau 2 / Alto grau	3	5,0%	I	Nativo	Cirurgia, clorambucila	543	543
69*	Yorkshire	84	I (livre)	Tronco	Comprometida	Grau 2 / Alto grau	2	10,0%	II	Nativo	Cirurgia, clorambucila	563	563
70	Shih-tzu	156	I (livre)	Tronco	Livre	Grau 2 / Baixo grau	0	12,0%	II	Nativo	Cirurgia, clorambucila	260	260
71	Bulldogue francês	77	I	Prepúcio	Comprometida	Grau 2 / Baixo grau	1	12,0%	II	Nativo	Cirurgia, clorambucila	246	246
72	SRD	110	I	Bolsa escrotal	Comprometida	Grau 2 / Alto grau	1	9,8%	II	Nativo	Cirurgia, clorambucila	120	120
73	SRD	82	I	Membro	Comprometida	Grau 2 / Baixo grau	0	5,8%	I	Nativo	Cirurgia	983	983
74	Dachshund	200	I	Membro	Exígua	Grau 2 / Baixo grau	4	2,0%	I	Nativo	Cirurgia	165	165
75	Poodle	186	I	Tronco	Comprometida	Grau 2 / Baixo grau	1	6,9%	II	Nativo	Cirurgia	1155	1155
76	Poodle	198	I	Tronco	Comprometida	Grau 2 / Baixo grau	1	24,8%	I	Nativo	Cirurgia	603	603
77	Yorkshire	197	I	Membro	Livre	Grau 2 / Baixo grau	3	38,0%	II	Nativo	Cirurgia	240	240
78	Labrador	96	I	Tronco	Comprometida	Grau 2 / Baixo grau	1	10,0%	I	Nativo	Cirurgia	310	310

79	Golden Retriever	132	I	Tronco	Comprometida	Grau 2 / Baixo grau	2	4,2%	II	Nativo	Cirurgia	179	179
80	Labrador	132	I	Membro	Livre	Grau 2 / Alto grau	1	2,0%	III	Nativo	Cirurgia	240	240
81	SRD	163	I	Tronco	Comprometida	Grau 2 / Alto grau	2	4,0%	II	Nativo	Cirurgia	181	181
82	SRD	120	I	Membro	Exígua	Grau 2 / Baixo grau	0	5,3%	II	Nativo	Cirurgia	780	780
83	Staffordshire Bull Terrier	119	I	Bolsa escrotal	Exígua	Grau 2 / Baixo grau	1	0,7%	I	Nativo	Cirurgia	190	190
84	Labrador	153	I	Membro	Livre	Grau 1 / Baixo grau	2	4,0%	II	Nativo	Cirurgia	306	306
85	Pit-bull	126	I	Orelha	Livre	Grau 1 / Baixo grau	0	2,2%	II	Nativo	Cirurgia	230	230
86	Dogue Alemão	72	I	Membro	Livre	Grau 2 / Alto grau	0	5,0%	I	Nativo	Cirurgia	136	136
87	Fox Paulistinha	120	I	Membro	Livre	Grau 2 / Alto grau	0	3,5%	II	Nativo	Cirurgia	60	60
88	Labrador	119	I	Membro	Livre	Grau 1 / Baixo grau	0	5,7%	II	Nativo	Cirurgia	351	351
89	Maltês	145	I	Membro	Livre	Grau 2 / Baixo grau	0	3,0%	II	Nativo	Cirurgia	306	306
90	Labrador	156	I	Vulva	Livre	Grau 2 / Baixo grau	0	8,0%	I	Nativo	Cirurgia	267	267
91	SRD	144	I	Membro	Livre	Grau 2 / Baixo grau	1	4,0%	II	Nativo	Cirurgia	20	20
92	SRD	48	I	Tronco	Livre	Grau 2 / Baixo grau	1	6,0%	I	Nativo	Cirurgia	516	516
93	Labrador	60	I	Face	Livre	Grau 2 / Baixo grau	0	4,5%	I	Nativo	Cirurgia	180	180
94	Golden Retriever	128	I	Tronco	Livre	Grau 2 / Baixo grau	0	1,2%	I	Nativo	Cirurgia	257	257
95	SRD	60	I	Tronco	Livre	Grau 2 / Baixo grau	0	3,0%	I	Nativo	Cirurgia	301	301
96	Labrador	108	I	Membro	Livre	Grau 2 / Baixo grau	0	12,2%	II	Nativo	Cirurgia	622	622
97	Labrador	84	I	Tronco	Livre	Grau 2 / Baixo grau	0	2,0%	II	Nativo	Cirurgia	1001	1001
98	Boxer	108	I	Tronco	Exígua	Grau 2 / Baixo grau	1	8,8%	I	Nativo	Cirurgia	161	161
99	Dachshund	159	I	Tronco	Comprometida	Grau 3 / Alto grau	26	64,0%	III	ITD	Cirurgia, mastinib	180	180
100	Pinscher	149	III.1	Bolsa escrotal	Livre	Grau 3 / Alto grau	1	12,8%	III	Nativo	Cirurgia, mastinib	260	260
101*	Pinscher	180	II	Tronco	Comprometida	Grau 2 / Alto grau	3	2,0%	II	Nativo	Cirurgia, mastinib	189 †	292 †

102*	Poodle	156	III.2	Bolsa escrotal	Comprometida	Grau 2 / Alto grau	18	14,1%	II	ITD	Cirurgia, mastinib	198 †	213 †
103	Jack Russel Terrier	111	II	Tronco	Exígua	Grau 2 / Alto grau	8	21,0%	II	Nativo	Cirurgia, mastinib	153 †	267 †
104	Labrador	93	I	Períneo	Comprometida	Grau 3 / Alto grau	0	6,0%	II	Nativo	Cirurgia, mastinib	357	357
105	Golden Retriever	136	II	Membro	Comprometida	Grau 2 / Alto grau	0	12,0%	II	Nativo	Cirurgia, mastinib	223	223
106*	Shar-pei	72	III.1	Multicêntrico	-	Grau 2 / Alto grau	6	7,0%	I	Nativo	Mastinib	40 †	133 †
107*	Bulldog Francês	48	III.2	Tronco	-	Grau 3 / Alto grau	20	58,0%	III	Nativo	Toceranib	124 †	131 †
108*	SRD	59	III.2	Tronco	-	Grau 3 / Alto grau	60	44,7%	II	Nativo	Mastinib	-	30 †
109*	Bulldog Francês	35	III.2	Tronco	-	Grau 3 / Alto grau	5	34,0%	III	Nativo	Mastinib	-	103 †
110	SRD	115	III.1	Membro	-	Grau 2 / Baixo grau	2	13,0%	I	Nativo	Mastinib	-	123 †
111*	Pinshcer	144	III.2	Tronco	Comprometida	Grau 2 / Alto grau	4	25,0%	I	ITD	Mastinib	-	92 †
112	SRD	123	III.2	Face	-	Grau 2 / Alto grau	3	52,0%	II	ITD	Mastinib	120	120
113*	Schnauzer	156	IV	BE	-	Grau 2 / Alto grau	33	60,0%	I	Nativo	Toceranib	-	15 †
114*	Pinscher	120	III.2	Membro	-	Grau 2 / Baixo grau	4	40,0%	II	ITD	Mastinib	-	42 †
115	Shar-pei	120	III.1	Períneo	-	Grau 3 / Alto grau	44	91,2%	II	Nativo	Mastinib	400 †	427 †
116*	Jack Russel Terrier	140	III.2	Membro	-	Grau 3 / Alto grau	15	19,8%	II	ITD	Mastinib	-	57 †
117*	Labrador	48	II	Membro	-	Grau 2 / Baixo grau	2	5,6%	II	Nativo	Mastinib	-	161 †
118*	Boxer	60	II	Membro	-	Grau 2 / Alto grau	2	20,0%	II	Nativo	Mastinib	-	101 †
119*	Dogue de Bordeaux	29	II	Tronco	-	Grau 3 / Alto grau	28	40,0%	III	ITD	Mastinib	114 †	203 †
120*	Greyhound	132	II	Membro	-	Grau 3 / Alto grau	4	40,9%	II	Nativo	Mastinib	52 †	160 †
121*	Border Collie	145	III.1	Tronco	-	Grau 2 / Baixo grau	5	12,4%	I	Nativo	Mastinib	-	47 †
122*	Poodle	36	III.1	Membro	-	Grau 2 / Alto grau	14	38,0%	II	Nativo	Mastinib	-	23 †
123	Labrador	105	III.1	Prepúcio	-	Grau 3 / Alto grau	12	8,4%	II	Nativo	Mastinib	-	288 †
124	Golden Retriever	106	I	Membro	Comprometida	Grau 2 / Alto grau	0	13,0%	I	Nativo	Cirurgia marginal, RT	319	319

125*	Boxer	80	I	Membro	Comprometida	Grau 2 / Baixo grau	6	11,8%	II	Nativo	Cirurgia marginal, RT	2055	2055
126	Poodle Toy	132	I	Mucosa oral	Comprometida	Grau 2 / Baixo grau	1	13,6%	I	Nativo	Cirurgia marginal, RT	173 †	1501
127*	Golden Retriever	118	I	Membro	Comprometida	Grau 2 / Baixo grau	0	4,6%	II	Nativo	Cirurgia marginal, RT	397	397
128	Golden Retriever	109	I	Membro	Comprometida	Grau 2 / Baixo grau	2	58,0%	II	Nativo	Cirurgia marginal, RT	524 †	524 †
129	Golden Retriever	84	I	Membro	Comprometida	Grau 2 / Baixo grau	1	2,2%	II	Nativo	Cirurgia marginal, RT	171	171
130	Setter	48	I	Face	Comprometida	Grau 2 / Baixo grau	1	1,3%	I	Nativo	Cirurgia marginal, RT	1475	1475
131	Spitz Japonês	108	I	Membro	Comprometida	Grau 2 / Baixo grau	5	28,8%	II	Nativo	Cirurgia marginal, RT	112	112
132	Labrador	88	I	Membro	Comprometida	Grau 2 / Baixo grau	2	13,0%	II	Nativo	Cirurgia marginal, RT	730	730
133	Great Dane	89	I	Membro	Comprometida	Grau 2 / Baixo grau	1	22,7%	II	Nativo	Cirurgia marginal, RT	1020 †	1020 †
134	Labrador	111	I	Membro	Comprometida	Grau 2 / Baixo grau	0	6,0%	II	Nativo	Cirurgia marginal, RT	76 †	142 †
135	SRD	44	I	Membro	Comprometida	Grau 2 / Baixo grau	6	29,0%	II	Nativo	Cirurgia marginal, RT	1612	1612
136	Labrador	77	I	Membro	Comprometida	Grau 2 / Baixo grau	4	4,0%	II	Nativo	Cirurgia marginal, RT	1106	1106
137	Pastor Alemão	69	I	Membro	Comprometida	Grau 2 / Baixo grau	2	2,3%	II	Nativo	Cirurgia marginal, RT	681	681
138	Labrador	96	I	Membro	Comprometida	Grau 2 / Baixo grau	0	3,4%	I	Nativo	Cirurgia marginal, RT	503	503
139	Great Dane	68	I	Membro	Comprometida	Grau 2 / Baixo grau	0	5,4%	II	Nativo	Cirurgia marginal, RT	203	203
140*	Staffordshire Bull Terrier	110	I	Membro	Comprometida	Grau 2 / Baixo grau	0	3,5%	II	Nativo	Cirurgia marginal, RT	507	507
141	Labrador	94	I	Membro	Comprometida	Grau 2 / Baixo grau	2	3,2%	I	Nativo	Cirurgia marginal, RT	448	448
142	Boxer	96	I	Membro	Comprometida	Grau 2 / Baixo grau	5	7,9%	I	Nativo	Cirurgia marginal, RT	381	381
143	Border Collie	132	I	Membro	Comprometida	Grau 2 / Baixo grau	0	1,1%	II	Nativo	Cirurgia marginal, RT	447	447
144	Labrador	52	I	Membro	Comprometida	Grau 2 / Baixo grau	2	5,6%	II	Nativo	Cirurgia marginal, RT	465 †	626 †
145*	Labrador	96	III.2	Membro	-	Grau 2 / Baixo grau	3	9,1%	II	Nativo	RT	-	85 †
146*	SRD	168	III.2	Membro	-	Grau 3 / Alto grau	131	51,4%	III	ITD	Prednisona	-	30 †
147	SRD	132	II	Mucosa oral	Comprometida	Grau 3 / Alto grau	18	19,6%	III	ITD	Cirurgia	20	20

148	Shar-pei	117	I	Membro	Comprometida	Grau 2 / Alto grau	2	15,0%	I	Nativo	Prednisona	30	30
149	Rottweiler	54	II	Tronco	Comprometida	Grau 3 / Alto grau	40	30,0%	III	ITD	Prednisona	-	42 †

Estágios I a IV definidos pela Organização Mundial de Saúde (London e Thamm, 2013), mas com divisão do estágio III em III.1 e III.2, respectivamente, na ausência ou presença de envolvimento dos linfonodos regionais.
KITr – receptor KIT, sendo KIT I a expressão membranar, KIT II a expressão citoplasmática focal e KIT III a expressão citoplasmática difusa (Kiupel et al., 2004).
ITD – *internal tandem duplication* (duplicação interna em tandem), RT – radioterapia.
* Mastocitoma recorrente, † recorrência tumoral (intervalo livre de doença) ou óbito relacionado ao mastocitoma (sobrevida global). * mastocitoma recorrente.

Tabela 8 – Correlação entre os fatores prognósticos clínicos, anátomo-patológicos, imuno-histoquímicos e genéticos de 149 cães com mastocitoma

	Estadiamento clínico	Histórico de recorrência	Graduação Patnaik	Graduação Kiupel	Extensão tumoral	Organização tumoral	Cistomatose	Colagenólise	Desmoplasia	Necrose	Multinucleação	Índice mitótico	Ki-67	KITr	c-kit Staus (exon 11)
Estadiamento clínico	-	p < 0,0001; r _s = 0,588	p < 0,0001; r _s = 0,372	p = 0,001; r _s = 0,261	p = 0,004; r _s = 0,270	p < 0,0001; r _s = 0,451	p = 0,006; r _s = -0,369	CNS	CNS	CNS	p = 0,001; r _s = 0,356	p < 0,0001; r _s = 0,518	p < 0,0001; r _s = 0,364	p = 0,005; r _s = 0,233	p < 0,0001; r _s = 0,498
Histórico de recorrência	p < 0,0001; r _s = 0,588	-	p = 0,004; r _s = 0,240	CNS	CNS	CNS	p = 0,006; r _s = -0,363	p = 0,03; r _s = -0,263	CNS	CNS	CNS	p < 0,0001; r _s = 0,395	p = 0,0003; r _s = 0,295	p = 0,05; r _s = 0,165	p = 0,0002; r _s = 0,297
Graduação Patnaik	p < 0,0001; r _s = 0,372	p = 0,004; r _s = 0,237	-	p < 0,0001; r _s = 0,381	p = 0,05; r _s = 0,185	p = 0,003; r _s = 0,306	CNS	CNS	p = 0,03; r _s = 0,268	p = 0,04; r _s = 0,246	p < 0,0001; r _s = 0,634	p < 0,0001; r _s = 0,460	p < 0,0001; r _s = 0,319	p = 0,0001; r _s = 0,361	p = 0,0004; r _s = 0,288
Graduação Kiupel	p = 0,001; r _s = 0,261	CNS	p < 0,0001; r _s = 0,381	-	CNS	p < 0,0001; r _s = 0,404	CNS	CNS	p = 0,03; r _s = 0,271	CNS	p < 0,0001; r _s = 0,699	p < 0,0001; r _s = 0,324	CNS	p = 0,001; r _s = 0,263	CNS
Extensão tumoral	p = 0,004; r _s = 0,270	p = 0,03; r _s = 0,201	p = 0,05; r _s = 0,185	CNS	-	p = 0,002; r _s = 0,330	CNS	CNS	CNS	CNS	CNS	p = 0,05; r _s = 0,187	CNS	CNS	p = 0,02; r _s = 0,222
Organização tumoral	p < 0,0001; r _s = 0,451	p = 0,03; r _s = 0,227	p = 0,003; r _s = 0,306	p < 0,0001; r _s = 0,404	p = 0,002; r _s = 0,330	-	p = 0,03; r _s = -0,302	CNS	p = 0,02; r _s = 0,286	CNS	p < 0,0001; r _s = 0,489	p < 0,0001; r _s = 0,436	p = 0,001; r _s = 0,336	p = 0,0005; r _s = 0,360	-
Cistomatose	p = 0,006; r _s = -0,370	p = 0,006; r _s = -0,363	CNS	CNS	CNS	p = 0,03; r _s = -0,302	-	CNS	CNS	CNS	CNS	p = 0,02; r _s = -0,318	p = 0,002; r _s = -0,419	p = 0,02; r _s = -0,325	p = 0,04; r _s = -0,285
Colagenólise	CNS	p = 0,04; r _s = -0,263	CNS	CNS	CNS	CNS	CNS	-	CNS	CNS	CNS	CNS	CNS	CNS	p < 0,0001; r _s = -0,313
Desmoplasia	CNS	CNS	p = 0,03; r _s = 0,268	p = 0,03; r _s = 0,271	CNS	p = 0,02; r _s = 0,286	CNS	CNS	-	CNS	p = 0,004; r _s = 0,355	p = 0,02; r _s = 0,285	CNS	p = 0,02; r _s = 0,302	CNS

Necrose	CNS	CNS	p = 0,04; r _s = 0,246	CNS	CNS	CNS	CNS	CNS	CNS	-	CNS	CNS	CNS	p = 0,04; r _s = 0,250	CNS
Multinucleação	p = 0,001; r _s = 0,356	CNS	p < 0,0001; r _s = 0,634	p < 0,0001; r _s = 0,699	CNS	p < 0,0001; r _s = 0,489	CNS	CNS	p = 0,004; r _s = 0,355	CNS	-	p < 0,0001; r _s = 0,539	p = 0,05; r _s = 0,229	p = 0,0004; r _s = 0,392	CNS
Índice mitótico	p < 0,0001; r _s = 0,518	p < 0,0001; r _s = 0,395	p < 0,0001; r _s = 0,460	p < 0,0001; r _s = 0,324	p = 0,05; r _s = 0,187	p < 0,0001; r _s = 0,436	p = 0,02; r _s = -0,318	CNS	p = 0,02; r _s = 0,285	p = 0,07; r _s = 0,218	p < 0,0001; r _s = 0,540	-	p < 0,0001; r _s = 0,502	p = 0,0009; r _s = 0,271	p < 0,0001; r _s = 0,334
Ki-67	p < 0,0001; r _s = 0,364	p = 0,0003; r _s = 0,295	p < 0,0001; r _s = 0,319	CNS	CNS	p = 0,001; r _s = 0,336	p = 0,002; r _s = -0,419	CNS	CNS	CNS	p = 0,05; r _s = 0,229	p < 0,0001; r _s = 0,502	-	p = 0,0009; r _s = 0,271	p = 0,0001; r _s = 0,311
KITr	p = 0,005; r _s = 0,233	p = 0,05; r _s = 0,165	p < 0,0001; r _s = 0,361	p = 0,001; r _s = 0,263	CNS	p = 0,0005; r _s = 0,360	p = 0,02; r _s = -0,325	CNS	p = 0,02; r _s = 0,302	p = 0,04; r _s = 0,250	p = 0,0004; r _s = 0,392	p = 0,0009; r _s = 0,271	p = 0,0009; r _s = 0,273	-	p = 0,004; r _s = 0,238
<i>c-kit</i> Staus (exon 11)	p < 0,0001; r _s = 0,498	p = 0,0002; r _s = 0,297	p = 0,0004; r _s = 0,288	CNS	p = 0,02; r _s = 0,222	CNS	p = 0,04; r _s = -0,285	p = 0,01; r _s = -0,313	CNS	CNS	CNS	p < 0,0001; r _s = 0,334	p = 0,0001; r _s = 0,311	p = 0,004; r _s = 0,238	-
As correlações significativas foram consideradas fortes quando ocorreram em mais de 49% da população estudada (r>0,07), moderada, quando ocorreram em 9 a 49% (0,3<r<0,7), e fraca, quando ocorreram em menos de 9% da população (r<0,3). CNS – correlação não significativa, p – nível de significância, r_s – correlação de Spearman.															

Em relação aos aspectos clínicos, as complicações relacionadas ao mastocitoma canino não foram associadas à raça, sexo ou idade do paciente, nem sequer com a localização e tamanho tumoral. Entretanto, observou-se correlação forte e altamente significativa com o estadiamento clínico ($p < 0,0001$, $r_s = 0,698$) e histórico de recorrência tumoral ($p < 0,0001$, $r_s = 0,563$)

Dentre os aspectos anátomo-patológicos, o prognóstico do mastocitoma canino se correlacionou à graduação, pelos sistemas de Patnaik ($p < 0,0001$, $r_s = 0,398$) e Kiupel ($p < 0,0001$, $r_s = 0,298$), padrão predominante de distribuição das células neoplásicas ($p < 0,0001$, $r_s = 0,457$), presença/intensidade de necrose intratumoral ($p = 0,04$, $r_s = 0,267$), número de células multinucleadas ($p = 0,001$, $r_s = 0,387$) e índice mitótico ($p < 0,0001$, $r_s = 0,510$). Entretanto, não houve correlação, neste estudo, com a avaliação histológica das margens, nem sequer com a extensão tumoral, presença/intensidade de edema, hemorragia, hialinização do colágeno, cistomatose das glândulas apócrinas, desmoplasia e infiltrado eosinofílico.

Na avaliação imuno-histoquímica, obteve-se correlação com o prognóstico, para o percentual de Ki-67 ($p < 0,0001$, $r_s = 0,424$) e padrão de expressão de KITr ($p = 0,02$, $r_s = 0,200$).

A presença de ITD no exon 11 do gene *c-kit*, identificada em 10,7% (16/149) dos pacientes desse estudo, pela técnica da PCR, também esteve associada a um maior risco de complicações relacionadas ao mastocitoma canino ($p < 0,0001$, $r_s = 0,400$). Apenas dois pacientes (1,3%) apresentaram deleções no segmento genético delimitado pelos oligonucleotídeos iniciadores utilizados.

A curva ROC permitiu o estabelecimento de valores de corte, para as variáveis paramétricas estudadas, com o estabelecimento de 9 para o número de células multinucleadas (OR = 2,087, sensibilidade de 84% e especificidade de 59%), 2 para o índice mitótico (OR = 1,944, sensibilidade de 84% e especificidade de 56%) e 5,6% para a proteína Ki-67 (OR = 1,777, sensibilidade de 92% e especificidade de 42%).

Dos 149 pacientes, 134 tiveram seu acompanhamento clínico superior a 120 dias (média de 455,5 dias), sendo, portanto, utilizados para estimativa da sobrevida global.

De acordo com o estadiamento clínico proposto pela OMS (Owen, 1980), os pacientes foram classificados nos estágios I, II, III e IV, em 65,7% (88/134), 9,7% (13/134), 23,1% (31/134) e 1,5% (2/134), respectivamente. A mediana não foi atingida no estágio I, mas correspondeu a 161, 148 e 30,5 dias, para os estágios II, III e IV, com diferença significativa ($p < 0,0001$), embora não tenha havido diferença entre os estágios II e III (figura 6). O estágio III foi, entretanto, dividido em III.1 ($n = 16$), na ausência de comprometimento do linfonodo regional, ou III.2 ($n = 15$), caso o mesmo estivesse envolvido pela neoplasia, obtendo-se a SG de 381 e 91 dias, respectivamente, com diferença significativa entre todos os estágios ($p < 0,01$), apesar de ter sido observado maior SG no estágio III.1 em comparação ao estágio II, conforme demonstrado na figura 6. Diante desses resultados, uma modificação desse estadiamento foi proposta para o mastocitoma canino, presente na tabela 9, com distribuição adequada dos estágios da doença, conforme o prognóstico.

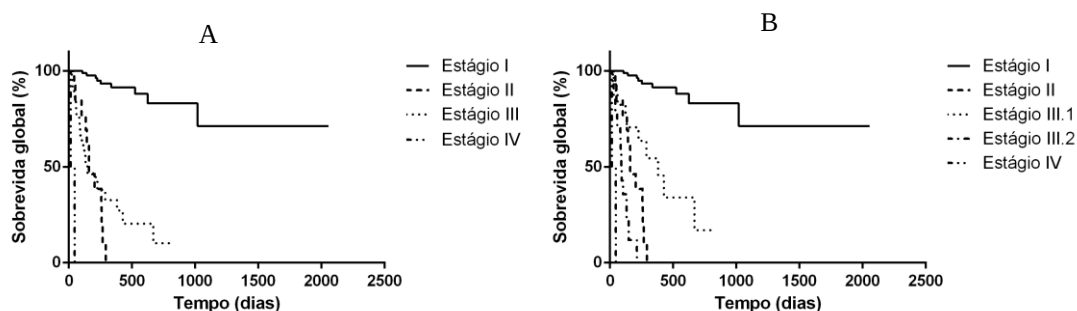


Figura 6 – Representação gráfica da sobrevida global de 134 cães com mastocitoma, conforme o estadiamento clínico, de I a IV, proposto pela Organização Mundial de Saúde (A), e com divisão do estágio III em III.1 e III.2, na ausência ou presença, respectivamente, de envolvimento dos linfonodos regionais (B). A mediana não foi atingida no estágio I (a), mas correspondeu a 161, 148 e 30,5 dias, para os estágios II (b), III (b) e IV (c), respectivamente ($p < 0,0001$), enquanto ao segregar o estágio III obteve-se a mediana de 381 e 91 dias para os estágios III.1 (d) e III.2 (e), respectivamente ($p < 0,01$).

Tabela 9 – Proposta de modificação do estadiamento clínico do mastocitoma cutâneo e subcutâneo em cães.

Estágio	Descrição
I	Tumor único, sem envolvimento de linfonodos regionais.
II	Tumores múltiplos, sem envolvimento de linfonodos regionais.
III	Tumor único, com envolvimento de linfonodos regionais
IV	Tumores grandes e infiltrativos, sem delimitação, ou tumores múltiplos, com envolvimento de linfonodos regionais.
V	Qualquer tumor com metástase distante, incluindo invasão medular e presença de mastócitos no sangue periférico.

a,b: presença ou não de sinais sistêmicos.

Histórico de recorrência tumoral foi apresentado por 21,6% (29/134) dos cães desse estudo com acompanhamento adequado. A taxa de óbito nesse grupo foi de 82,5% (24/29), com mediana de 131 dias, enquanto os pacientes com mastocitomas em apresentação clínica inicial (105/134) apresentaram 19,0% de mortalidade e não atingiram a mediana ($p < 0,0001$), conforme demonstrado na figura 7.

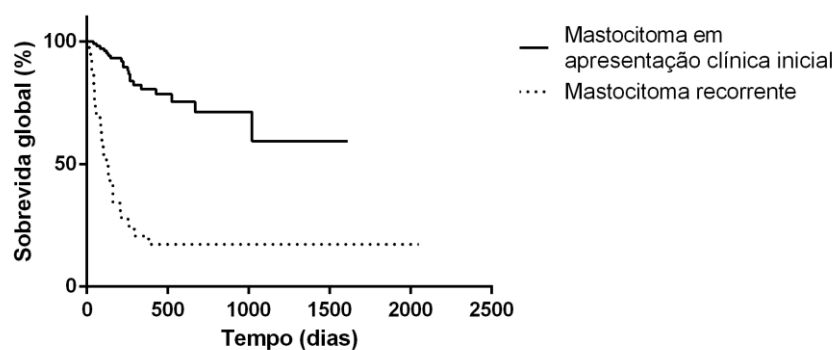


Figura 7 – Representação gráfica da sobrevida global de 134 cães com mastocitoma, conforme histórico de recorrência tumoral. A mediana não foi atingida para os pacientes com mastocitoma em apresentação clínica inicial (a), mas foi de 131 dias naqueles com histórico de recorrência tumoral (b) ($p < 0,0001$).

Considerando-se a graduação de Patnaik et al. (1984), obteve-se a classificação, para os graus I, II e III, em 3,7% (5/134), 80,6% (108/134) e 15,7% (21/134) dos casos, com devido acompanhamento clínico, e taxas de óbito de em 0% (0/5), 27,8% (30/108) e 81% (17/21),

respectivamente. A mediana de 203 dias foi atingida apenas para o grau 3, com diferença na SG em relação aos tumores de graduação baixa e intermediária, com $p < 0,0001$ (figura 8).

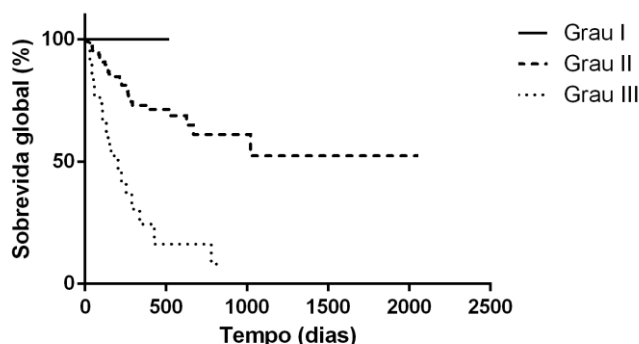


Figura 8 – Representação gráfica da sobrevida global de 134 cães com mastocitoma, conforme o sistema de graduação histológico proposto por Patnaik et al. (1984). A mediana não foi atingida nos tumores de grau 1 (a) e 2 (a), mas correspondeu a 203 dias naqueles de grau 3 (b) ($p < 0,0001$).

Ainda em relação aos 134 pacientes que tiveram acompanhamento adequado, obteve-se, seguindo o sistema proposto por Kiupel et al. (2011), mastocitomas de alto grau em 51,2% (69/134), e tumores de baixo grau em 48,5% (65/134) dos casos, com taxas de óbito de 49,3% (34/69) e 18,5% (12/65), respectivamente. A mediana, de 337 dias, foi atingida apenas para os pacientes com mastocitomas de alto grau ($p < 0,0001$), conforme demonstrado na figura 9.

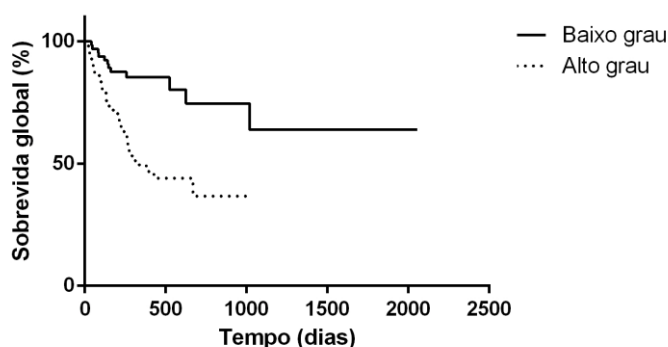


Figura 9 – Representação gráfica da sobrevida global de 134 cães com mastocitoma, conforme o sistema de graduação histológico proposto por Kiupel et al. (2011). A mediana não foi atingida nos tumores de baixo grau (a), mas correspondeu a 337 dias naqueles de grau 3 (b) ($p < 0,0001$).

Neste estudo, nenhum paciente que apresentou predomínio histológico da distribuição cordonal, veio à óbito em razão do mastocitoma canino e não foi possível, portanto, determinar a mediana para esse grupo, enquanto o padrão em manto atingiu a mediana em 288 dias, com $p < 0,0001$ (figura 10). A mediana também não foi atingida pelos grupos formados por pacientes que não apresentaram necrose tumoral ou nos quais essa foi considerada discreta. Entretanto, os pacientes com necrose moderada e intensa atingiram a mediana com 337 e 258 dias, respectivamente, sendo demonstrada diferença significativa apenas em relação ao grupo com intensa formação de necrose, com $p < 0,0001$ (figura 11).

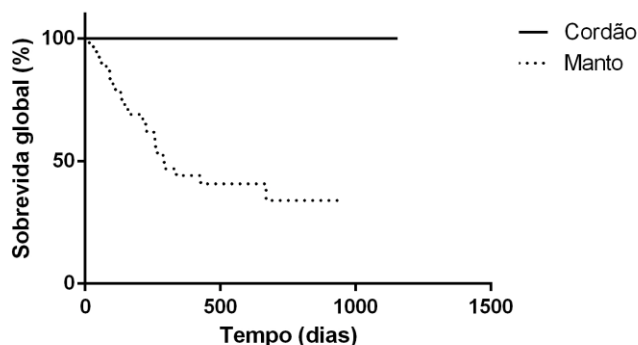


Figura 10 – Representação gráfica da sobrevida global de 134 cães com mastocitoma, conforme a distribuição histológica predominante (cordão ou manto). A mediana não foi atingida nos tumores organizados em cordão (a), mas correspondeu a 288 dias para aqueles com distribuição em manto (b) ($p < 0,0001$).

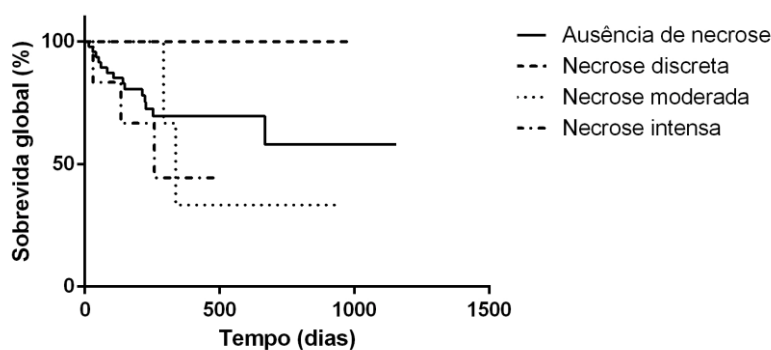


Figura 11 – Representação gráfica da sobrevida global de 134 cães com mastocitoma, conforme a presença/intensidade de necrose intratumoral. A mediana não foi atingida nos tumores com necrose ausente (a) a discreta (a), mas correspondeu a 337 (b) e 258 (b) dias, para necrose moderada e intensa, respectivamente ($p < 0,0001$).

Em relação à multinucleação, a mediana só foi atingida para o grupo com mais de nove células multinucleadas em 10 campos de maior aumento (267 dias), com $p = 0,0007$ (figura 12). Da mesma forma, para o índice mitótico (figura 13) e fração de crescimento, estimada pelo Ki-67 (figura 14), a mediana só foi atingida para o grupo que apresentou mais de duas figuras mitóticas em 10 campos (292 dias) ou percentual de Ki-67 superior a 5,6% (381 dias), com $p < 0,0001$.

Em relação ao KITr, a mediana não foi atingida no grupo com expressão membranar (KIT I), mas foi de 1020 e 224 dias para KIT II e III, respectivamente, mas com diferença, apenas em relação à marcação citoplasmática difusa (KIT III), com $p = 0,007$ (figura 15).

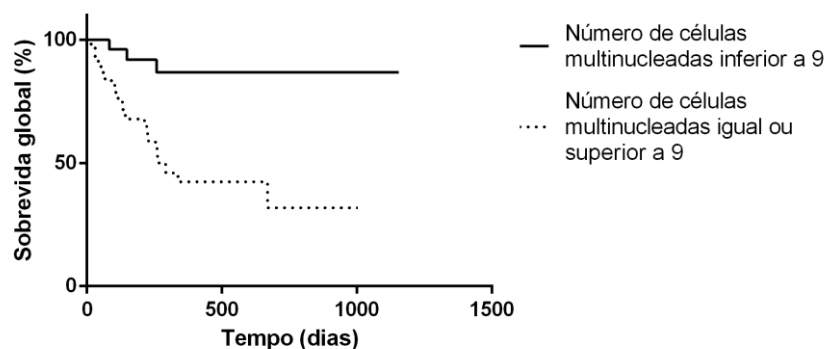


Figura 12 – Representação gráfica da sobrevida global de 134 cães com mastocitoma, conforme o número de células multinucleadas (valor de corte = 9 células multinucleadas em 10 campos de maior aumento). A mediana não foi atingida nos tumores com número de células multinucleadas inferior ao valor de corte (a), mas correspondeu a 267 (b) para aqueles que superaram esse valor ($p = 0,0007$).

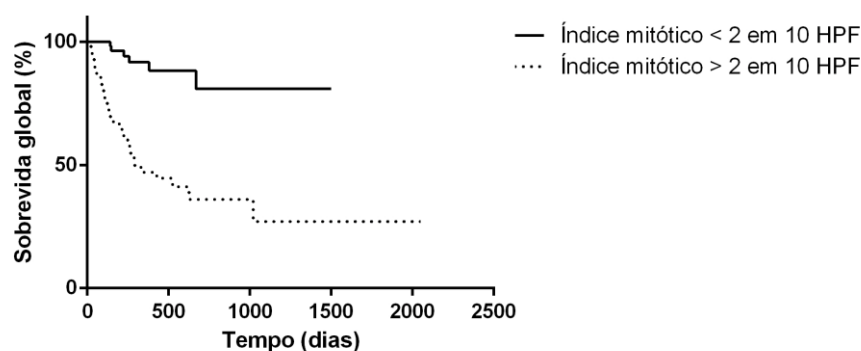


Figura 13 – Representação gráfica da sobrevida global de 134 cães com mastocitoma, conforme índice mitótico (valor de corte = 2 figuras mitóticas em 10 campos de maior aumento). A mediana não foi atingida nos tumores com índice mitótico inferior ao valor de corte (a), mas correspondeu a 292 dias (b) para aqueles que superaram esse valor ($p < 0,0001$).

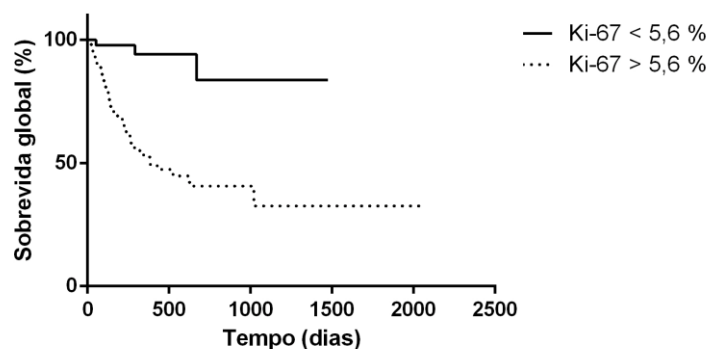


Figura 14 – Representação gráfica da sobrevida global de 134 cães com mastocitoma, conforme o percentual de Ki-67 (valor de corte = 5,6%). A mediana não foi atingida nos tumores com percentual de Ki-67 inferior ao valor de corte (a), mas correspondeu a 381 dias (b) para aqueles que superaram esse valor ($p < 0,0001$).

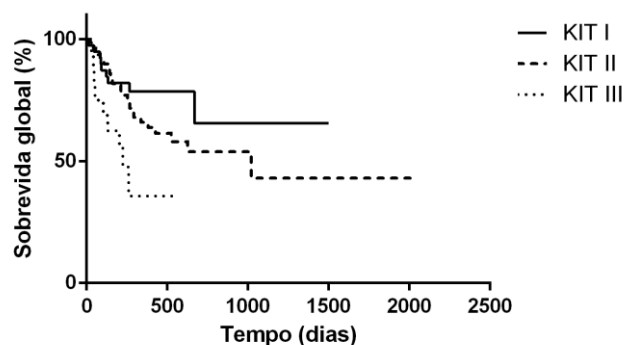


Figura 15 – Representação gráfica da sobrevida global de 134 cães com mastocitoma, conforme o padrão de expressão de KITr. A mediana não foi atingida nos tumores com que apresentaram o padrão KIT I (a), mas foi de 1020 e 224 dias para KIT II (a) e III (b) ($p = 0,007$).

Em uma análise de sobrevida, incluindo apenas pacientes com acompanhamento adequado, e excluindo aqueles com deleções ($n = 134$), obteve-se uma mediana de 1020 dias para os pacientes sem mutações ($n = 122$), e de 142 dias para aqueles que apresentaram ITD no exon 11 do *c-kit* ($n = 12$), com $p < 0,0001$ (Figura 16).

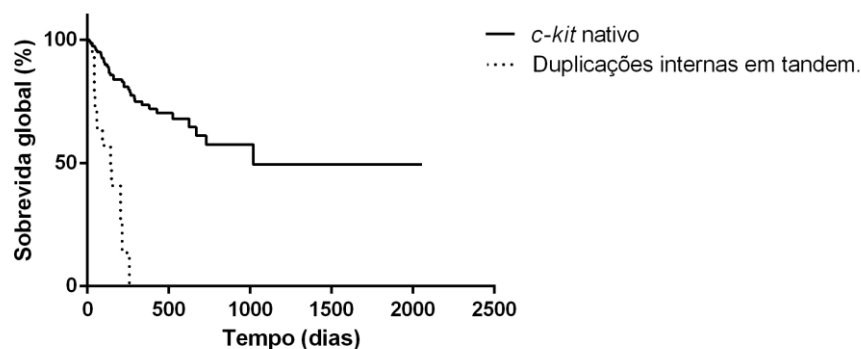


Figura 16 – Representação gráfica da sobrevida global de 134 cães com mastocitoma, conforme o status mutacional do exon 11 do gene *c-kit*, na ausência de mutações (nativo, $n = 122$), com mediana de 1020 dias, ou na presença de duplicações internas em tandem ($n = 12$), com mediana de 142 dias ($p < 0,0001$).

Adicionalmente, foi realizada uma comparação do índice mitótico, expressão imuno-histoquímica de Ki-67 e KITr em pacientes que, a critério do clínico, receberam tratamento neoadjuvante com GCs. Entretanto, não foi observada diferença significativa.

A partir da análise de correlações e SG, este estudo sugere uma avaliação do risco de recorrência ou disseminação do mastocitoma canino baseado em um número mínimo de aspectos clínicos – estadiamento clínico e histórico de recorrência tumoral; anatomo-patológicos – graduação pelos sistemas propostos por de Patnaik et al. (1984) e Kiupel et al. (2011), padrão predominante de distribuição celular, presença/intensidade de necrose intratumoral, contagem de células multinucleadas e figures mitóticas em 10 campos de maior aumento; imuno-histoquímicos – expressão de Ki-67 e KITr; e genéticos – existência de ITD no exon 11 do gene *c-kit*. Risco elevado deve ser assumido para aqueles pacientes com mastocitomas que incluam

uma ou mais das seguintes características: estágio II, III.2 ou IV, histórico de recorrência tumoral, classificação como grau 3 de Patnaik ou grau intermediário, associado a elevado grau de Kiupel, número de células multinucleadas superior a nove e figuras mitóticas superior a duas, ambas em 10 campos de maior aumento, Ki-67 acima de 5,6% e ITD no exon 11 do gene *c-kit*. O risco intermediário pode ser assumido para aqueles fatores, propostos na literatura, mas que apresentaram menor relevância nesse estudo, dentro das limitações do mesmo, incluindo raça (Shar-pei), localização (mucosa, bolsa scrotal, prepúcio, períneo e vulva), margens cirúrgicas incompletas ou exíguas e expressão aberrante de KITr.

Discussão

A busca por fatores prognósticos relacionados ao mastocitoma canino representa um dos principais objetivos das pesquisas em Oncologia Veterinária (London e Thamm, 2013). A classificação dos cães com mastocitoma em pacientes de risco baixo, intermediário ou moderado, em relação à recorrência e disseminação tumoral, pode favorecer a tomada de decisões, diante da ampla e crescente lista de fatores prognósticos propostos. Para tanto, foram considerados aspectos clínicos, anátomo-patológicos, imuno-histoquímicos e genéticos, e correlações significativas, de moderada intensidade, foram freqüentes entre as variáveis estudadas, com destaque para a correlação positiva entre o histórico de recorrência tumoral e o estadiamento clínico, estadiamento clínico e índice mitótico, ambas as graduações histológicas e o número de células multinucleadas, e, conforme esperado, e relatado por Sbattini et al. (2015), entre as duas graduações histológicas, e por Berlato et al. (2015), entre os dois métodos utilizados para avaliação da fração de crescimento (índice mitótico e percentual de Ki-67).

Dentre os fatores clínicos, apenas o estadiamento e o histórico de recorrência tumoral estiveram associados ao prognóstico dos pacientes com mastocitoma, nesse estudo. O estadiamento clínico, proposto pela OMS (Owen, 1980), permite a avaliação da extensão da doença no paciente e, é tradicionalmente recomendado, uma vez estabelecido o diagnóstico, em geral pela citologia, do mastocitoma (Blackwood et al., 2012; London e Thamm, 2013). O estadiamento clínico encontra-se diretamente relacionado ao prognóstico do mastocitoma canino (Dobson e Scase, 2007; Welle et al., 2008; London e Thamm, 2013), conforme evidenciado neste estudo. No entanto, a verdadeira influência dos estágios II e III no prognóstico é questionável, tendo em vista as dificuldades inerentes ao diagnóstico de metastases em linfonodos e as dúvidas acerca da importância de múltiplas lesões e quadros multicêntricos, principalmente, quando não há envolvimento concomitante dos linfonodos regionais (Dobson e Scase, 2007; Welle et al., 2008; London e Thamm, 2013). Foi proposta, portanto, uma divisão do estágio III em III.1, na ausência de envolvimento dos linfonodos regionais, e III.2, quando existe comprometimento simultâneo dos linfonodos regionais, observando-se um prognóstico melhor para os pacientes no estágio III.2, em relação àqueles no estágio II. Sugere-se, portanto, uma reformulação do estadiamento do mastocitoma canino, baseando-se em cinco estágios, melhorando a visualização e eficiência da classificação em estágios clínicos de progressão.

A relevância do estadiamento do mastocitoma canino é frequentemente questionada, mas sua importância foi demonstrada neste estudo. Entretanto, conforme descrito por Warland et al. (2014), a probabilidade de metástase pode ser extremamente baixa em alguns pacientes, e o estadiamento completo, raramente é necessário (Blackwood et al.; 2012), sendo proposto um procedimento para estadiamento em três níveis. Um estadiamento simples/básico (1), deve incluir o exame físico, com avaliação cuidadosa em busca de novas lesões na pele, mas também com investigação dos linfonodos regionais, seguindo o território linfático (linfossomo) proposto por Suami et al. (2013), com subsequente avaliação citológica e/ou análise histopatológica, com

a remoção do linfonodo durante a biópsia incisional ou excisão definitiva. A avaliação citológica dos linfonodos é limitada, pois até 24% dos cães hígdos podem apresentar mastócitos normais, em concentrações aumentadas, nos linfonodos (Bookbinder et al., 1992). A classificação histológica do nível de comprometimento do linfonodo regional em cães com mastocitoma pode facilitar a definição do estadiamento e da conduta clínica/terapêutica (Weishaar et al., 2014). Na existência de metástase em linfonodos (pacientes de alto risco) ou em mastocitomas localizados em sítios anatômicos com potencial drenagem para linfonodos internos, recomenda-se o estadiamento completo (2), incluindo avaliação com exames de imagem, com destaque para a ultrasonografia abdominal (i.e neoplasias no períneo) e radiografia torácica (i.e neoplasias do pescoço e tronco) (Blackwood et al., 2012; Warland et al., 2015), mas até mesmo tomografia computadorizada, na presença de imagens suspeitas, de difícil definição. Nesses casos, um estadiamento estendido (3) pode incluir a avaliação citológica, com punção guiada pela ultrasonografia ou tomografia, na existência de alterações suspeitas no tórax ou abdomen. Adicionalmente, pode ser realizada punção de medula óssea e mielograma, embora a invasão medular, pelo mastocitoma em cães, seja rara e usualmente associada a um quadro clínico terminal grave (Dobson e Scase, 2007; Welle et al., 2008; Warland et al., 2014 London e Thamm, 2013).

Historicamente, a recorrência dos mastocitomas caninos é associada a um prognóstico obscuro, com taxas de óbito relacionadas podendo atingir 86-100% dos casos, nos estudos conduzidos por Bostock (1973) e Patnaik et al. (1984) e, apesar de estudos recentes terem demonstrado efetivo controle da doença em pacientes com mastocitoma recorrente submetidos a nova cirurgia e tratamentos adjuvantes (Thamm et al., 1999), a taxa de óbito para os mastocitomas recorrentes, nesse estudo (85,2%), aproximou-se dos valores observados por Bostock. (1973) e Patnaik et al. (1984), mesmo sendo recomendado e instituído tratamentos adjuvantes, na maioria desses pacientes, incluindo RT, QT e TKI. Portanto, todo o esforço deve ser feito, para evitar a recidiva da doença, com o intuito de melhorar o prognóstico dos pacientes acometidos pelo mastocitoma (Patnaik et al., 1984).

Apesar das referências na literatura, esse estudo não observou diferenças no prognóstico relacionadas à raça e localização tumoral. Provavelmente por diferenças epidemiológicas, na distribuição das raças, não foi observada maior ocorrência de mastocitoma em cães que apresentam o Bulldog como ancestral comum (London e Thamm, 2013), e embora McNiel et al. (2006), tenha sido sugerido melhor prognóstico para esses pacientes, a experiência do autor não remete um melhor comportamento da doença nos Bulldogs franceses e Pugs. A grande variação de raças nesse estudo, entretanto, comprometeu a análise da SG por raça e novos estudos são necessários para a definição do prognóstico do mastocitoma canino nas diferentes raças. De qualquer forma, deve-se considerar um risco, no mínimo intermediário, para recorrência e disseminação em cães da raça Shar-pei, conforme descrito por London e Thamm (2013). Mesmo não tendo sido demonstrada, nesse estudo, a localização tumoral pode influenciar no prognóstico do mastocitoma canino. De fato, fatores prognósticos desfavoráveis podem ocorrer com mais frequência em mastocitomas em determinadas localizações (i.e mucosa e junção muco-cutânea, prepúcio, escroto, vulva e períneo), no entanto, conforme demonstrado por Cahalane et al. (2004) e Sfiligoi et al. (2005), resultados semelhantes aos mastocitomas em outras localizações podem ser obtidos se os fatores prognósticos forem devidamente avaliados para instituição do tratamento mais apropriado. Isso justifica os resultados obtidos nesse estudo, que admitiu a implementação de terapias adjuvantes, conforme a necessidade do paciente, avaliada por fatores prognósticos já estabelecidos pela literatura consultada. Conforme descrito por Hillman et al. (2010), mastocitomas localizados no focinho,

apresentam elevada probabilidade de metástase, entretanto, podem apresentar prognóstico favorável mediante o tratamento. O único mastocitoma, em focinho, incluído neste estudo, apresentou-se no estágio II, com lesão de alto grau e presença de ITD no exon 11 do gene c-kit, avaliada por biópsia incisional. O uso de TKI nesse paciente resultou em remissão completa e prolongado controle da doença.

Neste estudo, complicações relacionadas ao mastocitoma ocorreram em 40,7% dos pacientes com margens cirúrgicas comprometidas e em 16% daqueles com margens livres, independente do tratamento, entretanto não foi identificada nenhuma correlação. Conforme observado neste estudo, mas também por Michels et al. (2002) e Miller et al. (2014), a evidência de margens histológicas livres não oferece qualquer vantagem em termos de ILD e SG para cães com mastocitoma e não é, portanto, uma informação importante para se classificar o risco de recorrência tumoral para o mastocitoma canino. Entretanto, estudos controlados, com avaliação precisa das margens são necessários para verificação do verdadeiro impacto no prognóstico do mastocitoma, e a informação de margens comprometidas, deve permanecer como um critério de risco intermediário, principalmente associada a outras características de pior prognóstico.

A graduação dos mastocitomas, estabelecida por Patnaik et al. (1984), tem sido criticada, por conferir elevada importância a extensão da neoplasia e por reunir critérios subjetivos que resultam na inclusão de mais de 40% dos mastocitomas em uma classificação de graduação intermediária (grau 2), reunindo um grupo vasto e heterogêneo de lesões com comportamento biológico diferenciados (Gross et al., 2005). De fato, a subjetividade do sistema permitiu que 80,6% dos mastocitomas, nesse estudo, fossem classificados com o grau intermediário, e a extensão tumoral, seja restrita ao tecido subcutâneo, ulcerando a epiderme, ou invadindo camadas profundas, inclusive o tecido muscular, não se correlacionou com o prognóstico dos pacientes, nesse estudo. O sistema proposto por Kiupel et al. (2011) reduz a subjetividade da graduação de Patnaik et al. (1984), mas não afasta a importância dessa, que envolve uma avaliação mais ampla dos aspectos anatomo-patológicos inerentes ao mastocitoma canino, como a existência de hemorragia e necrose, infiltrado eosinofílico, pleomorfismo celular, aniscitose e aniscocariose. O estudo conduzido por Sbattini et al. (2015), com 162 cães, demonstrou superioridade da graduação de Kiupel, sendo que o grupo com mastocitomas de grau 2-baixo grau não atingiu a mediana e o grupo graduado como grau 2-alto grau, atingiu SG de 698 dias, com $p = 0,001$, entretanto houve diferença significativa também entre os mastocitomas de grau 2-alto grau e mastocitomas de grau 3 ($p = 0,027$). No entanto, nesse estudo, observou-se maior incidência de tumores de alto grau, apesar de que muitos desses pacientes permaneceram com bom prognóstico, sendo que as duas graduações devem continuar sendo utilizadas. Mastocitomas de grau 3 de Patnaik incluem, por si só, o paciente, em um elevado risco de recorrência e/ou disseminação tumoral, enquanto o grau 2 de Patnaik está associado a um risco intermediário (quando associado a um elevado grau de Kiupel) ou baixo (quando associado a um baixo grau de Kiupel), entretanto, outros fatores devem ser avaliados, tendo em vista que, ainda, 18,5% dos pacientes com mastocitomas de baixo grau de Kiupel, podem ter seu óbito associado à essa neoplasia.

Embora apenas o índice mitótico seja utilizado isoladamente, dentre os critérios prognósticos, para a definição do prognóstico, observou-se nesse estudo importância do número de células multinucleadas, organização tumoral e presença/intensidade de necrose intratumoral. Essas informações são incluídas, com importância variável, nas graduações de Patnaik et al. (1984) e Kiupel et al. (2011), mas podem constituir importantes valores prognósticos, conforme demonstrado nesse estudo. Entretanto, o valor de corte definido, em relação às células

multinucleadas, para a classificação de um mastocitoma como alto grau de Kiupel é extremamente baixo (2 em 10 HPF), sendo associado, neste estudo, à baixa especificidade (15%; OR = 1,156), permitindo a inclusão de um grande número de mastocitomas bem diferenciados na classificação de tumores de alto grau. Foi proposto, portanto, o valor de corte de nove células multinucleadas em 10 campos de maior aumento, associado a uma sensibilidade de 84% e especificidade de 59% (OR = 2,087).

O índice mitótico, avaliado em dez campos de maior aumento (40x) é, talvez, o melhor fator prognóstico em mastocitomas de grau intermediário a baixo. No estudo conduzido por Romansik et al. (2007), observou-se maior SG em pacientes apresentando índice mitótico inferior a cinco figuras de mitose em dez campos (40x), entretanto Elston et al. (2009) e van Lelyveld et al. (2015) relataram que um ponto de corte de cinco figuras mitóticas encontra-se associado à elevada especificidade, porém baixa sensibilidade, com muitos pacientes sucumbindo ao mastocitoma apesar de índice mitótico inferior a cinco. Elston et al. (2009) propuseram um sistema contendo dois pontos de corte, sendo 0-1 mitoses, associados a baixo risco, 1-7 associado a risco intermediário e maior que 7 associado a risco elevado. De fato, nesse estudo, observou-se baixa sensibilidade (aproximadamente 50%; OR = 6,045) para o valor de corte estabelecido por Romansik et al. (2007), sendo proposto o valor de corte de apenas duas figuras mitóticas em dez campos de maior aumento, associado a uma sensibilidade de 84% e especificidade de 56% (OR = 1,944). Conforme demonstrado por Berlato et al. (2015), o índice mitótico apresenta correlação moderada com a expressão imuno-histoquímica para Ki-67 no mastocitoma canino e ambos, apresentam poder semelhante para a prognosticação dessa neoplasia. A proteína Ki-67 (reconhecida pelo anticorpo monoclonal MIB-1) é expressa em todas as fases do ciclo celular, exceto G0, e representa um fator prognóstico independente para o mastocitoma canino (Scase et al., 2006), sendo observado, neste estudo um valor de corte de 5,6% para o risco de recorrência ou disseminação tumoral (sensibilidade de 92% e especificidade de 42%; OR = 1,777). Esse valor aproxima-se daquele estabelecido por Strefezzi et al. (2010), que relataram taxas de mortalidade de 14,3% e 55,6% em pacientes com Ki-67 inferior ou superior a 7%, no entanto, é superior ao valor de corte de 1,8% proposto para mastocitomas de grau intermediário, por Maglennon et al. (2008). Apesar do menor tempo de acompanhamento, nesse estudo, é experiência do autor que pacientes apresentando mastocitomas com valores de Ki-67 acima de 1,8%, frequentemente apresentam prolongado controle da doença, mesmo na ausência de terapias adjuvantes, apresentando, neste estudo uma sensibilidade de 98% para a definição de pacientes com prognóstico desfavorável, mas com especificidade, em torno de apenas 10% (OR = 1,088).

Ainda em relação à imuno-histoquímica, a expressão de KITr encontra-se relacionada ao prognóstico dos mastocitomas caninos, diante de prejuízos no ILD e SG de pacientes com expressão aberrante/aumento da expressão citoplasmática dessa proteína (Kiupel et al., 2004; Webster et al., 2006a, Webster et al., 2006b). Entretanto, dentre os fatores relevantes, pode ser considerado o de menor importância, neste estudo, que elucidou diferenças, apenas entre os pacientes com expressão membranar (KIT I), e aqueles com expressão citoplasmática difusa (KIT III). Giantin et al. (2012) e Costa Casagrande et al. (2015) também demonstraram fraca associação entre o padrão de expressão de KITr e o prognóstico desses pacientes. É importante lembrar que os anticorpos primários comumente utilizados para a realização da imuno-histoquímica não foram produzidos para a espécie canina e que falhas na preservação do antígeno podem comprometer essa avaliação. Os fatores anatomo-patológicos sempre devem ser considerados a frente dos parâmetros imuno-histoquímicos, inclusive do Ki-67, pois estão

menos sujeitos a falhas técnicas, embora estejam mais sujeitos a falhas humanas, o que torna importante uma parceria entre o clínico e um patologista competente.

Por sua vez, as mutações que oferecem ganho de função ao oncogene *c-kit*, a exemplo das ITDs no exon 11, apresentam importante impacto no prognóstico dos cães com mastocitoma e, podem, inclusive, direcionar o tratamento no sentido da utilização de TKIs. Essas são, de fato, as mutações mais frequente, nesse oncogene, no mastocitoma canino, e permitem uma ativação constitutiva de KITr (Webster et al., 2006b; Webster et al., 2008). Entretanto, de uma forma geral, a incidência desse tipo de mutações é baixa nos mastocitomas caninos (aproximadamente 10%), podendo se tornar maiores em pacientes em estadiamento avançado, mastocitomas de grau 3, com elevado índice mitótico, elevada expressão de Ki-67 ou expressão aberrante de KITr (Zemke et al., 2002; Webster et al., 2006b; Webster et al., 2008; Avery, 2012; Takeuchi et al., 2013). No estudo conduzido por Webster et al. (2006b), 6/9 mutações no exon 11 do *c-kit* ocorreram em mastocitomas apresentando expressão aberrante de KITr, no entanto, tratam-se de eventos distintos e 80% dos pacientes com alterações na expressão de KITr não apresentaram mutações nesse locus gênico. No estudo conduzido por Takeuchi et al. (2013), a presença de ITD também resultou em controle insatisfatório da doença, com ILD de 130 dias (n = 8) enquanto aqueles sem mutações atingiram 345 dias (n = 39).

A pesquisa de mutações pode ocasionalmente ser dispensada, na ausência de recursos, em mastocitomas de baixo risco de recorrência ou disseminação tumoral (nos quais a incidência de mutações, nesse estudo, pela técnica da PCR, foi de 0,7% (1/149), tendo em vista a reduzida probabilidade de mutações. Apesar de não terem sido incluídas neste estudo, sugere-se, para lesões de risco intermediário a elevado, a inclusão da avaliação de mutações nos exons 8 e 9, que também podem estar relacionadas ao ganho de função pelo aumento da afinidade do domínio extracelular ao fator de células tronco, entretanto, apesar da incidência entre 4,7% e 6,4% (exon 8) e 14,9% (exon 9), seu impacto no prognóstico e tratamento ainda não está bem estabelecido (Letard et al., 2008, Takeuchi et al., 2013).

Ainda, foi analisada a existência de diferenças, em relação ao índice mitótico, expressão de Ki-67 e KITr, em pacientes submetidos ou não ao tratamento com GCs. Embora as comparações tenham sido feitas com pacientes diferentes e apesar de não ser o objetivo primário desse estudo, não foi observada diferença nesses parâmetros, provavelmente devido à metodologia da avaliação, que considera os campos de maior marcação (*hot spots*) e, portanto exclui aquelas células neoplásicas mais bem diferenciadas e, provavelmente mais sensíveis aos esteróides (Rogers, 1996; Takahashi et al., 1997). Apesar da grande variação dos tratamentos, o desenvolvimento de comparações não constituiu um objetivo desse estudo. Diante da experiência clínica e das informações disponíveis acerca do prognóstico do mastocitoma canino (London e Thamm, 2013), optou-se por oferecer, de forma ética, o melhor tratamento disponível para cada paciente. Entretanto, esse estudo atingiu o objetivo proposto permitindo a classificação dos cães com mastocitoma em um alto risco de recorrência ou disseminação tumoral, na presença de um ou mais fatores prognósticos negativos evidenciados neste estudo, mas também um risco intermediário para aqueles aspectos propostos pela literatura, mas que, por limitações dessa pesquisa, não puderam ser evidenciados, mas que exigem futuras investigações. Conforme preconizado por Blackwood et al. (2012), London e Thamm (2013), Miller et al. (2014), um risco elevado de recorrência ou metástase deve ser assumido para mastocitomas de grau 3 de Patnaik, mas também para aqueles de grau intermediário, na existência de metástase em linfonodos ou à distância e/ou elevada fração de crescimento. London e Thamm (2013) assumem, ainda, elevado risco para os mastocitomas primários de

mucosas ou junções muco-cutâneas. O uso de terapias adjuvantes deve ser considerado em pacientes com mastocitoma apresentando risco elevado a intermediário de recorrência ou disseminação tumoral, a critério do oncologista, de acordo com as necessidades e condições clínicas de cada paciente.

Conclusões

A avaliação de fatores prognósticos clínicos, anátomo-patológicos, imuno-histoquímicos e genéticos, em cães com mastocitoma, permite classificar os pacientes conforme o risco de recorrência ou disseminação tumoral. Uma modificação do estadiamento clínico pode ser utilizada, considerando-se que pacientes com lesões múltiplas, sem envolvimento de linfonodos regionais (III.1), em geral, apresentam melhor prognóstico do que aqueles no estágio II. O risco elevado pode ser assumido para pacientes que apresentem estadiamento avançado com envolvimento de linfonodos regionais (II, III.2 e IV), histórico de recorrência tumoral, classificação da neoplasia como grau 3 de Patnaik, ou grau intermediário de Patnaik-alto grau de Kiupel, na presença de células multinucleadas acima de nove em dez campos de maior aumento, índice mitótico superior a dois (em dez campos de maior aumento), Ki-67 superior a 5,6% e ITD no exon 11 do gene *c-kit*. O risco intermediário deve ser considerado para determinadas raças (ex.: Shar-pei), localização tumoral (mucosa, bolsa escrotal, prepúcio, períneo e vulva), margens cirúrgicas comprometidas e expressão citoplasmática de KITr, até que novos estudos, controlados, demonstrem o contrário. Todo esforço deve ser feito para evitar a recorrência tumoral e terapias adjuvantes devem, portanto, ser consideradas em pacientes de risco elevado a intermediário, de acordo com a necessidade e condição clínica de cada paciente.

ESTUDO III – QUIMIOTERAPIA ADJUVANTE PARA O MASTOCITOMA CANINO DE RISCO INTERMEDIÁRIO A ELEVADO

Introdução

Ampla evidência é conferida ao mastocitoma canino, dada sua elevada prevalência, na Oncologia Veterinária. Apesar da maioria dos tumores de graduação baixa a intermediária serem tratados, adequadamente apenas com cirurgia, não é raro ter pacientes que sucumbem a essa neoplasia, que pode se manifestar de forma extremamente agressiva e fatal (Dobson e Scase, 2007).

Um elevado risco de recorrência ou metástase pode ser atribuído para os mastocitomas classificados como grau 3 de Patnaik, mas também para aqueles de grau intermediário, na presença de metástase em linfonodos ou distante, e/ou elevada fração de crescimento estimada pelo índice mitótico (superior a cinco em 10 campos de maior aumento) e percentual de Ki-67 (Blackwood et al., 2012; London and Thamm, 2013; Miller et al., 2014), e para aqueles localizados em mucosas ou junções muco-cutâneas (London and Thamm, 2013). Entretanto, outros fatores prognósticos também podem ser determinantes na progressão da doença, como localização tumoral na bolsa escrotal, prepúcio, períneo e vulva (Hillman et al., 2010; London e Thamm, 2013), raça (McNiel et al., 2004; London e Thamm, 2013), padrão de expressão de KITR (Kiupel et al., 2004; Webster et al., 2006a) e mutações genéticas específicas (Zemke et al., 2002; Webster et al., 2006b; Webster et al., 2008; Avery, 2012).

Historicamente, foi atribuída uma aplicação limitada para a QT adjuvante no mastocitoma canino, tendo em vista que, na ausência de doença metastática ou neoplasias de alto risco, até 90% desses tumores podem ser curados pela associação de cirurgia e RT (Frimberger et al., 1977; Al-Sarraf et al., 1996). Entretanto, considerando-se a copiosa variação do comportamento biológico dessa neoplasia, a terapia médica tem sido indicada, na adjuvância, para mastocitomas metastáticos ou de alto risco (Thamm et al., 2006; Camps-Palau et al., 2007; Cooper et al., 2009), na neoadjuvância, com o objetivo de promover citorredução, na tentativa de possibilitar a exérese cirúrgica (Gerritsen et al., 1998; Rassnick et al., 1999; Thamm et al., 1999; Cooper et al., 2009; Rassnick et al., 2010; Warland et al., 2015), e como terapia única, para tumores não ressecáveis (Taylor et al., 2009). Estudos recentes têm demonstrado o benefício de inúmeros protocolos quimioterápicos – incluindo vimblastina, lomustina, ciclofosfamida e clorambucila – em tratamentos adjuvantes, direcionados para tumores de alto risco ou pacientes em estadiamento avançado (Thamm et al., 2006; Camps-Palau et al., 2007; Cooper et al., 2009). Embora rigorosamente utilizada em pacientes com doença sistêmica ou elevado risco, não é incomum o emprego da QT adjuvante, como parte do controle local do mastocitoma canino, tendo em vista a dificuldade de obtenção de margens cirúrgicas em determinadas localizações, a restrição da RT a grandes centros e a ausência de serviços de RT veterinária, bem estabelecidos, em cidades e países em desenvolvimento ou subdesenvolvidos (Thamm et al., 1999; Davies et al., 2004).

Entretanto, apesar dos inúmeros protocolos disponíveis, o uso da QT permanece empírico, pela ausência de estudos controlados (Dobson e Scase, 2007; London e Thamm, 2013), e faltam critérios para a escolha do protocolo e definição dos pacientes que podem se beneficiar do tratamento.

O objetivo desse estudo foi avaliar a resposta de cães, com mastocitoma de risco intermediário à elevado, à QT em DMT com lomustina ou vimblastina (pacientes de alto risco) e QM, de curta

duração (oito semanas), com clorambucila (pacientes de risco intermediário), comparando o ILD e SG com grupos controles formados por pacientes com risco semelhante, porém cujo tratamento quimioterápico foi declinado por seus responsáveis, e por pacientes de baixo risco.

Resultados

Esse estudo foi conduzido com 98 cães, com idade variando de 36 a 200 meses ($123,3 \pm 34,0$) tratados e acompanhados após o tratamento cirúrgico para exérese de mastocitoma cutâneo ou subcutâneo. O tratamento, acompanhamento clínico e fatores prognósticos clínicos, anátomo-patológicos, imuno-histoquímicos e genéticos encontram-se dispostos na tabela 10 e o perfil prognóstico de cada grupo, na tabela 11. A QT em DMT com lomustina, ou vimblastina, a critério do clínico, foi recomendada, para todos os pacientes de alto risco ($n = 47$), entretanto, apenas 32 foram submetidos ao tratamento (grupo 1a), com lomustina ($n = 23$) ou vimblastina ($n = 9$), tendo em vista que, em 16 pacientes, o tratamento foi declinado pelo responsável pelo animal, constituindo, portanto, o grupo controle (grupo 1b). A QT metronômica, com clorambucila, foi utilizada de forma seqüencial na maioria dos pacientes do grupo 1a ($n = 17$), mas em dois pacientes o tratamento sequencial foi realizado com lomustina, na dose metronômica de $2,8 \text{ mg/m}^2$ diariamente, ou com o protocolo de vimblastina. Entretanto, a QT metronômica, com clorambucila, foi eleita como tratamento de escolha para pacientes de risco intermediário ($n = 35$), sendo que 31 apresentaram margens comprometidas, mas a adesão só ocorreu em 24 pacientes (grupo 2a), enquanto os 11 restantes formaram o grupo controle (grupo 2b). O tratamento adjuvante foi suprimido de pacientes de baixo risco (grupo 3, $n = 15$) e os mesmos foram acompanhados a cada 6-8 semanas. GCs foram incluídos no protocolo quimioterápico de todos os pacientes.

Tabela 10 – Fatores prognósticos clínicos, anátomo-patológicos, imuno-histoquímicos e genéticos de 98 cães com mastocitoma, classificados nos grupos de risco elevado, intermediário e baixo.														
Grupo	ID	Raça	Idade	Estadiamento	Localização	Margem histológica	Gradação	MI	Ki-67	KITr	c-kit status (exon 11)	Tratamento	Intervalo livre de doença	Sobrevida global
1a (alto risco – quimioterapia em dose máxima tolerada)	01*	Boxer	139	III.2	Membro	Comprometida	Grau 2 / Alto grau	9	25,9%	I	Nativo	Cirurgia, lomustina	40	40
	02*	SRD	168	II	Tronco	Comprometida	Grau 2 / Alto grau	49	-	II	ITD	Cirurgia, lomustina, clorambucila	350	350
	03*	SRD	97	II	Bolsa escrotal	Comprometida	Grau 2 / Alto grau	6	19,1%	II	ITD	Cirurgia, lomustina	109 †	142 †
	04	SRD	168	III.1	Multicêntrico	Comprometida	Grau 2 / Alto grau	1	6,3%	II	Nativo	Cirurgia, lomustina, clorambucila	35 †	226 †
	05	Schnauzer	144	III.2	Tronco	Comprometida	Grau 2 / Baixo grau	1	35,0%	II	ITD	Cirurgia, lomustina	122 †	148 †
	06	Pit-bull	132	II	Membro	Livre	Grau 3 / Alto grau	4	44,0%	II	Nativo	Cirurgia, lomustina	60	60
	07*	Pinscher	120	II	Membro	Comprometida	Grau 2 / Baixo grau	0	40,0%	II	ITD	Cirurgia, lomustina, clorambucila	120 †	258 †
	08	Poodle	144	II	Bolsa escrotal	Comprometida	Grau 2 / Alto grau	18	3,0%	II	Deleção	Cirurgia, lomustina	30	30
	09	Dachshund	156	I	Bolsa escrotal	Exígua	Grau 2 / Alto grau	2	1,9%	II	Nativo	Cirurgia, lomustina	175	175
	10*	Poodle	72	II	Membro	Livre	Grau 2 / Alto grau	39	9,5%	III	Nativo	Cirurgia, lomustina	171 †	260 †
	11*	Shiba	132	II	Membro	Livre	Grau 3 / Alto grau	14	2,9%	III	Nativo	Cirurgia, lomustina	52 †	52 †
	12	SRD	149	I	Tronco	Livre	Grau 2 / Alto grau	2	10,0%	II	Nativo	Cirurgia, lomustina, clorambucila	485	485
	13	Labrador	132	III.1	Bolsa escrotal	Comprometida	Grau 2 / Alto grau	2	17,2%	II	Nativo	Cirurgia, lomustina (dose máxima tolerada seguida de dose metronômica)	261 †	409

	14	Pit-bull	108	III.1	Multicêntrico	Comprometida	Grau 2 / Alto grau	17	6,0%	II	Nativo	Cirurgia lomustina (dose maxima tolerada seguida de dose metronômica)	120 †	284
	15	Pinscher	132	I	Bolsa escrotal	Exígua	Grau 3 / Alto grau	4	13,0%	II	Nativo	Cirurgia, lomustina, clorambucila	686 †	778
	16	Lhasa-apso	60	I	Tronco	Comprometida	Grau 2 / Alto grau	4	8,5%	II	Nativo	Cirurgia, lomustina, clorambucila	240	240
	17	SRD	96	I	Membro	Comprometida	Grau 2 / Alto grau	14	2,6%	II	Nativo	Cirurgia, lomustina, clorambucila	393	393
	18	Schnauzer	158	I	Membro	Comprometida	Grau 2 / Alto grau	3	42,0%	I	Nativo	Cirurgia, lomustina	105 †	195 †
	19*	Labrador	120	II	Tronco	Comprometida	Grau 2 / Alto grau	5	47,0%	II	ITD	Cirurgia, lomustina, vimblastina	60	60
	20	Labrador	120	I	Membro	Comprometida	Grau 2 / Alto grau	3	10,0%	I	Nativo	Cirurgia, lomustina, clorambucila	589	589
	21	SRD	101	III.1	Vulva	Comprometida	Grau 2 / Alto grau	3	1,0%	II	Nativo	Cirurgia, lomustina, clorambucila	500	500
	22	Fox Paulistinha	149	II	Membro	Comprometida	Grau 3 / Alto grau	50	10,5%	III	Nativo	Cirurgia, lomustina	76	76
	23	Pit-bull	129	I	Membro	Exígua	Grau 2 / Alto grau	3	16,0%	II	Nativo	Cirurgia, lomustina	212	212
	24	Labrador	146	I	Períneo	Comprometida	Grau 2 / Alto grau	0	30,0%	III	Nativo	Cirurgia, vimblastina, clorambucila	543	543
	25	Labrador	140	III.2	Bolsa escrotal	Livre	Grau 2 / Alto grau	3	10,0%	II	Nativo	Cirurgia, vimblastina	122	122
	26	Pug	143	I	Membro	Comprometida	Grau 2 / Baixo grau	3	45,0%	II	Nativo	Cirurgia, vimblastina, clorambucila	419	419
	27	Lhasa-apso	132	I	Tronco	Comprometida	Grau 2 / Baixo grau	3	22,0%	II	Nativo	Cirurgia, vimblastina, clorambucila	488	488

	28	Labrador	108	I	Tronco	Exígua	Grau 2 / Baixo grau	1	18,0%	III	Nativo	Cirurgia, vimblastina	235	235
	29	SRD	134	I	Tronco	Comprometida	Grau 2 / Baixo grau	3	11,0%	II	Nativo	Cirurgia, vimblastina, clorambucila	179	179
	30	Shih-tzu	36	I	Tronco	Comprometida	Grau 2 / Baixo grau	2	22,0%	II	Nativo	Cirurgia, vimblastina, clorambucila	260	260
	31	SRD	144	I	Tronco	Livre	Grau 2 / Baixo grau	3	12,0%	I	Nativo	Cirurgia, vimblastina, clorambucila	496	496
	32	Golden Retriever	84	I	Tronco	Livre	Grau 2 / Baixo grau	2	17,0%	I	Nativo	Cirurgia, vimblastina, clorambucila	490	490
Grupo 1b (alto risco – controle)	01	Poodle	156	I	Bolsa escrotal	Livre	Grau 2 / Alto grau	15	12,0%	II	Nativo	Cirurgia	75 †	213 †
	02	Labrador	164	III.1	Multicêntrico	Comprometida	Grau 2 / Alto grau	2	9,5%	II	Nativo	Cirurgia	60 †	60 †
	03	SRD	162	I	Tronco	Livre	Grau 3 / Alto grau	41	21,6%	II	Nativo	Cirurgia	190 †	337 †
	04	Cocker Spaniel	133	I	Membro	Livre	Grau 3 / Alto grau	3	40,0%	III	Nativo	Cirurgia	52 †	224 †
	05	Pastor Alemão	132	II	Mucosa oral	Livre	Grau 2 / Alto grau	8	11,0%	II	Deleção	Cirurgia	134 †	134 †
	06*	Pug	100	III.2	Períneo	Livre	Grau 2 / Alto grau	6	44,0%	I	Nativo	Cirurgia	15 †	90 †
	07*	Fila Brasileiro	96	IV	Bolsa escrotal	Comprometida	Grau 2 / Alto grau	7	20,0%	III	Duplicação	Cirurgia	15 †	46 †
	08	Fila Brasileiro	82	III.1	Vulva	Livre	Grau 2 / Baixo grau	2	5,5%	I	Nativo	Cirurgia	147	147
	09	Weimaraner	72	III.1	Multicêntrico	Comprometida	Grau 2 / Alto grau	0	1,0%	I	Nativo	Cirurgia	106 †	669 †
	10	Weimaraner	78	III.1	Multicêntrico	Comprometida	Grau 2 / Alto grau	1	10,5%	II	Nativo	Cirurgia	274 †	381 †
	11	Cocker	120	III.2	Prepúcio	Comprometida	Grau 2 / Baixo grau	3	42,0%	I	Nativo	Cirurgia	83 †	83 †
	12	SRD	120	III.1	Membro	Comprometida	Grau 2 / Alto grau	0	3,0%	II	Nativo	Cirurgia	152	152
	13	SRD	99	I	Bolsa escrota	Comprometida	Grau 3 / Alto grau	15	-	II	Nativo	Cirurgia	90	254
	14	Cocker Spaniel	156	I	Face	Comprometida	Grau 3 / Alto grau	5	26,5%	II	Nativo	Cirurgia	107 †	107 †
	15	Pit-bull	112	III.1	Multicêntrico	Comprometida	Grau 3 / Alto grau	2	2,2%	II	Nativo	Cirurgia, clorambucila	828	828

	16	SRD	108	I	Membro	Livre	Grau 2 / Alto grau	14	12,0%	II	Nativo	Cirurgia	569	569
Grupo 2a (risco intermediário – quimioterapia metronômica)	01	Pit-bull	110	I	Membro	Comprometida	Grau 1 / Baixo grau	0	1,2%	I	Nativo	Cirurgia, clorambucila	520	520
	02	SRD	125	I	Membro	Comprometida	Grau 1 / Baixo grau	3	5,1%	I	Nativo	Cirurgia, clorambucila	52	52
	03	Labrador	139	I	Membro	Comprometida	Grau 2 / Alto grau	1	4,5%	I	Nativo	Cirurgia, clorambucila	52	52
	04	Cocker Spaniel	172	I	Membro	Comprometida	Grau 2 / Alto grau	0	12,4%	II	Nativo	Cirurgia, clorambucila	942	942
	05	SRD	148	I	Membro	Comprometida	Grau 1 / Baixo grau	1	17,0%	III	Nativo	Cirurgia, clorambucila	213	213
	06	Dogo Argentino	122	I	Membro	Comprometida	Grau 2 / Alto grau	1	5,5%	II	Nativo	Cirurgia, clorambucila	493	493
	07	Cocker Americano	133	I	Tronco	Comprometida	Grau 2 / Baixo grau	0	13,5%	II	Nativo	Cirurgia, clorambucila	857	857
	08	Labrador	96	I	Membro	Comprometida	Grau 2 / Alto grau	0	2,3%	I	Nativo	Cirurgia, clorambucila	365	365
	09	Schnauzer	181	I	Membro	Comprometida	Grau 2 / Alto grau	0	2,1%	II	Nativo	Cirurgia, clorambucila I	77	77
	10	Bernese	48	I	Membro	Comprometida	Grau 2 / Alto grau	0	3,0%	III	Nativo	Cirurgia, clorambucila	426	426
	11	Dachshund	120	I	Membro	Exígua	Grau 2 / Alto grau	0	2,0%	I	Nativo	Cirurgia, clorambucila	1006	1006
	12	Labrador	132	I	Membro	Comprometida	Grau 2 / Alto grau	0	0,3%	I	Nativo	Cirurgia, clorambucila	847	847
	13	SRD	144	I	Membro	Comprometida	Grau 2 / Baixo grau	0	1,8%	I	Nativo	Cirurgia, clorambucila	78	78
	14	SRD	144	I	Tronco	Comprometida	Grau 2 / Alto grau	2	2,6%	II	Nativo	Cirurgia, clorambucila	60	60
	15	Weimaraner	111	I	Membro	Comprometida	Grau 2 / Alto grau	0	1,0%	I	Nativo	Cirurgia, clorambucila	536	536
	16	Labrador	136	I	Membro	Exígua	Grau 2 / Baixo grau	2	7,0%	II	Nativo	Cirurgia, clorambucila	216	216
	17	Poodle	140	I	Tronco	Comprometida	Grau 2 / Baixo grau	2	2,7%	I	Nativo	Cirurgia, clorambucila	271	271
	18	Pinscher	120	I	Vulva	Comprometida	Grau 2 / Baixo grau	0	4,0%	I	Nativo	Cirurgia, clorambucila	256	256
	19	Labrador	120	I	Tronco	Comprometida	Grau 2 / Alto grau	3	4,5%	II	Nativo	Cirurgia, clorambucila	372 †	437
	20	Poodle	72	I	Tronco	Livre	Grau 2 / Alto grau	3	5,0%	I	Nativo	Cirurgia, clorambucila	543	543

	21*	Yorkshire	84	I	Tronco	Comprometida	Grau 2 / Alto grau	2	10,0%	II	Nativo	Cirurgia, clorambucila	563	563
	22	Shih-tzu	156	I	Tronco	Livre	Grau 2 / Baixo grau	0	12,0%	II	Nativo	Cirurgia, clorambucila	260	260
	23	Bulldogge francês	77	I	Prepúcio	Comprometida	Grau 2 / Baixo grau	1	12,0%	II	Nativo	Cirurgia, clorambucila	246	246
	24	SRD	110	I	Bolsa escrotal	Comprometida	Grau 2 / Alto grau	1	9,8%	II	Nativo	Cirurgia, clorambucila	120	120
Grupo 2b (risco intermediário – controle)	01	SRD	82	I	Membro	Comprometida	Grau 2 / Baixo grau	0	5,8%	I	Nativo	Cirurgia	983	983
	02	Dachshund	200	I	Membro	Exígua	Grau 2 / Baixo grau	4	2,0%	I	Nativo	Cirurgia	165	165
	03	Poodle	186	I	Tronco	Comprometida	Grau 2 / Baixo grau	1	6,9%	II	Nativo	Cirurgia	1155	1155
	04	Poodle	198	I	Tronco	Comprometida	Grau 2 / Baixo grau	1	24,8%	I	Nativo	Cirurgia	603	603
	05	Yorkshire	197	I	Membro	Livre	Grau 2 / Baixo grau	3	38,0%	II	Nativo	Cirurgia	240	240
	06	Labrador	96	I	Tronco	Comprometida	Grau 2 / Baixo grau	1	10,0%	I	Nativo	Cirurgia	310	310
	07	Golden Retriever	132	I	Tronco	Comprometida	Grau 2 / Baixo grau	2	4,2%	II	Nativo	Cirurgia	179	179
	08	Labrador	132	I	Membro	Livre	Grau 2 / Alto grau	1	2,0%	III	Nativo	Cirurgia	240	240
	09	SRD	163	I	Tronco	Comprometida	Grau 2 / Alto grau	2	4,0%	II	Nativo	Cirurgia	181	181
	10	SRD	120	I	Membro	Exígua	Grau 2 / Baixo grau	0	5,3%	II	Nativo	Cirurgia	780	780
	11	Staffordshire Bull Terrier	119	I	Bolsa escrotal	Exígua	Grau 2 / Baixo grau	1	0,7%	I	Nativo	Cirurgia	190	190
Grupo 2b (baixo risco)	01	Labrador	153	I	Membro	Livre	Grau 1 / Baixo grau	2	4,0%	II	Nativo	Cirurgia	306	306
	02	Pit-bull	126	I	Orelha	Livre	Grau 1 / Baixo grau	0	2,2%	II	Nativo	Cirurgia	230	230
	03	Dogue Alemão	72	I	Membro	Livre	Grau 2 / Alto grau	0	5,0%	I	Nativo	Cirurgia	136	136
	04	Fox Paulistinha	120	I	Membro	Livre	Grau 2 / Alto grau	0	3,5%	II	Nativo	Cirurgia	60	60
	05	Labrador	119	I	Membro	Livre	Grau 1 / Baixo grau	0	5,7%	II	Nativo	Cirurgia	351	351
	06	Maltês	145	I	Membro	Livre	Grau 2 / Baixo grau	0	3,0%	II	Nativo	Cirurgia	306	306
	07	Labrador	156	I	Vulva	Livre	Grau 2 / Baixo grau	0	8,0%	I	Nativo	Cirurgia	267	267

	08	SRD	144	I	Membro	Livre	Grau 2 / Baixo grau	1	4,0%	II	Nativo	Cirurgia	20	20
	09	SRD	48	I	Tronco	Livre	Grau 2 / Baixo grau	1	6,0%	I	Nativo	Cirurgia	516	516
	10	Labrador	60	I	Face	Livre	Grau 2 / Baixo grau	0	4,5%	I	Nativo	Cirurgia	180	180
	11	Golden Retriever	128	I	Tronco	Livre	Grau 2 / Baixo grau	0	1,2%	I	Nativo	Cirurgia	257	257
	12	SRD	60	I	Tronco	Livre	Grau 2 / Baixo grau	0	3,0%	I	Nativo	Cirurgia	301	301
	13	Labrador	108	I	Membro	Livre	Grau 2 / Baixo grau	0	12,2%	II	Nativo	Cirurgia	622	622
	14	Labrador	84	I	Tronco	Livre	Grau 2 / Baixo grau	0	2,0%	II	Nativo	Cirurgia	1001	1001
	15	Boxer	108	I	Tronco	Exígua	Grau 2 / Baixo grau	1	8,8%	I	Nativo	Cirurgia	161	161
Estágios I a IV definidos pela Organização Mundial de Saúde (London e Thamm, 2013), mas com divisão do estágio III em III.1 e III.2 , respectivamente, na ausência ou presença de envolvimento dos linfonodos regionais. KITr – receptor KIT, sendo KIT I a expressão membranar, KIT II a expressão citoplasmática focal e KIT III a expressão citoplasmática difusa (Kiupel et al., 2004). ITD – <i>internal tandem duplication</i> (duplicação interna em tandem), RT – radioterapia. * Mastocitoma recorrente, † recorrência tumoral (intervalo livre de doença) ou óbito relacionado ao mastocitoma (sobrevida global).														

Tabela 11 – Fatores prognósticos para o mastocitoma em 98 cães, de acordo com o risco de recorrência ou metástase						
Fator prognóstico		Alto risco		Risco intermediário		Baixo risco
		Grupo 1a (quimioterapia em dose máxima tolerada)	Grupo 1b (controle)	Grupo 2a (quimioterapia metronômica)	Grupo 2b (controle)	Grupo 3 (controle)
		n = 32	n = 16	n = 24	n = 11	n = 15
Estadiamento clínico	I	16 (50,0%)	6 (37,5%)	24 (100,0%)	11 (100,0%)	15 (100,0%)
	II	9 (28,1%)	1 (6,3%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
	III	7 (21,9%)	8 (50,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
	IV	0 (0,0%)	1 (6,3%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
Graduação de Patnaik et al. (1984)	1	0 (0,0%)	0 (0,0%)	2 (8,3%)	0 (0,0%)	3 (20,0%)
	2	29 (90,6%)	11 (68,8%)	22 (91,7%)	11 (100,0%)	12 (80,0%)
	3	3 (9,4%)	5 (31,2%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
Graduação de Kiupel et al. (2011)	Baixo-grau	9 (28,1%)	2 (12,5%)	10 (41,7%)	9 (81,8%)	13 (86,6%)
	Alto-grau	23 (71,9%)	14 (87,5%)	14 (58,3%)	2 (18,2%)	2 (13,4%)
Índice mitótico	< 5 (in 10 HPF)	23 (71,9%)	8 (50,0%)	24 (100,0%)	11 (100,0%)	0 (0,0%)
	> 5 (in 10 HPF)	9 (28,1%)	8 (50,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	15 (100,0%)
Ki-67	< 1.8%	1/31 (3,2%)	1/15 (6,7%)	3 (12,5%)	10 (91,0%)	1 (6,7%)
	> 1.8%	30/31 (96,8%)	14/15 (93,3%)	21 (87,5%)	1 (9,0%)	14 (93,3%)
KITr	I	5 (15,6%)	4 (25,0%)	11 (45,8%)	5 (45,5%)	7 (46,7%)
	II	22 (68,8%)	10 (62,5%)	11 (45,8%)	5 (45,5%)	8 (53,3%)
	III	5 (15,6%)	2 (12,5%)	2 (8,4%)	1 (9,0%)	0 (0,0%)
Exon 11 do gene c-kit	Nativo	26 (81,3%)	15 (93,8%)	24 (100,0%)	11 (100,0%)	15 (100,0%)
	Deleção	1 (3,1%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
	Duplicação interna em tandem	5 (15,6%)	1 (6,2%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)

HPF – *high power field* (campo de maior aumento).

Recorrência tumoral local não ocorreu nesse estudo, mesmo nos pacientes com margens cirúrgicas exíguas (n = 9) ou incompletas (n = 33), e ainda, na ausência de terapias adjuvantes (n = 10/42). Complicações relacionadas ao mastocitoma ocorreram em 22 pacientes, sendo 21/48 considerados sob alto risco (onze sem tratamento adjuvante apesar da indicação) e 1/35 sob risco intermediário. Todas as complicações, neste estudo, resultaram na formação de lesões múltiplas na pele, com 72,7% (16/22) tendendo a ulceração. Desses pacientes, 81,2% (18/22) tiveram seu óbito relacionado ao mastocitoma canino e apenas quatro obtiveram adequado controle da doença em terapia de resgate. Quatro pacientes de risco baixo a intermediário desenvolveram “de novo” mastocitomas, caracterizados como novas lesões, independentes, também de risco baixo a intermediário, mas essas foram tratadas como doença primária, e não como complicações, do mastocitoma diagnosticado anteriormente.

De acordo com o risco de recorrência ou disseminação tumoral, atingiu-se a mediana, obtendo-se diferença no ILD e SG apenas em relação ao grupo de alto risco, definidas como 274 e 669 dias, respectivamente e demonstradas na figura 17, respectivamente (p < 0,0001).

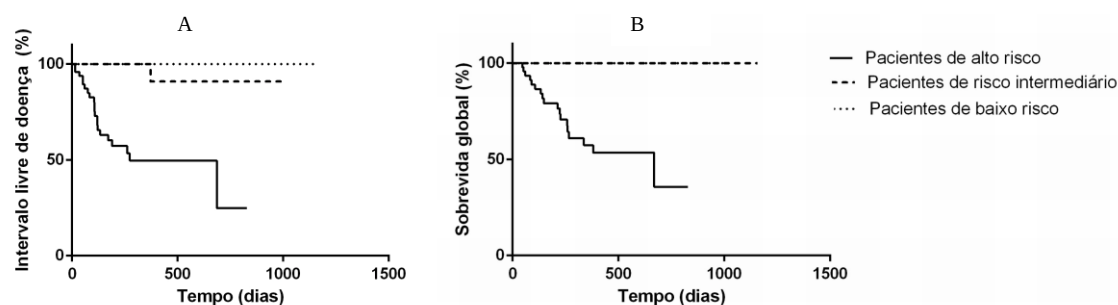


Figura 17 – Representação gráfica do intervalo livre de doença (A) e sobrevida global (B) de 98 cães com mastocitoma, conforme o risco de recorrência e disseminação tumoral. Observa-se diferença no intervalo livre de doença e sobrevida global, em relação ao grupo de alto risco, uma vez que apenas esse grupo atingiu as medianas de 274 e 669, respectivamente ($p < 0,0001$).

Observou-se diferença no ILD e SG nos animais tratados e não tratados, apenas nos pacientes de alto risco (grupos 1a e 1b), sendo atingida a mediana para ILD com 686 e 107 dias ($p = 0,004$), respectivamente, enquanto a mediana para a SG só foi atingida no grupo de alto risco controle (1b), com 224 dias ($p = 0,006$), conforme demonstrados na figura 18. Nos demais grupos a mediana não foi atingida, e não houve diferença no ILD e SG, com apenas um, de 52 pacientes (1,9%) desenvolvendo recorrência tumoral aos 372 dias, mas com nenhum óbito relacionado ao mastocitoma.

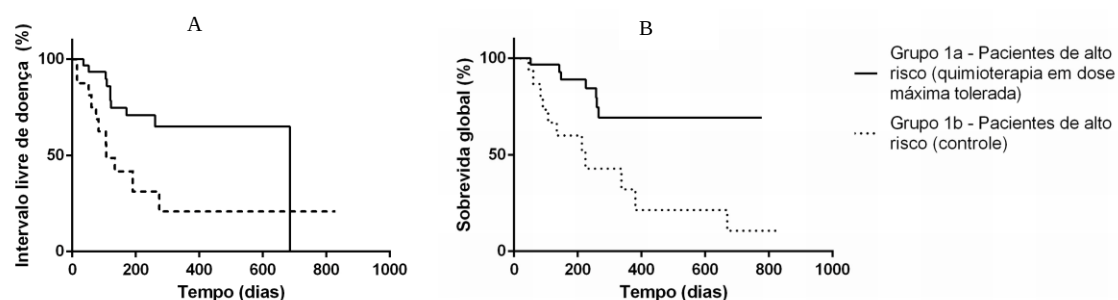


Figura 18 – Representação gráfica do intervalo livre de doença (A) e sobrevida global (B) de 48 cães com mastocitoma de alto risco de recorrência ou disseminação, conforme o uso de quimioterapia adjuvante, em dose máxima tolerada. Observa-se diferença no intervalo livre de doença com 686 e 107 dias para os pacientes submetidos ou não ao tratamento adjuvante, respectivamente ($p = 0,004$), sendo a mediana para sobrevida global, de 224 dias, atingida apenas para os pacientes que não receberam tratamento adjuvante, ($p = 0,006$).

Para os pacientes de alto risco, tratados com QT em DMT, o ILD e a SG foram correlacionados, negativamente, com o estágio da doença ($p = 0,03$, $r_s = 0,512$), mas a resposta à esse tratamento não foi afetada por outros fatores prognósticos.

Efeitos colaterais foram relativamente comuns nos cães submetidos à QT em DMT, acometendo 20/32 pacientes (62,5%), em algum momento do tratamento, com uma ocorrência em 82,6% dos cães tratados com lomustina (18/23) e 22,2% daqueles tratados com vimblastina (2/9). No entanto, a maioria dos efeitos colaterais foram de baixa gravidade, sendo observada, náusea e vômitos auto-limitantes em 4/32 pacientes (todos em tratamento com lomustina), neutropenia leve em 12 pacientes (sendo apenas três em tratamento com vimblastina), moderada em sete (seis em tratamento com lomustina) e grave em apenas dois casos (ambos em tratamento com lomustina). Elevação simultânea de ALT e FA ocorreu de forma leve e moderada em 26,1%

(6/23) e 56,5% (13/23), respectivamente, dos pacientes em tratamento com lomustina. A FA também se manteve, discretamente elevada, em 44,4% e 48% dos pacientes em tratamento, respectivamente com vimblastina e clorambucila, em associação à prednisona. Outros efeitos colaterais não foram observados durante o tratamento com clorambucila.

Discussão

De acordo com o consenso europeu sobre o mastocitoma em cães e gatos, a terapia sistêmica é considerada um tratamento adequado para pacientes com elevado risco de metástase (Blackwood et al., 2012). Nesse estudo, conforme proposto por Blackwood et al. (2012), London e Thamm (2013) e Miller et al. (2014), esse risco foi atribuído aos pacientes que tiveram seus mastocitomas classificados como grau 3 de Patnaik, mas também àqueles de grau intermediário, na existência de metástase em linfonodos ou à distância e ou elevada fração de crescimento estimada pelo índice mitótico (superior a 5 em 10 campos de maior aumento) ou Ki-67, além daqueles primários de mucosas ou junções muco-cutâneas (London e Thamm, 2013). Cães da raça Shar-pei, mastocitomas localizados na bolsa escrotal, prepúcio, períneo e vulva, com margens cirúrgicas histológicas comprometidas e exíguas ou alto grau de Kiupel, foram associadas a um risco intermediário. Nesse estudo, a atribuição do risco, conforme o Ki-67, foi subjetiva, sem a utilização de um valor de corte específico, mas de acordo com os demais fatores prognósticos, associados a risco elevado ou intermediário. Entretanto, valores de corte divergentes são encontrados, também na literatura, para o prognóstico do mastocitoma canino (Webster et al., 2007; Maglennon et al., 2008; Strefezzi et al., 2010).

Nenhum paciente de risco intermediário a baixo teve seu óbito associado ao mastocitoma canino, entretanto, nos pacientes de risco elevado, aqueles que desenvolveram complicações tiveram elevada probabilidade de óbito. Os protocolos utilizados, nesse estudo, com lomustina e vimblastina, podendo admitir o uso sequencial do clorambucila, foram eficazes, promovendo significativo aumento do ILD e SG em pacientes de alto risco, e, embora alguns pacientes tenham sido acompanhados por um curto período de tempo, os mesmos auxiliam na composição do quadro clínico, conforme o risco de recorrência ou metástase.

Apesar dos inúmeros fármacos propostos para a QT em cães com mastocitoma, seu uso permanece empírico, pela ausência de estudos controlados (Dobson e Scase, 2007; London e Thamm, 2013) e a combinação de vimblastina e prednisona parece ter se tornado o protocolo de escolha (Dobson e Scase, 2007; Webster et al., 2008). No estudo conduzido por Thamm et al. (2006), com 61 pacientes de alto risco (mastocitomas de grau elevado ou intermediário, acometimento de linfonodos regionais e localização muco-cutânea), o tratamento adjuvante com vimblastina na dose de 2mg/m^2 a cada sete ou 14 dias, por via intravenosa, e prednisona resultou em sobrevida média de 1374 dias para os pacientes com tumores de alto grau, enquanto todos os pacientes com mastocitoma de grau 2 atingiram sobrevida de três anos. Entretanto, apesar da reconhecida eficácia da lomustina na neoadjuvância (Rassnick et al., 1999), esse é o primeiro estudo, envolvendo o uso desse fármaco, sem a associação com a vimblastina, como terapia adjuvante de primeira linha para o mastocitoma canino de alto risco, demonstrando a eficácia desse fármaco, nesse contexto. No estudo conduzido por Cooper et al. (2009), com 20 pacientes de alto risco, o tratamento adjuvante com prednisona em associação à vimblastina (2mg/m^2 , por via intravenosa) e lomustina ($27\text{--}90\text{mg/m}^2$, por via oral), alternadas a cada duas semanas, resultou em ILD e SG de 35 e 48 semanas, respectivamente. A implementação, sequencial, da QM, de curta duração, após o uso da QT em DMT, pode ter interferido no ILD e SG desses pacientes, entretanto, essa diferença não pôde ser avaliada, tendo em vista que a

recorrência tumoral ou perda do acompanhamento foram os principais motivos relacionados à não utilização desse tratamento.

Popularmente, assume-se maior risco de recorrência para mastocitomas com evidências histológicas de margens cirúrgicas incompletas ou exúguas. Entretanto, essa constatação não foi observada neste estudo, como também não foi observada por Miller et al. (2015). No estudo conduzido por Michels et al. (2002), a probabilidade de recorrência em mastocitomas com evidência de margens comprometidas não se mostrou superior à daqueles com margens limpas. Isso pode ser resultado de falha na avaliação das margens cirúrgicas ou mesmo, por reduzida importância da extensão da cirurgia, no controle local dos mastocitomas. De qualquer forma, a recidiva tumoral pode resultar em um pior prognóstico e todo esforço deve ser feito, diante de um risco intermediário a elevado de recorrência, para evitar que isso ocorra (Bostock, 1973; Patnaik et al., 1984). Nesse estudo, na possibilidade de ampliação das margens cirúrgicas, sem conseqüente prejuízo funcional, optou-se por cirurgias de revisão, com o objetivo de reduzir o risco do paciente e evitar o uso de terapias sistêmicas, de forma indiscriminada, incluindo-os em um grupo de baixo risco.

Diante do prognóstico desfavorável descrito para as recidivas tumorais, e da impossibilidade de ampliação das margens e indisponibilidade da RT, pacientes com margens cirúrgicas incompletas ou exúguas foram submetidos à QT sistêmica, em dose metronômica, entretanto de curta duração (oito semanas), considerando a reduzida fração de crescimento evidenciada nos mastocitomas desses pacientes. Em 24 pacientes de risco intermediário, sendo que 22 apresentaram margens cirúrgicas incompletas ou exúguas, o tratamento com o clorambucila, em baixa dose, associado à prednisona, resultou em efetivo controle da doença em 95,8% dos pacientes, e apenas um desenvolveu recorrência tumoral. Esse resultado, semelhante ao obtido com pacientes apresentando um perfil semelhante, mas submetidos à RT ou QT em DMT, na adjuvância (Al-Sarraf et al., 1996; Thamm et al., 2006; Camps-Palau et al., 2007; Cooper et al., 2009), não é diferente do resultado obtido no grupo controle com risco intermediário (grupo 2b) e baixo risco (grupo 3), sem discrepâncias nas curvas de ILD e SG. Tratamentos adjuvantes podem ser dispensados em pacientes de risco intermediário à baixo, conforme estabelecido neste estudo, mesmo na ausência de margens cirúrgicas livres, como também demonstrado por Smith et al. (2015). O desenvolvimento de “de novo” mastocitomas parece ocorrer esporadicamente (11,1%) nos pacientes de risco intermediário, sem ocorrência reportada naqueles de baixo risco, entretanto, conforme sugerido por Davies et al. (2002), não encontra-se associado a um pior prognóstico.

Apesar da contemporaneidade do conceito acerca da QM, a utilização de baixas doses de quimioterápicos, em intervalos curtos e regulares (Mutsaers, 2013), já é empregada no tratamento de neoplasias de baixo grau há algum tempo. Um dos principais e mais eficazes protocolos no tratamento de linfomas intestinais de baixo grau, em felinos, consiste no uso do clorambucila na dose de 2 mg/gato a cada 48 horas, em associação à prednisolona (Stein et al., 2010). Esse mesmo protocolo, em associação à vincristina, foi proposto como terapia de manutenção em linfomas multicêntricos, em cães, após o término do devido protocolo de indução (Vonderhaar e Morrison, 1998). Em um estudo conduzido por Taylor et al. (2009), cães apresentando mastocitomas inoperáveis foram submetidos ao tratamento com prednisolona e clorambucila, em baixa dose, com resultados clínicos mensuráveis em 38% dos pacientes, sem nenhuma toxicidade. A segurança do protocolo e a existência de estudos na neoadjuvância, sugerem provável efeito no cenário adjuvante. O efeito anti-tumoral, indireto, esperado com esse tratamento, é a estimulação de células NK do sistema imunológico, podendo resultar na

apoptose de células neoplásicas, tradicionalmente resistentes ao efeito de quimioterápicos em doses citotóxicas, podendo ser, inclusive mais eficiente do que protocolos com DMT (Leach et al., 2012; Mutsaers, 2013). Entretanto, nesse estudo, a QM, como primeira linha, em pacientes de risco intermediário, não ofereceu qualquer vantagem em relação aqueles que não receberam o tratamento (grupo controle) ou de baixo risco. Novos estudos, com maior número de casos são, portanto, necessários para a definição da necessidade de tratamentos adjuvantes em pacientes de risco intermediário.

A resposta à QT em DMT nos pacientes de alto risco (grupo 1a) é afetada principalmente pelo estadiamento clínico e este, pode ser, o fator prognóstico mais relevante para pacientes de risco elevado submetidos à QT adjuvante em DMT, como proposto por Warland et al. (2014).

Efeitos colaterais foram comumente associados à QT em DMT, mas não foram demonstrados pelos pacientes submetidos à QM. O efeito mielossupressor e hepatotóxico da lomustina em cães é bem reconhecido (Gustafon e Page, 2013) e esse protocolo mostrou-se mais tóxico do que àquele utilizando-se a vimblastina. Entretanto, conforme relatado por Cooper et al. (2009), que obtiveram efeitos colaterais em 54% dos pacientes submetidos ao protocolo com interposição de vimblastina e lomustina, esses fármacos foram bem tolerados pelos pacientes desse estudo. Thamm et al. (1999) relataram efeitos colaterais, em resposta à vimblastina, em 20% dos pacientes com mastocitoma, tratados no cenário adjuvante, e da mesma forma que observado neste estudo, os efeitos colaterais foram, de uma forma geral, leves, sem prejuízo relevante a qualidade de vida dos pacientes. Conforme relatado por Leach et al. (2012), a QM também foi bem tolerada e não foram observados efeitos colaterais, sendo o aumento da FA, associado ao uso concomitante de GCs. No entanto, a toxicidade tardia não foi avaliada desses fármacos não foi estudada nesse estudo.

Conclusões

A QT adjuvante, com lomustina ou vimblastina, em associação à GCs, é adequada e segura para o tratamento de mastocitomas classificados como grau 3 de Patnaik, mas também àqueles de grau intermediário, na existência de metástase em linfonodos ou à distância e/ou elevada fração de crescimento estimada pelo índice mitótico ou percentual de Ki-67, com o objetivo de estender a sobrevida e prevenir a recorrência tumoral. Pacientes de risco intermediário, da mesma forma que aqueles de baixo risco, podem não necessitar de tratamentos adjuvantes, mesmo na ausência de margens cirúrgicas livres. Entretanto, tendo em vista o prognóstico desfavorável dos mastocitomas caninos após a recorrência, uma avaliação ampla e criteriosa, dos fatores prognósticos, se faz necessária para descartar um maior risco de recorrência ou disseminação tumoral.

ESTUDO IV – ANÁLISE DE RISCO E RESPOSTA CLÍNICA DE CÃES COM MASTOCITOMA CUTÂNEO TRATADOS COM EXCISÃO CIRÚRGICA MARGINAL INTENCIONAL E RADIOTERAPIA

Introdução

O mastocitoma se destaca dentre as neoplasias malignas em cães, pela sua elevada incidência e heterogeneidade de apresentação clínica e comportamento biológico, partindo de tumores de excelente prognóstico à extremamente agressivos (Dobson e Scase, 2007; Warland et al., 2015).

A cirurgia representa a primeira linha de tratamento para os mastocitomas cutâneos, em regiões que permitam ampla excisão, mas terapias adjuvantes são comumente recomendadas quando existe risco intermediário a elevado de recorrência local ou disseminação (Dobson e Scase, 2007; London e Thamm, 2013). Esse risco pode ser avaliado a partir da identificação de fatores prognósticos que incluem estadiamento clínico, graduação histológica, índice mitótico, expressão imuno-histoquímica para as proteínas KITr (CD117) e Ki-67 (MIB-1), existência de mutações no gene *c-kit*, entre outros (Patnaik et al., 1984; Kiupel et al., 2004; Maglennon et al., 2008; Strefezzi et al., 2009; Kiupel et al., 2011; London e Thamm, 2013).

Historicamente tem sido admitido um maior risco de recorrência para mastocitomas com evidências histológicas de margens cirúrgicas incompletas ou exíguas. No entanto, este resultado não foi relatado por Michels et al. (2002) e Miller et al. (2015). Ambos os autores descobriram que a probabilidade de reincidência em mastocitomas com evidência de margens comprometidas não foi superior àqueles com margens limpas. No entanto, um prognóstico obscuro é tradicionalmente associado aos mastocitomas recorrentes, com taxas de óbito relacionadas de 86-100% (Bostock, 1973; Patnaik et al., 1984), embora estudos recentes tenham demonstrado adequado controle da doença, nesses pacientes, a partir da instituição de terapias adjuvantes (Thamm et al., 1999).

Assim sendo, a RT é o tratamento adjuvante de escolha para os mastocitomas de grau intermediário em que a excisão cirúrgica completa ou a ampliação das margens não foi possível (Dobson e Scase, 2007; Warland et al., 2015). A combinação de cirurgia e radiação ionizante parece ser muito eficaz nesse contexto com 94 a 97% dos casos atingindo doze meses livres de doença (Frimberger et al., 1977; Al-Sarraf et al., 1996). A RT pode prevenir a recorrência local, inclusive para mastocitomas de alto grau, entretanto, esses pacientes apresentam elevado risco de desenvolvimento de doença metastática e outras modalidades terapêuticas, podem ser recomendadas, em combinação ou substituição (Rogers, 1996). Entretanto, existe pouca informação acerca do impacto de diferentes fatores prognósticos na resposta à radioterapia.

Apesar da orientação oferecida pelo estadiamento clínico do MCT canino, proposto pela OMS (Owen, 1980), ainda não existem critérios precisos para a identificação do estágio da progressão da doença em uma maneira de orientar as decisões a respeito do tratamento local ou sistêmico. A suspeita de metástase em linfonodos locais, não necessariamente resulta na progressão para doença sistêmica, e bons resultados podem ser obtidos se tratamentos adequados forem instituídos (Chaffin e Thrall, 2002; Thamm et al, 2006;. Camp-Palau et al , 2007; Lejeune et al, 2015).

No estudo conduzido por Weishaar et al. (2014), considerando o nível de comprometimento do linfonodo, observou-se diferença no prognóstico ao comparar os pacientes com classificação HN0/1 (mediana não atingida) e aqueles com classificação HN2/3 (ILD de 804 dias e SG de

1824 dias), sendo que 90% e 56% dos pacientes destes dois grupos, respectivamente, atingiram sobrevida de dois anos, demonstrando que o acometimento do linfonodo representa um evento clínico relevante na progressão do mastocitoma canino.

O objetivo deste estudo foi avaliar a resposta à RT após a excisão marginal, intencional, do mastocitoma canino e correlacionar com fatores prognósticos clínicos, histológicos, imunofenotípicos e genéticos.

Resultados

Conforme demonstrado na tabela 12, foram incluídos 21 cães, com idade entre 44-132 meses (91 ± 25), apresentando mastocitomas cutâneos, solitários, localizados nos membros ($n = 19$), face ($n = 1$) e lábio (junção muco-cutânea; $n = 1$). Destes, sete pacientes tiveram seus linfonodos regionais removidos para estadiamento. Nesses pacientes, a metástase foi completamente descartada em dois casos (HN0), permaneceu suspeita em quatro casos (HN1) e foi classificada como metástase inicial em apenas um paciente (HN2), mas nenhum apresentou metástase avançada, com alteração da arquitetura do linfonodo (HN3). Portanto, terapias sistêmicas adicionais não foram recomendadas e não foi realizada irradiação profilática do linfonodos regionais ou de sua localização anatômica.

Embora este estudo tenha incluída apenas pacientes com mastocitomas de grau 2 de Patnaik, um paciente apresentou mastocitoma de alto grau de Kiupel. E, apesar do baixo índice mitótico, alguns pacientes apresentaram elevada fração de crescimento estimada pelo Ki-67, e apenas dois apresentaram um valor inferior a 1,8%. Apenas seis pacientes apresentaram imunexpressão normal / membranar de KITr (KIT I), enquanto os demais apresentaram um padrão citoplasmático focal (KIT II). Nenhum paciente apresentou duplicações internas em tandem no exon 11. O intervalo entre a cirurgia e o início da RT variou de 7-55 dias ($32,2 \pm 11,5$).

Os pacientes foram acompanhados pelo período médio de 712,4 dias e as medianas para o ILD e SG não foram atingidas. Apenas três pacientes tiveram o óbito relacionado à progressão do mastocitoma canino (14,3%) e recorrência tumoral foi observada em quatro pacientes incluídos neste estudo (19,1%), durante o período de acompanhamento, sendo que dois cães apresentaram recorrência tumoral no sítio cirúrgico com ILD de 524 e 465 dias e dois pacientes desenvolveram alterações clínicas no linfonodo regional, compatíveis com disseminação tumoral, com ILD de 76 e 173 dias. Sendo assim, 90,5% dos pacientes com mastocitoma de risco intermediário, submetidos à cirurgia e RT, atingiram 12 meses de sobrevida.

Três pacientes apresentaram histórico de mastocitoma recorrente antes da instituição do tratamento proposto, no entanto, eles não apresentaram uma pior resposta à radiação. Os achados imunohistoquímicos para KITr e Ki-67 também não foram correlacionados com o intervalo livre de doença do intervalo ou sobrevida global.

Tabela 12 – Informações individuais de 21 cães com mastocitoma submetidos à radioterapia adjuvante.

Identificação	Raça	Status do linfonodo	KITr	MI	Ki-67	Acompanhamento	Intervalo livre de doença	Sobrevida global
01	Golden Retriever	NAH	I	1	13,0%	Censurado	319	319
02*	Boxer	NAH	II	6	11,8%	Censurado	2055	2055
03	Poodle Toy	NAH	I	1	13,6%	Tratamento de resgate, vivo e sem sinal da doença	173 †	1501
04*	Golden Retriever	NAH	II	0	4,6%	Censurado	397	397
05	Golden Retriever	NAH	II	2	58,0%	Euthanasia por da progressão da doença	524 †	524 †
06	Golden Retriever	NAH	II	1	2,2%	Censurado	171	171
07	Setter	NAH	I	2	1,3%	Censurado	1475	1475
08	Spitz Japonês	NAH	II	5	28,8%	Censurado	112	112
09	Labrador	HN2	II	2	13,0%	Censurado	730	730
10	Great Dane	NAH	II	1	22,7%	Euthanasia por da progressão da doença	1020	1020
11	Labrador	NAH	II	0	6,0%	Euthanasia por da progressão da doença	76 †	142 †
12	SRD	NAH	II	6	29,0%	Vivo e sem sinal da doença	1612	1612
13	Labrador	NAH	II	4	4,0%	Censurado	1106	1106
14	Pastor Alemão	HN1	II	2	2,3%	Vivo e sem sinal da doença	681	681
15	Labrador	HN1	I	1	3,4%	Censurado	503	503
16	Great Dane	HN0	II	2	5,4%	Censurado	203	203
17*	Staffordshire Bull Terrier	HN1	II	1	3,5%	Vivo e sem sinal da doença	507	507
18	Labrador	HN0	I	2	3,2%	Vivo e sem sinal da doença	448	448
19	Boxer	NAH	I	5	7,9%	Vivo e sem sinal da doença	381	381
20	Border Collie	HN1	II	1	1,1%	Vivo e sem sinal da doença	447	447
21	Labrador	NAH	II	2	5,6%	Euthanasia por da progressão da doença	465 †	626 †

NAH – linfonodo não avaliado histologicamente, HN0 – não metastático, HN1 – suspeita de metástase, HN2 – metástase inicial.

KITr – receptor KIT, sendo KIT I a expressão membranar, KIT II a expressão citoplasmática focal e KIT III a expressão citoplasmática difusa (Kiupel et al., 2004); MI – *mitotic index* (índice mitótico)

* Mastocitoma recorrente. † recorrência tumoral (intervalo livre de doença) ou óbito relacionado ao mastocitoma (sobrevida global).

Ao dividir esses pacientes quanto ao tratamento cirúrgico profilático do linfonodo regional a mediana também não foi atingida em nenhum dos dois grupos. Entretanto, parece haver uma tendência a significância com pior prognóstico para aqueles que não tiveram seus linfonodos regionais removidos (figura 19). Nenhum dos pacientes que tiveram complicações relacionadas ao mastocitoma, após a RT, tiveram seus linfonodos regionais removidos para estadiamento clínico inicial. Paralelamente, não foram observadas complicações nos pacientes cujos

linfonodos foram avaliados histopatologicamente, mesmo na presença de áreas suspeitas (HN1) ou metástase inicial (HN2). Um dos pacientes com suspeita de metástase regional após a RT apresentou o tumor primário localizado na junção muco-cutânea do lábio e elevada imunomarcagem para ki-67 (13,6%). No entanto, esse paciente apresentou excelente controle da doença após identificação e exérese cirúrgica precoce do linfonodo, classificado como HN2, mesmo sem QT adjuvante ou novo curso de radioterapia.

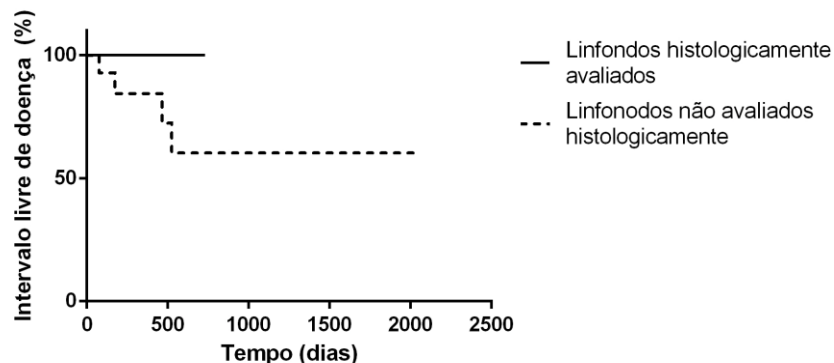


Figura 19 – Representação gráfica do intervalo livre de doença para 21 cães com mastocitoma cutâneo submetidos à RT adjuvante de acordo com a avaliação histológica do linfonodo (medianas não atingidas, $p = 0,1$).

Efeitos colaterais agudos e tardios ocorreram na pele irradiada em 40% e 80% dos pacientes respectivamente, e estão demonstrados na tabela 13. Em geral, observou-se toxicidade leve, com destaque para eritema/descamação (agudos) e alopecia/liquenificação (tardios), sendo o tratamento, com corticosteroides tópicos, suficiente para reduzir o desconforto. Entretanto, dois pacientes apresentaram ulceração e outro apresentou ulceração associada à dermatite úmida (grau 2), sendo tratados com antibióticos tópicos e prevenção de interferência pelo animal.

Tabela 13 – Toxicidade aguda e tardia relacionada à radioterapia adjuvante em 21 cães com mastocitoma				
	Grau 0	Grau 1	Grau 2	Grau 3
Aguda	8	5	3	0
Tardia	2	16	0	0

Discussão

Esse estudo demonstrou eficácia do tratamento do mastocitoma canino de grau intermediário, a partir da excisão cirúrgica marginal, intencional, seguida de radioterapia hipofracionada. Resultados semelhantes foram obtidos por Frimberger et al. (1977), Al-Sarraf et al., (1996) e Chaffin e Thrall (2002), mas podem ser facilmente reproduzidos, principalmente quando o uso da RT na adjuvância é considerado no planejamento pré-cirúrgico, evitando a formação de feridas cirúrgicas extensas ou que pudessem comprometer os planos de aplicação da radiação (Blackwood et al., 2014). No cenário neoadjuvante, a RT pode favorecer o controle local da doença e melhorar a qualidade de vida do paciente (Dobson et al., 2004), mas é frequentemente evitada devido ao risco de degranulação dos mastócitos e comprometimento de intervenções cirúrgicas subsequentes, conforme descrito por Dobson et al. (2004) e Dobson e Scase (2007).

O intervalo entre a cirurgia e o início da RT adjuvante é importante no controle da doença, conforme observado por Demetriou et al. (2012), no tratamento de sarcomas de tecido mole, em que o atraso no início da RT superior a quatro semanas esteve associado a melhores resultados. Segundo Demetriou et al. (2012), isso pode ocorrer devido ao maior número de células tumorais em hipóxia ou reduzida proliferação tumoral e, portanto, maior resistência à RT, nas primeiras

semanas do pós-operatório. Entretanto, ainda não se tem estabelecido o intervalo ideal para o tratamento dos mastocitomas caninos.

Tratamentos adjuvantes, com destaque para a radioterapia, podem melhorar o prognóstico de pacientes com mastocitomas recorrentes, conforme demonstrado neste estudo, enquanto Bostcok (1973) e Patnaik et al. (1984) tenham relatado um prognóstico desfavorável para esses pacientes. Essa constatação foi provada também por Thamm et al. (1999), a partir do uso da quimioterapia adjuvante após a remoção cirúrgica incompleta de mastocitomas caninos recorrentes.

O Ki-67 é um fator prognóstico independente bem estabelecido e valores acima de 1,8% estão associados à redução da sobrevida global em cães com mastocitoma de grau 2 (Scase et al., 2006; Maglennon et al., 2008). Entretanto, apesar do reduzido número de amostras, nesse estudo, não foi demonstrado impacto no prognóstico, e 19 pacientes apresentaram Ki-67 superior a 1,8%. Isso pode estar relacionado ao estadiamento inicial dos pacientes e superestimação do risco de morte pelo Ki-67, comparado ao índice mitótico, ou erro do tipo I (Van Lelyveld et al., 2015). Os padrões aberrantes de expressão de KITr (KIT II e III) são considerados fatores prognósticos negativos para o mastocitoma canino (Kiupel et al., 2004). No entanto, este estudo não demonstrou influência no ILD e SG, em 14 cães com padrão de expressão KIT II. Resultados semelhantes foram recentemente demonstrados em outros estudos, com fraca associação entre o padrão de expressão de KITr e o prognóstico (Giantin et al., 2012; Costa Casagrande et al., 2015). Duplicações internas em tandem não foram identificadas em nenhum paciente desse estudo, e parecem ser raras em mastocitomas solitários, em pacientes em estágio inicial, mas novos estudos são necessários para definir a relevância desse exame para a análise de risco desses pacientes.

Por outro lado, apesar da ausência de significância estatística, o tratamento profilático do linfonodo pode melhorar o prognóstico desses pacientes. A existência de metástase em linfonodos representa um fator prognóstico desfavorável para diferentes neoplasias (Araújo et al., 2015), e também para os mastocitomas caninos (Murphy et al., 2006; Warland et al., 2014). Em um estudo conduzido por Hume et al. (2011), com 43 cães, portadores de mastocitoma de alto grau, foi observada SG de 194 dias para os pacientes com metástases em linfonodos regionais, em comparação a 503 dias para aqueles que não apresentaram metástases. Para pacientes apresentando metástase em linfonodo, o tratamento envolvendo cirurgia, RT e/ou QT resultou em uma SG de 240 dias, enquanto aqueles pacientes que não foram tratados atingiram a mediana com 42 dias (Hume et al., 2011).

Embora Krick et al. (2009) tenham proposto critérios citológicos para o diagnóstico de metástases de mastocitoma em linfonodos, a citologia pode não ser um método ideal para isso, e a importância de células individuais ou pequenos agregados permanece indefinida, uma vez que até 24% dos linfonodos pode apresentar aumento do número de mastócitos, mesmo na ausência de neoplasia. O sistema de classificação proposto por Weishaar et al. (2014) pode ser mais eficiente, como demonstrado no presente estudo.

A simples remoção dos linfonodos com comprometimento inicial (HN1-HN2) pode interferir significativamente na progressão da doença, conforme observado neste estudo e por Weishaar et al. (2014), no entanto, a irradiação profilática do linfonodo regional não parece interferir no ILD de pacientes acometidos pelo mastocitoma canino e, portanto, não foi realizada (Poirier et al., 2006). O uso de terapia sistêmica deve ser considerado, em associação ou substituição à RT

adjuvante, em casos selecionados, mas principalmente em pacientes com metástase linfática avançada ou lesões de alto grau, sendo obtidos bons resultados nos estudos conduzidos por Chaffin e Thrall (2002), Thamm et al. (2006), Camps-Palau et al. (2007) e Lejeune et al. (2015).

Falhas no tratamento de RT podem resultar em recorrência local e, nesse estudo, provavelmente esteve relacionada à utilização de um protocolo hipofracionado e, portanto, paliativo, mas que usualmente promove um longo ILD, conforme demonstrado neste estudo, mas também no tratamento de sarcomas de tecido mole em cães (Demetriou et al., 2012). Metástases em linfonodos podem ser o resultado de falhas no estadiamento clínico e podem comprometer resultado do tratamento, apesar da eficácia da radiação ionizante.

Está bem estabelecido agora que a maioria dos mastocitomas apresentam reduzida probabilidade de metastização e que, nem todos os pacientes precisam passar por um estadiamento completo (Blackwood et al., 2002; Warland et al., 2014). No entanto, apesar de ainda existirem muitas dúvidas acerca da identificação e relevância das metástases em linfonodos, no mastocitoma canino (Dobson e Scase, 2007), metástases iniciais podem ser mais comuns do que o esperado, como demonstrado neste estudo (cinco dos sete linfonodos analisados histologicamente) e a remoção profilática dos linfonodos regionais, seguindo o território linfático (linfossomo) proposto por Suami et al. (2013), pode melhorar o prognóstico e o controle da doença em cães com mastocitomas solitários, especialmente se a radioterapia for considerada como única modalidade de tratamento adjuvante.

O tratamento foi, em geral, bem tolerado, com maior incidência de efeitos colaterais leves. A toxicidade tardia da RT é mais frequente em protocolos hipofracionados (Larue et al., 2007), entretanto, o risco de lesões graves parece ser baixo quando se utiliza doses totais inferiores a 800cGy, e aplicações cutâneas superficiais, conforme observado neste estudo e por Demetriou et al. (2002).

Conclusões

A excisão cirúrgica marginal, intencional, seguida de radioterapia pós-operatória é um tratamento bem tolerado e eficaz para o mastocitoma de grau intermediário, na ausência de duplicações internas em tandem no exon 11 do gene c-kit. No entanto, a avaliação dos fatores prognósticos pode ser determinante para a identificação dos pacientes com maior risco de desenvolvimento de metástases, em que outras modalidades de tratamento podem ser mais eficazes. O histórico de recorrência tumoral e expressão imuno-histoquímica para KITr e Ki-67 não parecem afetar a resposta à radioterapia, mas um estudo maior é necessário para ratificar essa afirmação. Os linfonodos devem ser cuidadosamente avaliados, durante o estadiamento clínico de cães com mastocitoma, sempre que a radiação ionizante for considerada como única forma de terapia adjuvante.

ESTUDO V – INIBIDORES TIROSINA-QUINASE PARA DOENÇA MENSURÁVEL E TRATAMENTO ADJUVANTE DO MASTOCITOMA CANINO

Introdução

O mastocitoma corresponde à neoplasia maligna mais comum na pele do cão (Dobson e Scase, 2007). Diante da ampla variação de seu comportamento biológico, vários fatores prognósticos foram propostos em uma tentativa de direcionamento do tratamento (Welle et al., 2008; London e Thamm, 2013; Warland et al., 2015).

Dentre as abordagens terapêuticas, a cirurgia se destaca como a melhor opção e maior probabilidade de cura, na maioria dos casos (Simpson et al., 2004; Dobson e Scase, 2007; London e Thamm, 2013), porém pode, também, favorecer a progressão e disseminação da doença, principalmente quando não é associada à tratamentos adjuvantes, em mastocitomas de comportamento biológico agressivo, resultando em uma cenário desastroso, com grave comprometimento da sobrevida do paciente (Patnaik et al., 1984; Michels et al., 2002). A RT, aplicável aos cenários adjuvante e neoadjuvante pode interferir significativamente no controle da doença local e na sobrevida (Dobson et al., 2004; Lejeune et al., 2015). Entretanto, inúmeros fármacos, com destaque para GCs, quimioterápicos e TKIs, também podem ser utilizados em tratamentos adjuvantes e neoadjuvantes, mas também na existência de doença inoperável, principalmente em pacientes em estadiamento avançado, entretanto, o prognóstico para esses pacientes permanece reservado à desfavorável (Dobson e Scase, 2007; London e Thamm, 2013; Warland et al., 2015).

Proteínas-quinases (fosforilases) são enzimas localizadas na superfície, citoplasma ou núcleo celular, que catalisam a transferência de grupamentos fosfato a partir de moléculas de ATP para resíduos específicos, com destaque para os resíduos de tirosina (proteínas tirosina-quinases), localizados na própria proteína (autofosforilação) ou em outras moléculas, de forma a permitir a transdução de sinais intracelulares em uma cascata complexa de eventos que, em última instância, irá promover alterações na transcrição gênica, com impacto na proliferação e sobrevivência da célula (Amora e Scholar, 2005; London, 2009). Modificações no status de ativação dessas moléculas estão relacionadas à alterações, genéticas e epigenéticas, em oncogenes ou genes supressores de tumor, que codificam a própria molécula, mas também moléculas que regulam sua atividade (Silva, 2010). Tendo em vista a complexidade molecular dos tumores, os estudos na Medicina Veterinária ainda são iniciais, no entanto inúmeras alterações já foram identificadas e caracterizadas, principalmente no mastocitoma canino, no qual já foi demonstrada relevância prognóstica e terapêutica de mutações que resultam em ganho de função ao KITr (Zemke et al., 2002; Webster et al., 2006b; Avery, 2012; Takeuchi et al., 2013).

A associação das proteínas-quinases no desenvolvimento e progressão do câncer resultou no desenvolvimento de inúmeras drogas, principalmente anticorpos monoclonais, direcionados à receptores tirosina-quinase específicos, com destaque para o trastuzumab e cetuximab com ação direcionada, respectivamente, aos receptores HER-2 e EGFR dos tumores mamários da mulher (Perou et al., 2000; London, 2013), mas também do mesilato de imatinibe, uma pequena molécula inibidora da tirosina-quinase com ação multidirecionada atingindo os receptores KITr, PDGFR e a proteína Bcr-Abl, sendo um importante fármaco no tratamento do tumor estromal gastrointestinal e leucemia mielóide crônica postiva para o cromossomo Filadélfia, nos seres humanos (Sleijfer et al., 2009). Na medicina Veterinária, o imatinibe foi modestamente utilizado no tratamento do mastocitoma canino (Isotani et al., 2008), e os maiores esforços

foram direcionados ao desenvolvimento de pequenas moléculas, com ação intracelular em várias proteínas-quinases, seguindo o atual conceito de terapias multidirecionadas (London, 2009; London, 2013). Mesilato de mastinib e fosfato de toceranib, ambos licenciados para utilização em cães, na Europa e nos Estados Unidos, atuam intracelularmente nos proteínas-quinases KITR e PDGFR α/β , sendo que o masitinib atua também em Lyn, Fyn e Lck (Ogilvie et al., 2011), e o toceranib em VGFR e Flt-3 (London et al., 2009). A ação, em múltiplos alvos terapêuticos, permite que essas moléculas interfiram de forma mais significativa nas diferentes vias responsáveis pela progressão do câncer (London, 2013).

Entretanto, apesar dos avanços terapêuticos, faltam diretrizes para a otimização do uso das diferentes modalidades terapêuticas, visando o tratamento individualizado e melhor controle da doença, principalmente no cenário adjuvante (Warland et al., 2015).

O objetivo desse estudo foi avaliar a resposta terapêutica do mastocitoma canino aos TKIs no cenário adjuvante, mas também na presença de doença mensurável, não operável, correlacionando com fatores prognósticos clínicos, anatomo-patológicos, imuno-histoquímicos e genéticos.

Resultados

Foram incluídos 31 cães, sendo que, 13 foram tratados no QVSH (*University of Cambridge*), no Reino Unido, e 18, no Hospital Veterinário (UFMG), no Brasil (Tabela 14). A avaliação prognóstica do tumor de cada paciente, considerando critérios anatomo-patológicos, imuno-fenotípicos e genéticos foram realizados em amostras obtidas meses antes da progressão tumoral desfavorável e início do TKI (terapia de resgate – n=13), imediatamente antes da instituição da medicação (terapia de primeira linha – n=7, sendo três no cenário adjuvante e quatro na existência de doença mensurável – ou segunda/terceira linha – n=8, sendo três no cenário adjuvante e cinco na presença de doença mensurável), ou após o tratamento com o TKI (terapia de primeira linha resultando em remissão parcial tornando o tumor operável; n=1).

Oito cães foram submetidos ao tratamento adjuvante com TKIs (devido ao elevado risco de recorrência ou disseminação tumoral), e 24 ao tratamento de doença mensurável, inoperável, embora um paciente (31a/b) tenha sido submetido aos dois tratamentos, tendo em vista que seu mastocitoma, no estágio III, tornou-se operável após o primeiro curso com o masitinib. O toceranib foi utilizado em substituição ao masitinib em apenas quatro pacientes. A sobrevida global para os pacientes desse estudo foi de 133 dias, entretanto, ao segregar aqueles que receberam tratamentos adjuvante e devido à doença mensurável, obteve-se uma sobrevida global de 267 e 103 dias, respectivamente (p = 0,004), representado na figura 20.

Tabela 14 – Aspectos clínicos, anátomo-patológicos, imuno-histoquímicos e genéticos de 31 cães submetidos ao tratamento com inibidores tirosina-quinase nos cenários adjuvante e neoadjuvante.													
ID	Raça	Ida de (me ses)	Estadia mento	Graduação	Índice mitótico	Ki-67	KITr	c-kit status (exon 11)	Tratamento anterior	Tratament o com inibidor tirosina-quinase	Acompanhame nto	Interval o livre de deonça	Sobrevid a global
01	Dachshund	159	I	Grau 3 / Alto grau	26	64,0%	KIT III	ITD	Prednisona	Adjuvante (M)	Vivo e sem sinal da doença.	180	180
02	Pinscher	149	III.1	Grau 3 / Alto grau	1	12,8%	KIT III	Nativo	Prednisona, lomustina, clorambucila	Adjuvante (M)	Censurado	260	260
03*	Pinscher	180	II	Grau 2 / Alto grau	3	2,0%	KIT II	Nativo	Prednisona, lomustina, clorambucila	Adjuvante (M)	Eutanásia por progressão da doença	189 †	292 †
04	Poodle	156	III.2	Grau 2 / Alto grau	18	14,1%	KIT II	ITD	Prednisona	Adjuvante (M)	Eutanásia por progressão da doença	198 †	213 †
05	Jack Russel Terrier	111	II	Grau 2 / Alto grau	8	21,0%	KIT II	Nativo	Prednisolona	Adjuvante (M)	Eutanásia por progressão da doença	153 †	267 †
06	Labrador	93	I	Grau 3 / Alto grau	0	6,0%	KIT II	Nativo	Prednisolona	Adjuvante (M)	Censurado	357	357
07	Golden Retriever	136	II	Grau 2 / Alto grau	0	12,0%	KIT II	Nativo	Prednisolona	Adjuvante (M)	Censurado	223	223
08*	Shar-pei	72	III.1	Grau 2 / Alto grau	6	7,0%	KIT I	Nativo	Prednisona, lomustina	Doença mensurável (M) (RC)	Eutanásia por progressão da doença	40 †	133 †
09*	Bulldog Francês	48	III.2	Grau 3 / Alto grau	20	58,0%	KIT III	Nativo	Prednisona, vimblastina	Doença mensurável (T) (RC)	Óbito por progressão da doença	124 †	131 †
10*	SRD	59	III.2	Grau 3 / Alto grau	60	44,7%	KIT II	Nativo	Prednisona, lomustina	Doença mensurável (T) (DP)	Óbito por progressão da doença	-	30 †
11	Bulldog Francês	35	III.2	Grau 3/Alto grau	5	34,0%	KIT III	Nativo	Prednisona, lomustina	Doença mensurável (M) (RP)	Eutanásia por progressão da doença	-	103 †

12*	Schnauzer	158	III.1	Grau 2/Baixo grau	3	42,0%	KIT I	Nativo	Prednisona, lomustina	Doença mensurável (M) (DP)	Eutanásia por progressão da doença	-	49 †
13	SRD	115	III.1	Grau 2/Baixo grau	2	13,0%	KIT I	Nativo	Prednisona, lomustina	Doença mensurável (M) (DE)	Eutanásia por progressão da doença	-	123 †
14*	Cocker Spaniel	133	III.1	Grau 3/Alto grau	2	40,0%	KIT III	Nativo	Prednisona, lomustina	Doença mensurável (T) (DE)	Eutanásia por progressão da doença	-	125 †
15*	Pinshcer	144	III.2	Grau 2/Alto grau	4	25,0%	KIT I	ITD	Prednisona	Doença mensurável (M) (RC)	Óbito por progressão da doença	140	140
16	SRD	123	III.2	Grau 2/Alto grau	3	52,0%	KIT II	ITD	Prednisona, lomustina	Doença mensurável (M) (RC)	Vivo e sem sinal da doença.	120	120
17*	Pinscher	132	III.1	Grau 3/Alto grau	4	13,0%	KIT II	Nativo	Prednisona, lomustina, clorambucila	Doença mensurável (M) (DE)	Vivo e sem sinal da doença.	-	60
18*	SRD	162	III.1	Grau 3/Alto grau	41	21,6%	KIT II	Nativo	Prednisona, lomustina	Doença mensurável (M) (DP)	Eutanásia por progressão da doença	-	47 †
19*	Schnauzer	156	IV	Grau 2/Alto grau	33	60,0%	KIT I	Nativo	Prednisolona, vimblastina	Doença mensurável (T) (DP)	Eutanásia por progressão da doença	-	15 †
20	Schnauzer	144	III.2	Grau 2/Baixo grau	1	35,0%	KIT I	ITD	Prednisona, lomustina	Doença mensurável (M) (DP)	Eutanásia por progressão da doença	-	12 †
21*	Pinscher	120	III.2	Grau 2/Baixo grau	4	40,0%	KIT II	ITD	Prednisona, lomustina, clorambucila	Doença mensurável (M) (DP)	Eutanásia por progressão da doença	-	42 †
22	Shar-pei	120	III.1	Grau 3/Alto grau	44	91,2%	KIT II	Nativo	Prednisolona, lomustina, vimblastina	Neoadjuvante (M) (RC)	Eutanásia por progressão da doença	400 †	427 †
23*	Jack Russel Terrier	140	III.2	Grau 3/Alto grau	15	19,8%	KIT II	ITD	Prednisolona, vimblastina	Doença mensurável (M) (RP)	Eutanásia por progressão da doença	-	57 †

24*	Labrador	48	II	Grau 2/Baixo grau	2	5,6%	KIT II	Nativo	Prednisolona	Doença mensurável (M) (DE)	Eutanásia por progressão da doença	-	161 †
25*	Boxer	60	II	Grau 2/Alto grau	2	20,0%	KIT II	Nativo	Prednisolona	Doença mensurável (M) (RP)	Eutanásia por progressão da doença	-	101 †
26*	Labrador	117	II	Grau 2/Baixo grau	2	6,0%	KIT II	Nativo	Prednisolona	Doença mensurável (M) (RP)	Eutanásia por progressão da doença	-	66 †
27*	Dogue de Bordeaux	29	II	Grau 3/Alto grau	28	40,0%	KIT III	ITD	Prednisolona	Doença mensurável (M) (RC)	Óbito por progressão da doença	114 †	203 †
28*	Greyhound	132	II	Grau 3/Alto grau	4	40,9%	KIT II	Nativo	Prednisolona	Doença mensurável (M) (RC)	Eutanásia por progressão da doença	52 †	160 †
29*	Border Collie	145	III.1	Grau 2/Baixo grau	5	12,4%	KIT I	Nativo	Prednisolona	Doença mensurável (M) (DP)	Eutanásia por progressão da doença	-	47 †
30*	Poodle	36	III.1	Grau 2/Alto grau	14	38%	KIT II	Nativo	Prednisololona, vimblastina	Doença mensurável (M) (DP)	Eutanásia por progressão da doença	-	23 †
31a	Labrador	105	III.1	Grau 3/Alto grau	12	8,4%	KIT II	Nativo	-	Doença mensurável (M) (RP)	Eutanásia por progressão da doença	-	288 †
31b			I						Masitinib	Adjuvante (M)		86 †	141 †

Estágios I a IV definidos pela Organização Mundial de Saúde (London e Thamm, 2013), mas com divisão do estágio III em III.1 e III.2 , respectivamente, na ausência ou presença de envolvimento dos linfonodos regionais.

KITr – receptor KIT, sendo KIT I a expressão membranar, KIT II a expressão citoplasmática focal e KIT III a expressão citoplasmática difusa (Kiupel et al., 2004).

ITD – *internal tandem duplication* (duplicação interna em tandem), M – mastinib, T – toceranib, RC – resposta completa, RP – resposta parcial, DE – doença estável, DP – doença progressiva.

* Mastocitoma recorrente, † recorrência tumoral (intervalo livre de doença) ou óbito relacionado ao mastocitoma (sobrevida global).

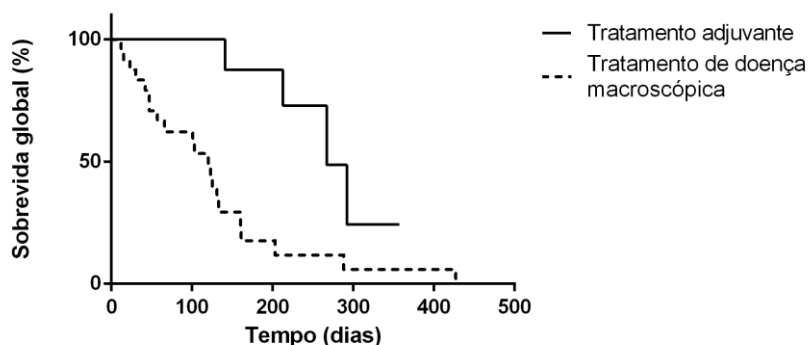


Figura 20 – Representação gráfica da sobrevida para 31 cães com mastocitoma de alto risco, de acordo com o uso de inibidores tirosina-quinase na adjuvância (Md = 267 dias) ou no tratamento de doença macroscópica (Md = 103 dias) ($p = 0,004$).

Dentre os cães que receberam tratamento devido à doença macroscópica, resposta clínica mensurável foi observada em 12/24 pacientes (50%), sendo que cinco apresentaram remissão parcial (20,8%) e sete apresentaram remissão completa (29,2%), conforme demonstrado nas figuras 21 e 22, respectivamente. Doença estável ($n=4$; 16,7%) ou progressiva ($n=8$; 33,3%) foi observada em 12 pacientes (50%).

O ILD, entre os pacientes tratados devido à doença macroscópica, mas que atingiram remissão completa, e àqueles tratados no cenário adjuvante foi de 124 e 198 dias, entretanto, essa diferença não foi significativa.

Ainda no tratamento de doença macroscópica, observou-se diferença na sobrevida global de acordo com a resposta terapêutica inicial (figura 23). Pacientes que obtiveram remissão parcial ou completa, atingiram a mediana com 133 dias, enquanto aqueles que permaneceram com doença estável ou progressiva, atingiram a mediana com apenas 47 dias ($p = 0,003$).

30 pacientes foram submetidos ao tratamento prévio com GCs, antes do início do TKI, e, destes, 18 receberam doses concomitantes de agentes quimioterápicos, com destaque para vimblastina, lomustina e clorambucila. Todos os pacientes tratados com GCs permaneceram com essa medicação durante a terapia multidirecionada com masitinib ou toceranib, mas os agentes quimioterápicos foram suspensos. O uso de quimioterápicos, anterior à implementação da terapia com TKI, não interferiu, estatisticamente, na SG dos pacientes, com uso concomitante de corticosteróides, apesar da mediana ter sido atingida com 203 dias para àqueles que receberam TKIs como primeira linha de tratamento, e 123 dias para os demais ($p = 0,5$).



Figura 21 – Cão da raça Bulldog francês, apresentando metástase de mastocitoma em linfonodo pré-escapular direito (A), com remissão completa após 12 dias de tratamento (B).



Figura 22 – Cão da raça Bulldog Francês apresentando mastocitoma na região do prepúcio (A), com resposta favorável ao mesilato de masitinib, resultando em remissão parcial com 10 dias (B) e 30 dias de tratamento (C). Observar a persistência de nódulos satélites na pele próximo ao prepúcio (C).

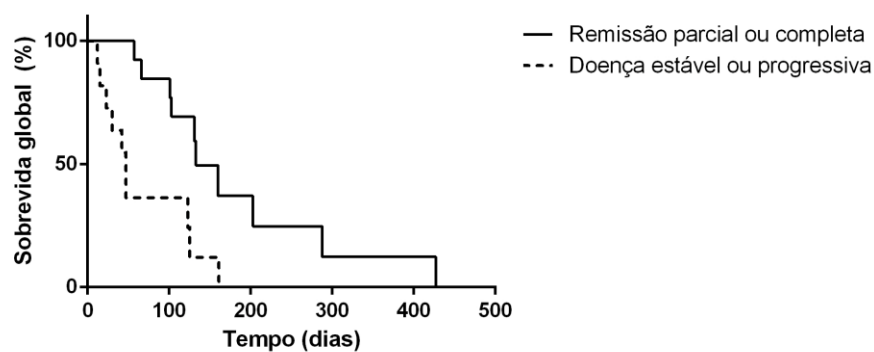


Figura 23 – Representação gráfica da sobrevida para 24 pacientes submetidos ao tratamento com inibidores tirosina-quinase, devido ao diagnóstico de mastocitoma canino, inoperável (doença mensurável) de acordo com a resposta inicial ao tratamento (Md = 133 dias para os que tiveram remissão parcial ou completa e Md = 47 dias para aqueles com doença estável ou progressiva, $p = 0,003$).

No momento da instituição da terapia multidirecionada, 21/31 casos (64,5%) representavam recidivas tumorais, que resultou em prejuízo na sobrevida desses pacientes (figura 24), que atingiram a mediana com 125 dias, enquanto aqueles, com apresentação clínica primária atingiram a mediana com 288 dias ($p = 0,007$).

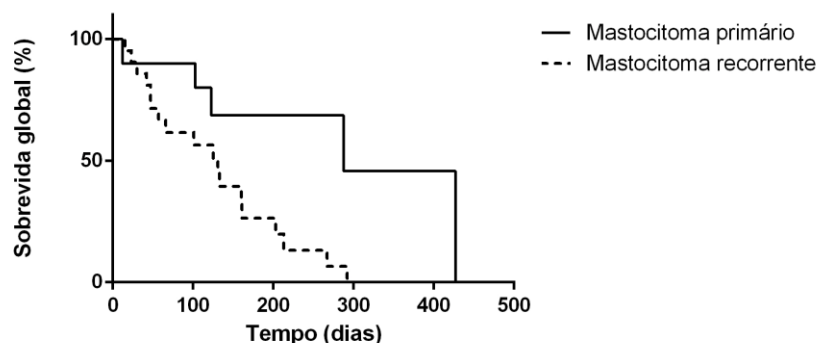


Figura 24 – Representação gráfica da sobrevida para 31 casos de mastocitoma canino submetidos ao tratamento com inibidores tirosina-quinase, considerando o histórico de recorrência tumoral (Md = 288 dias para os tumores de apresentação primária e Md = 125 dias para os tumores recorrentes; $p = 0,007$).

Este estudo incluiu pacientes em diferentes estágios de progressão da doença, conforme preconizado pela OMS, sendo I ($n=2$), II ($n=8$), III ($n=20$) e IV ($n=1$). A maioria dos pacientes encontrava-se no estágio III, sendo que desses, nove apresentaram acometimento simultâneo do linfonodo regional e foram, caracterizados, neste estudo, como III.2. Observou-se uma tendência a significância entre os estágios II e III.2, em que foram obtidas as medianas de 182 e 80 dias, respectivamente ($p = 0,1$) (Figura 25).

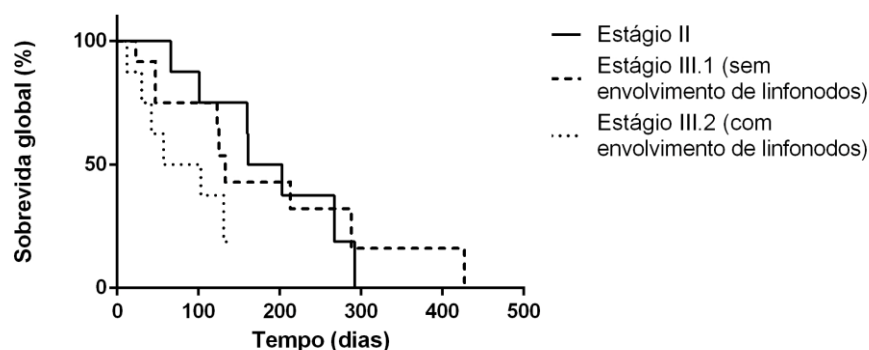


Figura 25 – Representação gráfica da sobrevida para 28 pacientes submetidos ao tratamento do mastocitoma canino com inibidores tirosina-quinase, de acordo com o estadiamento clínico e classificados nos estágios II (Md = 182 dias), III.1 (Md = 125 dias) e III.2 (Md = 80 dias) ($p = 0,1$).

Não foi observada influência da graduação histológica, índice mitótico e percentual de ki-67 na sobrevida global desses pacientes.

Alterações na expressão de KITr foram identificadas em 23/34 (67,7%), sendo 17 com padrão KIT II e seis com padrão KIT III, mas também não houve influência na sobrevida global desses pacientes. Em cães com doença macroscópica ($n = 24$), resposta mensurável foi observada em 28,6% (2/7), 41,2% (7/17) e 50,0% (3/6) nos pacientes cujos tumores apresentaram expressão

de KIT I, II ou III, respectivamente. Duplicações no exon 11 do gene *c-kit* foram identificadas em 7/34 pacientes (20,6%). Destes, cinco receberam tratamento na presença de doença macroscópica e respostas mensuráveis foram observadas em 3/5 (60%). Nos pacientes em que não foram identificadas alterações genéticas, pelo método utilizado, 9/19 (47,4%) tiveram resposta favorável aos TKIs utilizados. Entretanto, não foi observada diferença na sobrevida global, de acordo com o status mutacional do exon 11 do gene *c-kit*.

Efeitos colaterais discretos foram relativamente comuns e incluíram neutropenia leve (20/31; 64,5%), discreta elevação de ALT (3/31; 9,7%) e proteinúria (4/31; 12,9%). Anemia arregenerativa moderada ocorreu em dois pacientes em tratamento com masitinib, sendo que um deles desenvolveu quadro grave, concomitante à trombocitopenia, azotemia moderada e proteinúria grave resultando em hipoalbuminemia/ascite (síndrome nefrótica). O fármaco foi suspenso e a recorrência tumoral ocorreu poucas semanas depois.

Discussão

A utilização de inibidores dos receptores tirosina-quinase representa uma terapia-alvo relevante, no tratamento do mastocitoma canino, tendo em vista a descoberta de alterações na expressão e função de KITr (London et al., 2009; Avery, 2011).

A viabilidade da célula tumoral é dependente da atividade de oncogenes isolados ou em cooperação, tendo em vista a inativação de inúmeras vias celulares, essenciais à manutenção de uma célula normal (Silva, 2010). Esse mecanismo, denominado *oncogene addiction*, é evidenciado pela eficácia dos tratamentos que têm como alvo, o produto de oncogenes específicos, conforme observado neste estudo em 50% dos cães com mastocitoma tratados com TKIs no cenário neoadjuvante, que atua em KITr, mas também em outras proteínas-quinases, com conseqüente remissão parcial ou completa da neoplasia, como relatado por outros autores (Weinstein e Joe, 2008; Smrkovski et al., 2015).

O autor reconhece a reduzida padronização das condutas e procedimentos nos pacientes deste estudo, mas essa dificuldade é comum aos pesquisadores que trabalham com o mastocitoma, devido a ampla variação em seu comportamento biológico e resposta individual desses pacientes frente à doença. Entretanto, o momento da realização da biópsia foi decidido, junto ao responsável pelo animal, considerando o atraso que poderia ser conferido ao início do tratamento, principalmente em pacientes que apresentavam rápida progressão da doença, mas também aspectos financeiros evitando despesas que ultrapassassem o orçamento do responsável pelo animal ou o seguro de vida do paciente.

O reduzido número de animais tratados no cenário adjuvante é resultado da rápida recorrência tumoral após o tratamento cirúrgico em pacientes em estágio avançado de progressão da doença ou com tumores pouco diferenciados. No entanto, a SG dos pacientes tratados com TKIs parece ser superior na adjuvância, o que demonstra melhor ação desses fármacos na presença de mínima doença residual, contrariando a principal indicação pelos fabricantes e os estudos conduzidos por Hahn et al. (2008), com o masitinib e London et al. (2009), com o toceranib. O uso dessas medicações, nesse contexto, deve ser estimulado e melhor investigado, seja como primeira linha ou simultâneo/concomitante à QT (Robat et al., 2012), principalmente em pacientes apresentando duplicações gênicas no exon 11 do gene *c-kit*, mas também naqueles em estadiamento avançado e/ou que apresentam elevado índice mitótico/expressão de ki-67.

Neste estudo, um dos pacientes que recebeu o masitinib na adjuvância, havia sido tratado com esse fármaco na neoadjuvância, pois apresentava um mastocitoma inoperável, desenvolvendo uma remissão parcial em resposta ao TKI. Esse paciente atingiu uma sobrevida global de 288 dias, contados a partir do início do tratamento neoadjuvante com masitinib, considerada superior à mediana obtida para o grupo com doença macroscópica (120 dias), e também para aqueles que apresentaram remissão completa em resposta ao masitinib (138 dias), nesse estudo.

A graduação histológica, índice mitótico e o percentual de Ki-67 não influenciaram na sobrevida global dos pacientes nesse estudo. Naqueles com doença mensurável, a resposta inicial aos TKIs, parece ser determinante para o prognóstico, conforme relatado por Smrvoski et al. (2015), superando também o impacto gerado pelo estadiamento clínico, histórico de recorrência tumoral, padrão imuno-histoquímico de KITr, e até mesmo o status mutacional no exon 11 do gene c-kit. O estadiamento clínico com divisão do estágio III em III.1 (sem envolvimento de linfonodo) e III.2 (com envolvimento de linfonodo) mostrou-se pertinente, com redução da sobrevida do estágio III.2 em relação ao estágio II, e uma tendência a significância. Conforme relatado por London e Thamm (2013), pacientes com mastocitomas múltiplos não necessariamente apresentam envolvimento concomitante dos linfonodos regionais e podem atingir elevada sobrevida global. O histórico de recorrência tumoral, anterior a utilização do TKI, esteve significativamente associado à redução da sobrevida dos pacientes desse estudo. A relevância das recidivas tumorais no prognóstico do mastocitoma canino são reconhecidas nos primeiros estudos conduzidos por Bostock et al. (1973) e Patnaik et al. (1984). Apesar da ausência de significância estatística, nesse estudo, melhores taxas de resposta foram observadas em pacientes com ITD no exon 11 do gene c-kit, considerado preditivo para a resposta aos TKIs nos estudos conduzidos por Isotani et al. (2008), Hahn et al. (2008), London et al. (2009). De forma semelhante, melhores taxas de resposta foram obtidas também nos pacientes com expressão aberrante de KITr, que pode ser também preditiva para a resposta aos TKIs.

Hahn et al. (2008) observaram melhor resposta ao mesilato de masitinib utilizado como primeira linha de tratamento no mastocitoma canino. Essa observação não pôde ser constatada neste estudo, no entanto, foi obtido um tempo de resposta inferior àquele relatado por Hahn et al. (2010) e Smrkovski et al. (2015). Essa diferença pode estar relacionada ao uso concomitante de GCs, podendo favorecer a resistência tumoral aos TKIs, e comprometer a resposta, mesmo quando a terapia multidirecionada foi instituída sem o histórico da utilização de outros agentes antineoplásicos. Os mecanismos de resistência tumoral aos TKIs ainda são pouco conhecidos, mas parecem envolver alterações em genes responsáveis pela síntese de outros domínios das proteínas-alvo, ou desenvolvimento de vias celulares alternativas, conforme relatado por Antonescu et al. (2005) em tumores estromais gastrointestinais humanos tratados com imatinib.

Outro mecanismo de resistência é a superexpressão de transportadores de cassetes de ligação ao ATP (ATP-binding cassette transporters, ABC transporters) (Dohse et al., 2010). Imatinib e dasitinib são TKIs com mecanismos de ação similares ao do masitinib, e são considerados substratos para os transportadores ABC, como a glicoproteína-P (ABCB1) e proteína de resistência do câncer de mama (ABCG2), ambas induzidas por GCs, como demonstrado por Czyzewski e Styczynski (2009), e Dohse et al. (2010). Paralelamente, sunitinib, um TKI similar ao toceranib, demonstrou a propriedade de inibição do ABC (Shukla et al., 2009; Hoffmann et al. 2010). A eficácia do masitinib pode ser reduzida pelo rápido desenvolvimento de resistência pela indução de glicoproteína-P, a partir do tratamento com GCs, o que seria menos provável, para o toceranib. Nesse estudo, apenas quatro cães foram tratados com toceranib em associação

à GCs, para permitir essa conclusão. Novos estudos são necessários para avaliar a existência de benefícios no uso de GCs junto aos tratamentos com masitinib ou toceranib, entretanto, tendo em vista a melhor resposta à utilização dos TKIs como primeira linha de tratamento no mastocitoma canino (Hahn et al., 2008), seu uso deve ser encorajado nos cenários neoadjuvante e, possivelmente na adjuvância, antes da falha de outras terapias. Devido ao resultado desse estudo, recomenda-se a utilização, particularmente do masitinib, sem o uso concomitante de corticosteróides, mas novos estudos são necessários para validar essa hipótese nos cenários adjuvante e neoadjuvante.

Entretanto, o único critério para a escolha dos TKIs como primeira linha no cenário adjuvante, restringe o número de pacientes pela reduzida ocorrência de duplicações no exon 11 do gene *c-kit*, mesmo em lesões de alto grau (Zemke et al., 2002; Webster et al., 2006b). Novas triagens clínicas são necessárias para avaliação da resposta de cães, com mastocitoma, à esses fármacos, na adjuvância, frente aos inúmeros fatores prognósticos propostos na literatura. Nesse contexto, ao se trabalhar com mínima doença residual, hipotetiza-se um menor desenvolvimento de resistência tumoral e até mesmo um sinergismo com outras abordagens terapêuticas.

Masitinib e toceranib são, em geral, bem tolerados por cães, sendo mais comum o desenvolvimento de efeitos colaterais brandos e auto-limitantes. Entretanto, alterações clínico-patológicas devem ser monitoradas, pois casos graves podem ocorrer, a exemplo de anemia arregenerativa e proteinúria moderada a grave, conforme demonstrado nesse estudo e também por Miller et al. (2014).

Conclusões

TKIs são eficazes no tratamento do mastocitoma canino de alto risco, no manejo de doença mensurável, mas também no cenário adjuvante. No tratamento de doença macroscópica, a resposta inicial parece ser determinante para o prognóstico, superando o impacto gerado pelo estadiamento clínico, graduação histológica, índice mitótico, percentual de Ki-67, padrão imuno-histoquímico de KITr, e até mesmo o status mutacional no exon 11 do gene *c-kit*. Respostas parciais, no tratamento de doença macroscópica, podem tornar a neoplasia operável e serem extendidas para a adjuvância, prolongando a sobrevida do paciente. Expressões aberrantes de KITr e a presença de duplicações no exon 11 do gene *c-kit* podem ser preditivas para o uso de terapias multidirecionadas com ação no KITr, no entanto, pacientes que não apresentam esse perfil também podem se beneficiar desses fármacos. O estágio III pode ser dividido em III.1 e III.2, de acordo com o concomitante envolvimento regional de linfonodos regionais e, o estágio III.2 usualmente apresenta pior resposta aos TKIs, em relação aos pacientes no estágio II. O histórico de recorrência tumoral pode agravar ainda mais o prognóstico de pacientes em estadiamento avançado, comprometendo a resposta à terapias multidirecionadas. O uso concomitante de GCs e agentes antineoplásicos podem comprometer a resposta aos TKIs que, sempre que possível, devem ser utilizados como primeira linha no tratamento neoadjuvante de pacientes com mastocitomas inoperáveis. A excelente resposta observada na adjuvância, em pacientes de alto risco, sugere a necessidade de novos estudos nesse contexto.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com o intuito de oferecer um guia para o prognóstico e tratamento do mastocitoma canino, essa tese permitiu a definição da importância de fatores prognósticos clínicos, anátomo-patológicos, imuno-histoquímicos e genéticos (tabela 15), permitindo a classificação dos pacientes quanto ao risco de recorrência ou metástase tumoral. A partir desse estudo, sugere-se uma modificação ao estadiamento clínico, proposto pela OMS, com segregação do estágio III, em III.1 e III.2, conforme a ausência ou presença, respectivamente, de envolvimento dos linfonodos regionais, sendo o estágio III.2, relacionado a um pior prognóstico e resposta aos TKIs.

Um amplo espectro de modalidades terapêuticas encontra-se disponível para o mastocitoma canino, incluindo cirurgia, RT e o uso de quimioterápicos, GCs e TKIs, sendo que a utilização combinada ou multimodal pode favorecer o controle da doença, embora determinadas associações possam favorecer mecanismos de resistência tumoral à múltiplas drogas. A avaliação prognóstica e definição de grupos de risco favorecem a tomada de decisões acerca do tratamento e podem, inclusive, inferir tratamentos específicos, com maior probabilidade de eficácia, a exemplo do uso de TKIs em pacientes com ITD no exon 11 do gene *c-kit*. Apesar dos resultados dessa pesquisa e dos inúmeros estudos publicados, referentes ao mastocitoma canino, muitas questões relacionadas à abordagem clínica e tratamento desses pacientes, permanecem indefinidas, e devem continuar sendo estudados.

O histórico uso dos GCs, no tratamento de doença mensurável, pode favorecer a excisão cirúrgica, e a resposta a essas medicações encontra-se associada a um melhor prognóstico. Entretanto, pode comprometer a resposta aos TKIs, e o benefício da inclusão desses fármacos em protocolos adjuvantes, permanece desconhecido. Pacientes de elevado risco, definitivamente se beneficiam de tratamentos adjuvantes com QT em DMT e/ou TKIs. Entretanto, pode não oferecer nenhuma vantagem à pacientes com risco intermediário. A RT pode oferecer um efetivo e prolongado controle do mastocitoma canino de risco intermediário após a excisão cirúrgica marginal, intencional. Entretanto, a avaliação criteriosa dos linfonodos regionais é fundamental, durante o estadiamento clínico, nos pacientes em que a RT é considerada como única forma de tratamento adjuvante. O uso dos TKIs representa uma eficaz alternativa de tratamento em pacientes em estágio avançado de evolução da doença ou na existência de ITD no exon 11 do gene *c-kit*, no tratamento de doença mensurável, inoperável, mas também no cenário adjuvante. Entretanto, até que os mecanismos de resistência sejam melhor esclarecidos, esses fármacos devem ser utilizados, sem o uso concomitante de GCs, e como primeira linha de tratamento, embora o impacto sob a resistência tumoral, de outras medicações concomitantes ou sequenciais, na adjuvância, possa ser menor.

Tabela 15 – Fatores prognósticos relevantes para o mastocitoma canino.

Aspectos clínicos		Aspectos anátomo-patológicos	
Estadiamento clínico		Graduação histológica pelos sistemas propostos por Patnaik et al. (1984) e Kiupel et al. (2011)	
Histórico de recorrência tumoral		Organização tumoral (cordão x manto)	
Raça		Necrose	
Localização tumoral		Número de células multinucleadas (valor de corte = 9 em 10 campos de maior aumento)	
Resposta aos glicocorticóides		Número de figuras mitóticas (valor de corte = 2 em 10 campos de maior aumento)	
Aspectos imuno-histoquímicos		Aspectos genéticos	
Ki-67		Exon 11 do gene <i>c-kit</i> .	
KITr			

REFERÊNCIAS

- ABREU, A.; KOIFMAN, S. Fatores prognósticos no câncer da mama feminino. *Revista Brasileira de Cancerologia*, v.48, n.1, p.113-131, 2002.
- AL-SARRAF, R.; MAUDLIN, G.N.; PATNAIK, A.K.; MELEO, K.A. A prospective study of radiation therapy for the treatment of grade 2 mast cell tumours in 32 dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v. 10, n. 6, p. 376-378, 1996.
- AMORA, A.; SCHOLAR, E.M. Role of tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy. *Perspectives in Pharmacology*, v. 315, n. 3, p. 971-979, 2005.
- AMORIM, R.L. Imunoistoquímica em oncologia veterinária. In: DALECK, C.R. DE NARDI, A.B.; RODASKIM, S. *Oncologia em cães e gatos*. São Paulo: Roca, 2009. Cap.8, p.135-150.
- ANTONESCU, C.R.; BESMER, P.; GUO, T.; ARKUN, K.; HOM, G.; KORYOTOWSKI, B.; LEVERSHA, M.A.; JEFFREY, P.D.; DESANTIS, D.; SINGER, S.; BRENNAN, M.F.; MAKI, R.G.; DEMATTEO, R.P. Acquired resistance to imatinib in gastrointestinal stromal tumor occurs through secondary gene mutation. *Clinical Cancer Research*, v. 11, n. 11, p. 4182-4190, 2005.
- ARAÚJO, M.R. *Estudo retrospectivo e prospectivo dos tumores cutâneos em cães e diferenciação dos tumores cutâneos de células redondas pela imuno-histoquímica*. 2011. 102p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal), Curso de Pós-graduação em Ciência Animal, Universidade Federal de Minas Gerais, MG
- ARAÚJO, M.R.; PREIS, I.S.; LAVALLE, G.E.; CASSALI, G.D.; ECCO, R. Histomorphological and immunohistochemical characterization of 172 cutaneous round cell tumours in dogs. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 32, n. 8, p. 772-780, 2012.
- ARAÚJO, M.R.; CAMPOS, L.C.; FERREIRA, E.; CASSALI, G.D. Quantitation of the regional lymph node metastatic burden and prognosis in malignant mammary tumors of dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v. 29, p. 1360-1367, 2015.
- AVERY, A.C. Molecular diagnostics of hematologic malignancies in small animals. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice*, v. 42, p. 97-110, 2012.
- BAIN, B.J. Systemic mastocytosis and other mast cell neoplasms. *British Journal of Haematology*, v. 106, p. 9-17, 1999.
- BARRETT, I.D.; PANESAR, N.S.; BIRD, C.C.; ABBOTT, A.C.; BURROW, H.M.; STEEL, C.M. Human lymphoid cell lines and glucocorticoids: II. Whole cell and cytoplasmic binding properties of lymphoblastoid, leukaemia and lymphoma lines. *Diagnostic Histopathology*, v. 4, p. 189-198, 1981.
- BERGMAN, P.J. Paraneoplastic syndromes. In: WITHROW, S.J.; MACEWEN, E.G. *Withrow and MacEwen's small animal clinical oncology*. 5.ed. Philadelphia: Saunders, 2013. Cap. 5, p.83-97.

BERLATO, D.; MURPHY, S.; MONTI, P.; STEWART, J.; NEWTON, J.R.; FLINDALL, A.; MAGLENNON G.A. Comparison of mitotic index and ki67 index in the prognostication of canine cutaneous mast cell tumours. *Veterinary and Comparative Oncology*, v. 13, n.2, p. 143-150, 2015

BLACKWOOD, L.; MURPHY, S.; BURACCO, P.; DE VOS, J.P.; DE FORNEL-THIBAUD, P.; HIRSCHBERGER, J.; KESSLER, M.; PASTOR, J.; PONCE, F.; SAVARY-BATAILLE, K.; ARGYLE, D.J. European consensus document on mast cell tumours in dogs and cats. *Veterinary and Comparative Oncology*, v. 10, n. 3, e1-e29, 2012.

BLOOM F. Effects of cortisone on canine mast cell tumor. *Proceedings of The Society for Experimental Biology and Medicine*, v. 80, p. 651-654, 1952.

BOOKBINDER, P.F.; BUTT, M.T.; HARVEY, H.J. Determination of the number of mast cells in lymph node, bone marrow, and buffy coat cytologic specimens from dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 200, n. 11, p. 1648-1650, 1992.

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

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

BRASILEIRO FILHO, G.; PEREIRA, F.E.L.; GUIMARÃES, R.C. Distúrbios do crescimento e da diferenciação celulares. In: BRASILEIRO FILHO, G. *Bogliolo Patologia Geral*, 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009. Cap. 8, p. 226-281.

BYRNE, S.N.; LIMÓN-FLORES, A.Y.; ULLRICH, S.E. Mast cell migration from the skin to draining lymph nodes upon ultraviolet irradiation represents a key step in the induction of immune suppression. *Journal of Immunology*, v. 180, p. 4648-4655, 2008.

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

CAYATE, S.M.; MCMANUS, P.M.; MILLER Jr. W.H.; SCOTT, D.W. Identification of mast cell in buffy coat preparations from dogs with inflammatory skin diseases. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 206, n. 3, p. 325-326, 1995.

CAMPS-PALAU, M.A.; LEIBMAN, N.F.; ELMSLIE, R.; LANA, S.E.; PLAZA, S.; MCKNIGHT, J.A.; RISBON, R.; BERGMAN, P.J. Treatment of canine mast cell tumours with vinblastine, cyclophosphamide and prednisone: 35 cases (1997-2004), *Veterinary and Comparative Oncology*, v. 5, n. 3, p. 156-167, 2007.

- CHAFFIN, K.; THRALL, D.E. Results of radiation therapy in 19 dogs with cutaneous mast cell tumor and regional lymph node metastasis, *Vet Radiol Ultrasound* 43:392-395, 2002.
- COOPER, M.; TSAI, X.; BENNETT, P. Combination CCNU and vinblastine chemotherapy for canine mast cell tumours: 57 cases, *Veterinary and Comparative Oncology*, v. 7, p. 196-206, 2009.
- COSTA CASAGRANDE, T.A.; DE OLIVEIRA BARROS, L.M.; FUKUMASU, H.; COGLIATI, B.; CHIAVLE, L.M.; DAGLI, M.L.; MATERA, J.M. The value of molecular expression of KIT and KIT ligand analysed using real-time polymerase chain reaction and immunohistochemistry as a prognostic indicator for canine cutaneous mast cell tumours. *Veterinary and Comparative Oncology*, v. 13, n. 1, p. 1-10, 2015.
- COSTA, C.; SOARES, R.; REIS-FILHO, J.S.; LEITÃO, D.; AMENDOEIRA, I.; SCHMITT, F.C. Cyclo-oxygenase-2 expression is associated with angiogenesis and lymph node metastasis in human breast cancer. *Journal of Clinical Pathology*, v.55, p.429-434, 2002.
- COUTO, C.G. Neoplasias específicas em cães e gatos. In: NELSON, R.W.; COUTO, C.G. *Medicina Interna de Pequenos Animais*, 4 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010. Cap. 82, p. 1201-1205.
- CROWE, D.T.; GOODWIN, M.A.; GREENE, C.E. Total laryngectomy for laryngeal mast cell tumor in a dog. *Journal of the American Animal Hospital Association*, v. 22, p. 809-816, 1986.
- CURY, A.; JEZIORSKA, M.; WOOLLEY, D.E. Evidence for in vivo mitosis by granule-containing mast cells from canine mastocytomas. *Virchows Archive*, v. 433, p. 465-470, 1998.
- CZYZEWSKI, K.; STYCZYNSKI, J. Imatinib is a substrate for various multidrug resistance proteins. *Neoplasma*, v. 56, n. 3, p. 202-207, 2009.
- DALECK, C.R.; ROCHA, N.S.; FURLANI, J.M.; CESAR, J.R.F. Mastocitoma. In: DALECK, C.R.; NARDI, A.B.; RODASKI, S. *Oncologia em cães e gatos*. São Paulo: Roca, 2009. Cap. 16, p. 282-292.
- DAVIES, A.P.; HAYDEN, D.W.; KLAUSNER, J.S.; PERMAN, V. Noncutaneous systemic mastocytosis and mast cell leukemia in a dog: case report and literature review. *Journal of the American Animal Hospital Association*. v.17, n. 3, p. 361-368, 1981.
- DAVIES, D.R.; WYATT, K.; JARDINE, J.E.; ROBERTSON, I.D.; IRWIN, P.J. Vinblastine and prednisolone as adjunctive therapy for canine cutaneous mast cell tumors. *Journal of the American Animal Hospital Association*, v. 40, n. 2, p. 124-130, 2004.
- DAVIS, B.J.; PAGE, R.; SANNES, P.L.; MEUTEN, D.J. Cutaneous mastocytosis in a dog. *Veterinary Pathology*, v. 29, p. 363-365, 1992.
- DEMETRIOU, J.L.; BEARLEY, M.J.; CONSTANTINO-CASAS, F.; ADDINGTON, C.; DOBSON, J. Intentional marginal excision of canine limb soft tissue sarcomas followed by radiotherapy. *Journal of Small Animal Practice*, v. 53, p. 174-181, 2012.

DE NARDI, A.B.; RODASKI, S.; SOUSA, R.S.; COSTA, T.A.; MACEDO, T.R.; RODIGHERI, S.M.; RIOS, A.; PIEKARZ, C.H. Prevalência de neoplasias e modalidades de tratamento em cães, atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal do Paraná. *Archives of Veterinary Science*, v. 7, n. 2, p. 15-26, 2002.

DIN, O.S.; WOLL, P.J. Treatment of gastrointestinal stromal tumor: focus on imatinib mesylate. *Therapeutics and Clinical Risk Management*, v. 4, n. 1, p. 149-162, 2008.

DOBSON, J. M.; SAMUEL, S.; MILSTEIN, H.; ROGERS, K.; WOOD, J. L. Canine neoplasia in the UK: estimates of incidence rates from a population of insured dogs. *Journal of Small Animal Practice*, v. 43, p. 240-246, 2002.

DOBSON, J.; COHEN, S.; GOULD, S. Treatment of canine mast cell tumours with prednisolone and radiotherapy. *Veterinary and Comparative Oncology*, v. 2, n. 3, p. 132-141, 2004.

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

DOHSE, M.; SCHARENBERG, C.; SHUKLA, S.; ROBEY, R.W.; VOLKMANN, T.; DEEKEN, J.F.; BRENDDEL, C.; AMBUDKAR, S.V.; NEUBAUER, A.; BATES, S.E. Comparison of ATP-binding cassette transporter interactions with the tyrosine kinase inhibitors imatinib, nilotinib, and dasatinib. *Drug Metabolism and Disposition*, v. 38, n. 8, p. 1371-1380, 2010.

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, n. 12, p. 1718-1723, 2002.

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

FAN, T.M.; DE LORIMIER, L.P. Treatment options for canine cutaneous mast cell tumours. *Veterinary Medicine*, v. 100, p.272, 2005.

FELDMAN, B.F.; KANEKO, J.J.; FARVER, T.B. Anemia of inflammatory disease in the dog: clinical characterization. *American Journal of Veterinary Research*, v. 42, p. 1109-1113, 1981.

FERNANDEZ, N.J.; WEST, K.H.; JACKSON, M.L.; KIDNEY, B.A. Immunohistochemical and histochemical stains for differentiating canine cutaneous round cell tumors. *Veterinary Pathology*, v. 42, n. 4, p. 437-445, 2005.

FOX, L.E. Mast cell tumors. In: MORRISON, W.B. *Cancer in dogs and cats: medical and surgical management*, 1 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1998. Cap. 30, p. 479-488.

FULCHER, R.P.; LUDWIG, L.L.; BERGMAN, P.J.; NEWMAN, S.J.; SIMPSON, A.M.; PATNAIK, AK. 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. 228, n. 2, p. 210-215, 2006.

FRIEDRICHS, K.R.; YOUNG, K.M. Diagnostic cytopathology in clinical oncology. In: WITHROW, S.J.; MACEWEN, E.G. *Withrow and MacEwen's small animal clinical oncology*. 5.ed. Philadelphia: Saunders, 2013. Cap. 7, p.111-130.

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

GALLI, S.J.; NAKAE, S.; TSAI, M. Mast cells in the development of adaptative immune responses. *Nature Immunology*, v. 6, p. 135-142, 2005.

GERRITSEN, R.J.; TESKE, E.; KRAUS, J.S.; RUTTEMAN, G.R. Multiagent chemotherapy for mast cell tumours in the dog. *Veterinary Quarterly*, v.20, n. 1, p. 28-31, 1998.

GIANTIN, M.; VASCELLARI, M.; MORELLO, E.M.; CAPELLO, K.; VERCELLI, A.; GRANATO, A.; LOPPARELLI, R.M.; NASSUATO, C.; CARMINATO, A.; MARTANO, M.; MULTINELLI, 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.

GIANTIN, M.; ARESU, L.; ARICÒ, A.; GELAIN, M.E.; RIONDATO, F.; COMAZZI, S.; DACASTO, M. Evaluation of tyrosine-kinase receptor c-kit mutations, mRNA and protein expression in canine lymphoma: Might c-kit represent a therapeutic target? *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 154, p. 153-159, 2013.

GIANTIN, M.; GRANATO, A.; BARATTO, C.; MARCONATO, L.; VASCELLARI, M.; MORELLO, E.M.; VERCELLI, A.; MUTINELLI, F.; DACASTO, M. Global gene expression analysis of canine cutaneous mast cell tumor: could molecular profiling be useful for subtype classification and prognostication? *Plos One*, v. 9, n. 4, e95481, 2014.

GIL DA COSTA, R. M. C-kit as a prognostic and therapeutic marker in canine cutaneous mast cell tumours: from laboratory to clinic. *The Veterinary Journal*, v. 205, p. 5-10, 2015.

GIULIANO, A.; HORTA, R.S.; HOATHER, T.; COSTANTINO-CASAS, F.; DOBSON, J.M. Expression of fibroblast activating protein (FAP) in tumour associated fibroblasts (TAF) of canine mast cell tumours and correlation with tumour grade and mitotic index. *Proceedings of the European Society of Veterinary Oncology Annual Congress*, p. 34, 2015.

GRIER, R.L.; DIGUARDO, G.; SCHAFFER, C.B.; PEDROSA, B.; MYERS, R.; MERKLEY, D.F.; THOUVENELLE, M. Mast cell tumor destruction by deionized water. *American Journal of Veterinary Research*, v. 51, n. 7, p. 1116-1120, 1990.

GRIER, R.L.; DIGUARDO, G.; MYERS, R.; MERKLEY, D.F. Mast cell tumour destruction in dogs by hypotonic solution. *Journal of Small Animal Practice*, v. 36, n. 9, p. 385-388, 1995.

GROSS, T.L.; IHRKE, P.J.; WALDER, E.J.; AFFOLTER, V.K. Mast Cell Tumour. In: *Skin Diseases of the Dog and Cat. Clinical and Histopathological Diagnosis*, Second Ed. Blackwell Publishing Company, Oxford, UK, 2015. Cap. 36, p. 853-866.

GUSTAFON, D.L.; PAGE, R.L. Cancer chemotherapy. In: WITHROW, S.J.; VAIL, D.M.; PAGE, R.L. *Withrow and MacEwen's small animal clinical oncology*. 5.ed. Philadelphia: Saunders, 2013. Cap. 11, p.157-179.

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

HAHN, K.A.; LEGENDRE, A.M.; SHAW, N.G.; PHILLIPS, B.; OGILVIE, G.K.; PRESCOTT, D.M.; ATWATER, S.W.; CARRERAS, J.K.; LANA, S.E.; LADUE, T.; RUSK, A.; KINET, J.P.; DUBREUIL, P.; MOUSSY, A.; HERMINE, O. Evaluation of 12- and 24-month survival rates after treatment with masitinib in dogs with nonresectable mast cell tumors. *American Journal of Veterinary Research*, v. 71, n. 11, p. 1354-1361, 2010.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, v. 144, p. 646-674, 2011.

HARVEY, H.J.; SYKES, G. Tracheal mast cell tumor in a dog. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 180, p. 1097-1100, 1982.

HAUCK, M.L. Tumors of the skin and subcutaneous tissues.. In: WITHROW, S.J.; VAIL, D.M.; PAGE, R.L. *Withrow and MacEwen's small animal clinical oncology*. 5.ed. Philadelphia: Saunders, 2013. Cap. 18, p.305-320.

HILLMAN, L.A.; GARRETT, L.D.; DE LORIMIER, L.P.; CHARNEY, S.C.; BORST, L.B.; FAN, T.M. Biological behavior of oral and perioral mast cell tumors in dogs: 44 cases (1996-2006), *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 237, n. 8, p. 936-942, 2010.

HOCHEGGER, K.F.; SIEBENHAAR, V.; VIELHAUER, D.; HEININGER, D.; MAYADAS, T.N.; MAYER, G.; MAURER, M.; ROSENKRANZ, A.R. Role of mast cells in experimental anti-glomerular basement membrane glomerulonephritis. *European Journal of Immunology*, v. 35, n. 10, p. 3074-3082, 2005.

HOFFMANN, K.; FRANZ, C.; XIAO, Z.; MOHR, E.; SERBA, S.; BUECHLER, M.W.; SCHEMMER, P. Sorafenib modulates the gene expression of multi-drug resistance mediating ATP-binding cassette proteins in experimental hepatocellular carcinoma. *Anticancer Research*, v. 30, n. 11, p. 4503-4508, 2010.

HORTA, R.S.; COSTA, M.P.; LAVALLE, G.E.; ARAÚJO, R.B.; CASSALI, G.D. Fatores prognósticos e preditivos dos tumores caninos definidos com auxílio da imuno-histoquímica. *Ciência Rural*, v. 42, n. 6, p. 1033-1039, 2012.

- HORTA, R.S.; VALENTE, P.C.L.G.; CAXITO, L.M.; COSTA, M.P.; CARNEIRO, R.A.; LEME, F.O.P.; PAES, P.R.O. Estudo retrospectivo (2009-2012) de 388 exames de tecidos hematopoiéticos (linfonodo, baço e medula óssea) de cães. *Clínica Veterinária (São Paulo)*, v. 102, n. 1, p. 60-68, 2013.
- HUME C.T.; KIUPEL, M.; RIGATTI, L.; SHOFR, F.S.; SKORUPSKI, K.A.; SORENMO, K.U. Outcomes of dogs with grade 3 mast cell tumors: 43 cases (1997-2007), *Journal of the American Animal Hospital Association*, v. 47, n. 1, p. 37-44, 2011.
- ISOTANI, M.; ISHIDA, N.; TOMINAGA, M.; TAMURA, K.; YAGIHARA, H.; OCHI, S.; KATO, R.; KOBAYASHI, T.; FUJITA, M.; FUJINO, Y.; SETOGUCHI, A.; ONO, K.; WASHIZU, T.; BONKOBARA, M. Effect of tyrosine kinase inhibition by imatinib mesylate on mast cell tumors in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v. 22, n. 4, p. 985-988, 2008.
- JAFFE, M.H.; HOSGOOD, G.; KERWIN, S.C.; HEDLUND, C.S.; TAYLOR, H. W. Deionised water as an adjunct for the treatment of canine cutaneous mast cell tumours. *Journal of Small Animal Practice*, v. 41, p. 7-11, 2000.
- 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. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 16, p. 95-100, 2004.
- KILLICK, D.R.; ROWLAND, A.M.; BURROW, R.D.; CRIPPS, P.; MILLER, J.; GRAHAM, P.; BLACKWOOD, L. Mast cell tumour and cutaneous histiocytoma excision wound healing in general practice. *Journal of Small Animal Practice*, v. 52, p. 469-475, 2011.
- KIRSHENBAUM, A.S.; KESSLER, S.W.; GOFF, J.P.; METCALFE, D.D. Demonstration of the origin of human mast cells from CD34+ bone marrow progenitor cells. *The Journal of Immunology*, v. 146, n. 5, p.1410-1415, 1991.
- KIUPEL, M.; WEBSTER, J.D.; KANEENE, J.B.; MILLER, R.; YUZBASIYAN-GURKAN, V. The use of KIT and Tryptase expression patterns as prognostic tools for canine cutaneous mast cell tumors. *Veterinary Pathology*, v. 41, n. 4, p. 371-377, 2004.
- KIUPEL, M.; WEBSTER, J.D.; BAILEY, K.L.; BEST, S.; DELAY, J.; DETRISAC, C.J.; FITZGERALD, S.D.; GAMBLE, D.; GINN, P.E.; GOLDSCHMIDT, M.H.; HENDRICK, M.J.; HOWERTH, E.W.; JANOVIK, 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.; W SNYDER, P.; SOUTHOORN, E.; STEDMAN, N.L.; STEFICEK, B.A.; STROMBERG, P.C.; VALLI, V.E.; WEISBRODE, S.E.; YAGER, J.; HELLER, J.; MILLER, R. Proposal of 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.
- KOJIKI, S.; SUGITA, K.; INUKAI, T.; SAITO, M.; LIJIMA, K.; TEZUKA, T.; GOI, K.; SHIRAISHI, K.; MORI, T.; OKAZAKI, T.; KAGAMI, K.; OHYAMA, K.; NAKAZAWA, S. Mechanisms of glucocorticoid resistance in human leukemic cells: implication of abnormal 90 and 70 kDa heat shock proteins. *Leukemia*, v. 10, p. 994-999, 1996.

KRICK, E.L.; BILLINGS, A.P.; SHOFER, F.S.; WATANABE, S.; SORENMO, K.U. Cytological lymph node evaluation in dogs with mast cell tumours: association with grade and survival. *Veterinary and Comparative Oncology*, v. 7, n. 2, p. 130-138, 2009.

LARUE, S.; GORDON, I.K. Radiation Therapy. In: WITHROW, S.J.; VAIL, D.M.; PAGE, R.L. *Withrow and MacEwen's small animal clinical oncology*. 5.ed. Philadelphia: Saunders, 2013. Cap. 12, p.180-197.

LAVALLE, G.E. Tratamento clínico e cirúrgico de mastocitoma em cães. 2001. 51f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Curso de Pós-graduação em Ciência Animal, Universidade Federal de Minas Gerais, MG.

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

LEACH, T.N.; CHILDRESS, M.O.; GREENE, S.N.; MOHAMED, A.S.; MOORE, G.E.; SCHREMPF, D.R.; LAHRMAN, S.R.; KNAPP, D.W. Prospective trial of metronomic chlorambucil chemotherapy in dogs with naturally occurring cancer. *Veterinary and Comparative Oncology*, v. 10, n. 2, p. 102-112, 2012.

LEIBMAN, N.F.; LANA, S.E.; HANSEN, R.A.; POWERS, B.E.; FETTMAN, M.J.; WITHROW, S.J.; OGILVIE, G.K. Identification of matrix metalloproteinases in canine cutaneous mast cell tumors. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v. 14, n. 6, p. 583-586, 2000.

LEJEUNE, A.; SKORUPSKI, K.; FRAZIER, S.; VANHAEZEBROUCK, I.; REBHUN, R.B.; REILLY, C.M.; RODRIGUEZ Jr. C.O. Aggressive local therapy combined with systemic chemotherapy provides long-term control in grade II stage II canine mast cell tumour: 21 cases (1999-2012). *Veterinary and Comparative Oncology*, v. 13, n. 3, p. 267-280, 2015.

LEMARIE, R.J.; LEMARIE, S.L. ; HEDLUND, C.S. Mast Cell tumours: Clinical management. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian*, v. 17, p. 1085-1099, 1995.

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

LINDER, J. Immunohistochemistry in surgical pathology. The case of the undifferentiated malignant neoplasm. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, v.10, n.1, p.59-76, 1990.

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

LONDON, C.A. Tyrosine kinase inhibitors in Veterinary Medicine. *Topics in Companion Animal Medicine*, v. 24, n. 3. p. 106-112, 2009.

LONDON, C.A.; MALPAS, P.B.; WOOD-FOLLIS, S.L.; BOUCHER, J.F.; RUSK, A.W.; ROUSENBERG, M.P.; HENRY, C.J.; MITCHENER, K.L.; KLEIN, M.K.; HINTERMEISTER, J.G.; BERGMAN, P.J.; COUTO, G.C.; MAULDIN, G.N.; MICHELS, G.M. Multi-center, placebo-controlled, double-blind, randomized study of oral toceranib phosphate (SU11654), a receptor tyrosine kinase inhibitor, for the treatment of dogs with recurrent (either local or distant) mast cell tumor following surgical excision. *Clinical Cancer Research*, v. 15, n. 11, p. 3856-3865, 2009.

LONDON C. Mast cell cancer. In: WEISS, D.J.; WARDROP, K.J. *Scham's Veterinary Hematology*. 6. ed. Iowa: Blackwell, 2010. Cap. 68, p. 483-490.

LONDON, C.A. Signal transduction and cancer. In: WITHROW, S.J.; VAIL, D.M.; PAGE, R.L. *Withrow and MacEwen's small animal clinical oncology*. 5.ed. Philadelphia: Saunders, 2013. Cap. 14, section B, p.221-229.

LONDON, C.A.; THAMM, D.H. Mast cell tumors. In: WITHROW, S.J.; VAIL, D.M.; PAGE, R.L. *Withrow and MacEwen's small animal clinical oncology*. 5.ed. Philadelphia: Saunders, 2013. Cap. 20, p.335-355.

LUND ,J.E.; PARK, J.F. Focal mastocytosis in lymph nodes from a Beagle dog. *Veterinary Pathology*, v. 15, p. 64-67, 1978.

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

MANGIERI, J. Síndromes paraneoplásicas. In: DALECK, C.R.; DE NARDI, A.B.; RODASKI, S. *Oncologia em cães e gatos*. São Paulo: Roca, 2009, cap. 14, p. 237-252.

MARECH, I.; PATRUNO, R.; ZIZZO, N.; GADALETA, C.; INTRONA, M.; ZITO, A.F.; GADALETA, C.D.; RANIERI, G. Masitinib (AB1010), from canine tumor model to human clinical development: where we are? *Critical Reviews in Oncology and Hematology*, v. 91, n. 1, p. 98-111, 2014.

MCCAW, D.L.; MILLER, M.A.; OGILVIE, G.K. Response of canine mast cell tumours to treatment with oral prednisolone. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v. 8, p. 406-408, 1994.

MCCAW, D.L.; MILLER, M.A.; BERGMAN, P.J. Vincristine therapy for mast cell tumours in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v. 11, p. 375-378, 1997.

MCNIEL E.A.; PRINK, A.L.; O'BRIEN, T.D. Evaluation of risk and clinical outcome of mast cell tumours in pug dogs, *Veterinary and Comparative Oncology*, v. 4, p.2-8, 2004.

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

MILLER, A.B.; HOOGSTRATEN, B.; STAQUET, M.; WINKLER A. Reporting results of cancer treatment. *Cancer*, v.. 47, n. 1, p. 207-214, 1981.

MILLER, A.G.; MORLEY, P.S.; RAO, S.; AVERY, A.C.; LANA, S.E.; OLVER, C.S. Anemia is associated with decreased survival time in dogs with lymphoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v. 23, n. 1, p. 116-122, 2009.

MILLER, R.L.; VAN LELYVELD, S.; WARLAND, J.; DOBSON, J.M.; FOALE, R.D. A retrospective review of treatment and response of high-risk mast cell tumours in dogs. *Veterinary and Comparative Oncology*, p. 1-10, 2014.

MOORE, L.E.; GARRET, L.D.; DEBEY, B. ; BILLER, D.S. Spinal mast cell tumor in a dog. *Journal of the American Animal Hospital Association*, v.38, n.1, p. 67-70, 2002.

MURPHY, S.; SPARKES, A. H.; BLUNDEN, A. S.; BREARLEY, M. J.; SMITH, K. C. Effects of stage and number of tumours on prognosis of dogs with cutaneous MCTs. *Veterinary Record*, v. 158, n. 9, p. 287-291, 2006.

MUTSAERS, A.J. Antiangiogenic and metronomic therapy. In: WITHROW, S.J.; MACEWEN, E.G. *Withrow and MacEwen's small animal clinical oncology*. 5.ed. Philadelphia: Saunders, 2013. Cap. 14, section C, p.229-237.

NEYENS, I.J.S.; KIRPENSTEIJN, J.; GRINWIS, G.C.M.; TESKE, E. Pilot study of intraregional deionised water adjunct therapy for mast cell tumours in dogs. *Veterinary Record*, v. 154, n. 3, p. 90-91, 2004.

NEWMAN, S.J.; JANKOVSKY, J.M.; ROHRBACH, B.W.; LEBLANC, A.K. C-kit expression in canine mucosal melanomas. *Veterinary Pathology*, v. 49, n. 5, p. 760-765, 2011.

NORTH, S.; BANKS, T. Mast cell tumours. In: NORTH, S., BANKS, T. *Introduction to Small Animal Oncology*, 1.ed. United Kingdom: Saunders, 2009. Cap. 19, p.183-196.

OBIRI, D.D.; FLINK, N.; MAIER, J.V.; NEEB, A.; MADDALO, D.; THIELE, W.; MENON, A.; STASSEN, M.; KULKARNI, R.A.; GARABEDIAN, M.J.; BARRIOS, A.M.; CATO, A.C. PEST-domainenriched tyrosine phosphatase and glucocorticoids as regulators of anaphylaxis in mice. *Allergy*, v. 67, p. 175–182, 2012.

O'CONNELL, K.; THOMSON; M. Evaluation of prognostic indicators in dogs with multiple, simultaneously occurring cutaneous mast cell tumours, 63 cases. *Veterinary and Comparative Oncology*, v. 11, p. 51–62, 2011.

OGILVIE, G.K.; HENSEL, P.; KITCHELL, B.E.; DUBREUIL, P.; AHN, A. Masitinib – a targeted therapy with applications in veterinary oncology and inflammatory diseases. *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutritional and Natural Resources*, v. 6, n. 21, p. 1-11, 2011.

O'KEEFE, D.A.; COUTO, C.G.; BURKE-SCHWARTZ, C.; JACOBS, R.M. Systemic mastocytosis in 16 dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v. 1, p. 75-80, 1987.

- O'KEEFE, D.A. Canine mast cell tumours. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, v. 20, n. 4, p. 1105-1115, 1990.
- OPPONG, E.; FLINK, N.; CATO, A.C. Molecular mechanisms of glucocorticoid action in mast cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 380, p. 119-126, 2013.
- OWEN, L.A. TNM classification of tumours in domestic animals. *World Health Organization*, 1980, 53p.
- OZAKI, K.; YAMAGAMI, T.; NOMURA, K.; NARAMA, I. Mast cell tumors of the gastrointestinal tract in 39 dogs. *Veterinary Pathology*, v. 39, n. 5, p. 557-564, 2002.
- PAGE, C.; FOREMAN, J.C. Introduction to mast cells and basophilis. *Immunopharmacology of Mast Cells and Basophilis*. Oxford: Academic Press, 1993, p. 1-4.
- PATNAIK, A.K.; MACEWEN, E.G.; BLACK, A.P.; LUCKOW, S. Extracutaneous mast-cell tumor in the dog. *Veterinary Pathology*, v. 19, n. 6, p.608-615, 1982.
- PATNAIK, A.K.; EHLE, W.J.; MACEWEN E.G. Canine cutaneous mast cell tumor: morphologic grading and survival time in 83 dogs. *Veterinary. Pathology*, v. 21, p. 268-274, 1984.
- PAWSON, T. Regulation and targets of receptor tyrosine kinases. *European Journal of Cancer*, v. 38, n. 5, p. 3-10, 2002.
- PEROU, C.M.; SORLIE, T.; EISEN, M.B.; VAN DE RIJN, M.; JEFFREY, S.S.; REES, C.A.; POLLACK, J.R.; ROSS, D.T.; JOHNSEN, H.; AKSLIN, L.A.; FLUGE, O.; PERGAMENSHIKOV, A.; WILLIAMS, C.; ZHU, S.X.; LONNING, P.E.; BORRESEN-DALE, A.L.; BROWN, P.O.; BOTSTEIN, D. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, v. 406, p. 747-752, 2000
- PETERSON, S.L. Scar-associated canine mast cell tumor, *Canine Practice*, v. 12, p. 23-29, 1985.
- POIRIER, V.J.; ADAMS, W.M.; FORREST, L.J.; GREEN, E.M.; VAIL, D.M. Radiation therapy for incompletely excised grade II canine mast cell tumors. *Journal of the American Animal Hospital Association*, v. 42, p. 430-434, 2006.
- PRADA, J.; QUEIROGA, F.L.; GREFÓRIO, H.; PIRES, I. Evaluation of cyclooxygenase-2 expression in canine mast cell tumours. *Journal of Comparative Pathology*, v. 147, n. 1, p. 31-36, 2012.
- RASSNICK, K.M.; MOORE, A.S.; WILLIAMS, L.E.; LONDON, C.A.; KINTZER, P.P.; ENGLER, S.J.; COTTER, S.M. Treatment of canine mast cell tumors with CCNU (lomustine), *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v. 13, p. 601-605, 1999.

RASSNICK, K.M.; AL-SARRAF, R.; BAILEY, D.B.; CHRETIN, J.D.; PHILLIPS, B.; ZWHALEN, C.H. Phase II open-label study of single-agent hydroxyurea for treatment of mast cell tumours in dogs. *Veterinary and Comparative Oncology*, v. 8, n. 2, p. 103-111, 2010.

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

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

ROGERS, S.K. Mast cell tumors. *Veterinary Clinics of North American: Small Animal Practice*, v. 6, n. 1, p. 87-101, 1996.

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

ROSENAU, W.; BAXTER, J.D.; ROUSSEAU, G.G.; TOMKINS, G.M. Mechanism of resistance to steroids: glucocorticoid receptor defect in lymphoma cells. *Nature New Biology*, v. 237, p. 20-24, 1972.

ROSKOSKI JR., R. Structure and regulation of Kit protein-tyrosine-kinase – The stem cell factor receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 338, p. 1307-1315, 2005.

ROZANSKI, E. Steroid therapy. *Clinician's Brief*, p. 80-82, 2010.

SBATTINI, S.; SCARPA, F.; BERLATO, D.; BETTINI, G. Histologic grading of canine mast cell tumor: is 2 better than 3? *Veterinary Pathology*, v. 52, n. 1, p. 70-73, 2015.

SCASE, T.J.; EDWARDS, D.; MILLER, J.; HENLEY, W.; SMITH, K.; BLUNDEN, A.; MURPHY, S. Canine mast cell tumors: correlation of apoptosis and proliferation markers with prognosis. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v. 20, n. 1, p. 151-158, 2006.

SCHLOSSMACHER, G.; STEVENS, A.; WHITE, A. Glucocorticoid receptor-mediated apoptosis: mechanisms of resistance in cancer cells. *Journal of Endocrinology*, v. 211, p. 17-25, 2011.

SCHMIDT, S.; RAINER, J., PLONER, C.; PRESUL, E.; RIML, S.; KOFLER, R. Glucocorticoid-induced apoptosis and glucocorticoid resistance: molecular mechanisms and clinical relevance. *Cell Death and Differentiation*, v. 11, p. 45-55, 2004.

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

SHUKLA, S.; ROBEY, R.W.; BATES, S.E.; AMBUDKAR, S.V. Sunitinib (Sutent, SU11248), a small-molecule receptor tyrosine kinase inhibitor, blocks function of the ATP-binding cassette (ABC) transporters P-glycoprotein (ABCB1) and ABCG2. *Drug Metabolism and Disposition*, v. 37, n. 2, p. 359-365, 2009.

SILVA, R.L.A. Oncogenes e genes supressores de tumor. In: FERREIRA, C.G.; ROCHA, J.C.C. *Oncologia molecular*. 2.ed. São Paulo: Atheneu, 2010. Cap. 4, p. 43- 59.

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

SLEIJFER, S.; WIEMAR, E.; VERWEIJ, J. Drug insight: gastrointestinal stromal tumors (GIST) – the solid tumor model for cancer-specific treatment. *Nature Clinical Practice*, v. 5, n. 2, p.102-111, 2008.

SMITH, J.; KIUPEL, M.; FARRELLY, J.; COHEN, R.; OLMSTED, G.; KIRPENSTEIJN, J.; BROCKS, B.; POST, G. Recurrence rates and clinical outcome for dogs with grade II mast cell tumours with a low AgNOR count and Ki67 index treated with surgery alone. *Veterinary and Comparative Oncology*, 2015, p. 1-10.

SMRKOVSKI, O.A.; ESSICK, L.; ROHRBACH, B.W.; LEGENDRE, A.M. Masitinib mesylate for metastatic and non-resectable canine cutaneous mast cell tumours. *Veterinary and Comparative Oncology*, v. 13, n. 3, p. 314-321, 2015.

SOUZA, P.C.; OCARINO, N.M.; TAVARES, W.L.F.; BOELONI, J.N.; CASSALI, G.D.; SERAKIDES, R. Association of nucleolar organizing regions and Ki-67 expression with recurrence rate of hair follicle tumor in dog. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 60, n. 5, p. 1075-1083, 2008.

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

STEFFEY, M.; RASSNICK, K.M; PORTER, B.; NJAA, B.L. Ureteral mast cell tumor in a dog. *Journal of the American Animal Hospital Association*, v. 40, n. 1, p. 82-85, 2004.

STEIN, T.J.; PELLIN, M.; STEINBERG, H.; CHUN, R. Treatment of feline gastrointestinal small-cell lymphoma with clorambucil and glucocorticoids, *Journal of the American Animal Hospital Association*, v. 46, n. 6, p. 413–417, 2010.

STOCKHAM, S.L.; BASEL, D.L.; SCHMIDT, D.A. Mastocytemia in dogs with acute inflammatory diseases. *Veterinary Clinical Pathology*, v. 15, n. 1, p. 16-21, 1983.

STREFEZZI, R.F.; KLEEB, S.R.; XAVIER, J.G. Prognostic indicators for mast cell tumors. *Brazilian Journal of Veterinary Pathology*, v. 2, p. 110-121, 2009.

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

SUAMI, H.; YAMASHITA, S.; SOTO-MIRANDA, M.A.; CHANG, D.W. Lymphatic territories (lymphosomes) in a canine: an animal model for investigation of postoperative lymphatic alterations. *Plos One*, v. 8, n. 7, e69222, 2013.

TAKAHASHI, T.; KADOSAWA, T.; NAGASE, M.; MOCHIZUKI, M.; MATSUNAGA, S.; NISHIMURA, R.; SASAKI, N. Inhibitory effects of glucocorticoids on proliferation of canine mast cell tumor. *Journal of Veterinary Medical Science*, v. 59, n. 11, p. 995-1001.

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

TANIGUCHI, M.; NISHIDA, T.; HIROTA, S.; ISOZAKI, K.; ITO, T.; NOMURA, T.; MATSUDA, H.; KITAMURA, Y. Effect of c-kit mutation on prognosis of gastrointestinal stromal tumors. *Cancer Research*, v. 59, n. 17, p. 4297-4300, 1999.

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

TESKE, E.; KIPPENSTEIJN, J.; RUTTERMAN, G.R. A mastocytoma in a dog. *Tijdschrift Diergeneeskunde*, v. 132, p. 122-6, 2007.

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

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

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

TOMITA, M.; MATSUZAKI, Y.; EDAGAWA, M.; SHIMIZU, T.; HARA, M.; ONITSUKA, T. Distribution of mast cells in mediastinal lymph nodes from lung cancer patients. *World Journal of Surgical Oncology*, v. 1, n. 25, p. 1-4, 2003.

VAN LELYVELD, S.; WARLAND, J.; MILLER, R.; MAW, H.; FOALE, R.; GOODFELLOW, M.; DOBSON, J. Comparison between ki-67 index and mitotic index for

predicting outcome in canine mast cell tumours. *Journal of Small Animal Practice*, v. 56, n. 5, p. 312-319, 2015.

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. *Veterinary Pathology*, v. 50, n. 1, p. 110-121, 2012.

VILLAMIL, J.A.; HENRY, C.J.; BRYAN, J.N.; ELLERSIECK, M.; SCHULTZ, L.; TYLER, J.W.; HAHN, A.W. Identification of the most common cutaneous neoplasms in dogs and evaluation of breed and age distributions for selected neoplasms. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 239, n. 7, p. 960-965, 2011.

VONDERHAAR, M.A.; MORRISON, W.B. Lymphosarcoma. In: Morrison WB. *Cancer in Dogs and Cats: Medical and Surgical Management*. Baltimore: Williams & Wilkins, 1998, p. 667-695.

YAMADA, O.; KOBAYASHI, M.; SUGISAKI, O.; ISHII, N.; ITO, K.; KUROKI, S.; SASAKI, Y.; ISOTANI, M.; ONO, K.; WASHIZU, T.; BONKOBARA, M. Imatinib elicited a favorable response in a dog with mast cell tumor carrying a c-kit c.1523A>T mutation via suppression of constitutive KIT activation. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 142, p. 101-106, 2011.

WARLAND, J.; AMORES-FUSTER, I.; NEWBURY, W.; BREARLEY, M.; DOBSON, J. The utility of staging in canine mast cell tumours. *Veterinary and Comparative Oncology*, v. 12, n. 4, p. 287-298, 2014.

WARLAND, J.; BRIOSCHI, V.; OWEN, L. DOBSON, J. Canine mast cell tumours: decision-making and treatment. *In Practice*, v. 37, p. 315-332, 2015.

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

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

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

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

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

WEINSTEIN, I.B.; JOE, A. Oncogene addiction. *Cancer Research*, v. 68, p. 3077-3080, 2008.

WEISHAAR, K.M.; THAMM, D.H.; WORLEY, D.R.; KAMSTOCK, D.A. Correlation of nodal mast cells with clinical outcome in dogs with mast cell tumour and a proposed classification system for the evaluation of node metastasis. *Journal of Comparative Pathology*, v. 151, n. 4, p.329-338, 2014.

WERNER, B.; CAMPOS, A.C.; NADJI, M.; TORRES, L.F.B. Uso prático da imuno-histoquímica em patologia cirúrgica. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v. 41, n. 5, p.353-364, 2005.

ZEMKE, D.; YAMINI, B.; GURKAN-YUZBASIYAN, V. Mutation 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.

ANEXOS

Anexo 1 – Certificado emitido pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA).



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº. 384 / 2013, relativo ao projeto intitulado “Associação de lomustina e mesilato de masitinibe no tratamento do mastocitoma canino com mutação no gene *c-kit*”, que tem como responsável Roberto Baracat de Araújo, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 06/05/2014. Este certificado espira-se em 06/05/2019.

CERTIFICATE

We hereby certify that the Protocol nº. 384 / 2013, related to the Project entitled “Combination of lomustine and masitinibe mesylate in the treatment canine mast cell tumors with mutation in *c-kit* oncogene”, under the supervision of Roberto Baracat de Araújo, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 06/05/2014. This certificates expires in 06/05/2019.

Jacqueline Isaura Alvarez Leite
Coordenador(a) da CEUA/UFMG
Belo Horizonte, 06/05/2014.

Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG

<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br

Anexo 2 – Certificado emitido pelo *Department's Ethics and Welfare Committee*.

Judith Drinkwater
Secretary of the Department

Dr J M Dobson
Department of Veterinary Medicine



3 December 2014

**Department of Veterinary
Medicine**

Dear Jane

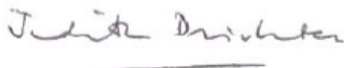
I am pleased to inform you that the Department's Ethics and Welfare Committee has given approval on 3 December 2014 to your clinical research project as follows:

CR138 Study on Adjuvant Therapies for Canine Mast Cell Tumours

You may now proceed with the project.

Please note that if you intend to publish the project in future, you may be asked to confirm that the project has been granted ethical approval and asked to quote the reference number.

Yours sincerely



Judith Drinkwater

Maddingley Road
Cambridge CB3 0ES
Tel 01223 337632
Fax 01223 337671
E-mail jad39@cam.ac.uk

Anexo 3 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido utilizado no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Minas Gerais.

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)



**Universidade Federal de Minas Gerais
Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA**

Você, _____ é convidado (a), como tutor (a) ou responsável do (a) paciente _____, da espécie canina, raça _____, sexo _____, com _____ anos de idade, à incluir o animal referido na pesquisa intitulada “Associação de lomustina e mesilato de masitinib no tratamento do mastocitoma canino com mutações no gene *c-kit*”.

A JUSTIFICATIVA, OS OBJETIVOS E OS PROCEDIMENTOS: O motivo que nos leva a estudar a eficácia desses tratamentos no mastocitoma canino deve-se à reduzida resposta, dessa neoplasia, aos tratamentos convencionais, em casos de mutações no gene *c-kit* ou estadiamento avançado. O mesilato de masitinib e o fosfato de toceranib são inibidores tirosina-kinase, com indicação para o tratamento de mastocitomas inoperáveis ou com mutações no gene *c-kit*, por atuarem de forma direcionada no receptor codificado por esse oncogene. O objetivo desse projeto é aumentar o intervalo livre de doença e sobrevida do paciente com mastocitoma canino em estadiamento avançado ou apresentando mutações no gene *c-kit*, tendo em vista as respostas de curta duração observadas para os tratamentos convencionais. O tratamento quimioterápico será realizado no Hospital Veterinário a cada 21 dias, durante quatro sessões, no entanto o paciente deverá retornar ao Hospital para reavaliação clínica e coleta de sangue para monitoração das contagens celulares 10-14 dias após cada sessão de quimioterapia. O tratamento com inibidores tirosina-kinase será conduzido em casa, pelo próprio responsável pelo animal, mas o paciente deverá retornar ao Hospital a cada 15 dias no primeiro mês de tratamento e a cada 30 dias no segundo mês em diante para reavaliação clínica e coleta de sangue para monitoração do hemograma, função renal e função hepática.

DESCONFORTOS, RISCOS E BENEFÍCIOS: Existe um desconforto e risco mínimo para o paciente que será submetido à venopunção da veia jugular para coleta de sangue, que se justifica pela necessidade de monitoração dos exames, necessária para prevenção de efeitos adversos à medicação.

MÉTODOS ALTERNATIVOS EXISTENTES: Caso você não concorde com os termos dessa pesquisa, o tratamento convencional será oferecido normalmente, sem o benefício dos inibidores tirosina-kinase e envolvimento dos pesquisadores. Tratamentos paliativos também podem ser oferecidos para garantirem conforto ao paciente que não receber o tratamento anti-tumoral.

FORMA DE ACOMPANHAMENTO E ASSISTÊNCIA: Caso sejam observadas alterações no exame clínico ou exames complementares, relacionados ao uso da medicação, o paciente será acompanhado e encaminhado para tratamento adequado no Hospital Veterinário, com redução da dose ou suspensão da medicação, e tratamento sintomático.

GARANTIA DE ESCLARECIMENTO, LIBERDADE DE RECUSA E GARANTIA DE SIGILO: Você será esclarecido (a) sobre a pesquisa em qualquer aspecto que desejar, inclusive sobre a metodologia. Você é livre para recusar-se a participar, retirar seu consentimento ou interromper a participação a qualquer momento. A sua participação é voluntária e a recusa em participar não irá acarretar qualquer penalidade ou perda de benefícios.

O (s) pesquisador (es) irá (ão) tratar a sua identidade, e do seu animal de estimação, com padrões profissionais de sigilo. Os resultados dos exames clínicos e laboratoriais serão enviados para você e permanecerão confidenciais. Seu nome ou o material que indique a sua participação não será liberado sem a sua permissão. Você e seu animal de estimação não serão identificados em nenhuma publicação que possa resultar deste estudo. Uma cópia deste consentimento informado será arquivada no Hospital Veterinário da UFMG e a outra será fornecida a você.

CUSTOS DA PARTICIPAÇÃO, RESSARCIMENTO E INDENIZAÇÃO POR EVENTUAIS DANOS: A participação no estudo não acarretará nenhum custo adicional, exceto aquele necessário para o tratamento do paciente e não será disponível nenhuma compensação financeira adicional. Não estão previstos nenhuma forma de compensação ou indenização, caso o paciente ou proprietário sofra algum dano decorrente dessa pesquisa.

DECLARAÇÃO DO TUTOR OU RESPONSÁVEL PELO PACIENTE: Eu, _____ fui informada (o) dos objetivos da pesquisa acima de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que em qualquer momento poderei solicitar novas informações e motivar minha decisão se assim o desejar. O professor orientador Roberto Baracat de Araújo e a co-orientadora Dra. Gleidice Eunice Lavalley certificaram-me de que todos os dados desta pesquisa serão confidenciais.

Também sei que caso existam gastos adicionais, estes serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa. Em caso de dúvidas poderei chamar o estudante Rodrigo dos Santos Horta, o professor orientador Roberto Baracat de Araújo ou a co-orientadora Dra. Gleidice Eunice Lavalley no telefone (31) 3409-2276 ou o Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais, situado à Av. Antônio Carlos Magalhães, 6627, Pampulha, Belo Horizonte, MG.

Declaro que concordo em participar desse estudo. Recebi uma cópia deste termo de consentimento livre e esclarecido e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.

Nome	Assinatura do Participante	Data
Nome	Assinatura do Pesquisador	Data
Nome	Assinatura da Testemunha	Data

Anexo 4 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido utilizado no Queen's Veterinary School Hospital na University of Cambridge (Statement and agreement for estimated cost of treatment).



University of Cambridge, Department of Veterinary Medicine.
Queen's Veterinary School Hospital, Madingley Road, Cambridge CB3 0ES ("the Hospital")

STATEMENT AND AGREEMENT FOR ESTIMATED COST OF TREATMENT

CASE No. BREED AGE SEX NAME

1. I agree to entrust the animal described above for examination and treatment at the Queen's Veterinary School Hospital. This is on the understanding and condition that reasonable care and attention will be given to such animal. I acknowledge that neither the Hospital, nor any individual member of its staff, nor any student, nor any person employed there, shall be liable for the loss of or any damage or injury to such animal, whether resulting from treatment or otherwise, save that the Hospital alone may be liable in the case of negligence on the part of those treating or responsible for the animal while it is entrusted to it.
2. I hereby give full permission for the animal described above to undergo the investigation / treatment / operation of:
.....
And for such further or alternative treatment / operative measures as may be found necessary during the course of such treatment / operation.
3. I hereby give permission for the animal described above to be given an anaesthetic, sedative or analgesic or a combination of these or any further or alternative measures as may in the reasonable opinion of Veterinary School staff be considered necessary. I understand that all anaesthetic techniques involve some risk to the animal.
4. I understand that certain drugs not licensed for use in this species, but having acknowledged efficacy, may be used to treat my animal. The possible side effects and precautions relating to the specific drugs have been / will be discussed with me and I understand the reasons for their use. In accepting their use for treating my animal, I accept any attendant risk.
5. I understand that in the course of the investigations/treatments outlined above, blood and tissue samples may be collected for diagnostic purposes relating directly to my animal. I give permission for any surplus blood or tissue to be used in studies by the Department of Veterinary Medicine into new means of diagnosis or treatment of animal disease. I understand that all such studies are regulated by the Department's Clinical Ethical Review Committee.

I consent I do not consent
6. I agree that I shall immediately upon request pay all charges for the treatment and board of the above animal undertaken in accordance with this agreement. These charges will be in accordance with the prices specified in the Scale of Charges listing. An estimate of such charges follows, although I understand the actual charges may be more expensive:-

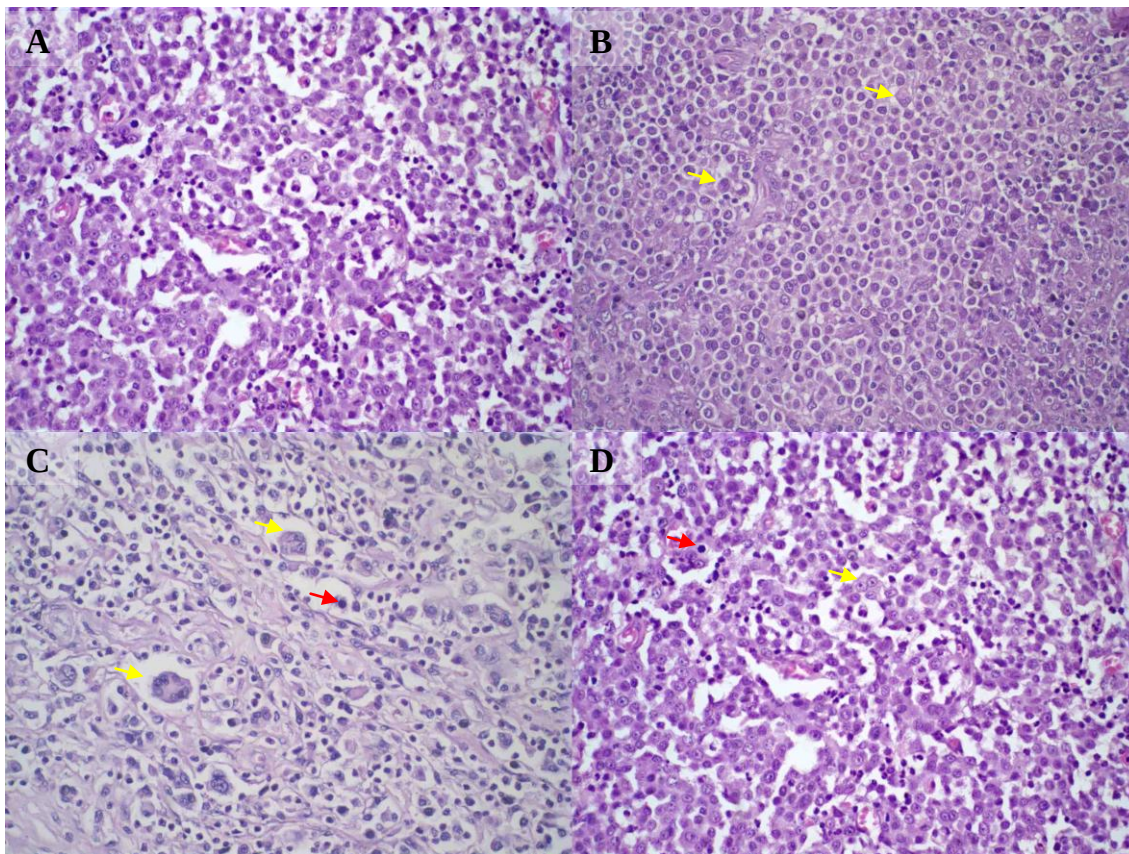
 Consultation
 Operation / anaesthetic
 Radiography
 Special diagnostic procedures
 Laboratory charges
 Board days @ £ per day
 Drugs and treatment
 Consumables
 Standard fee or quoted fee
 ESTIMATED COST £ (Excluding VAT)
NB VAT will be added to any price quoted.
This is an estimate. The cost of the actual treatment may be more or less expensive.

Signature of owner or agent Date.....

Address

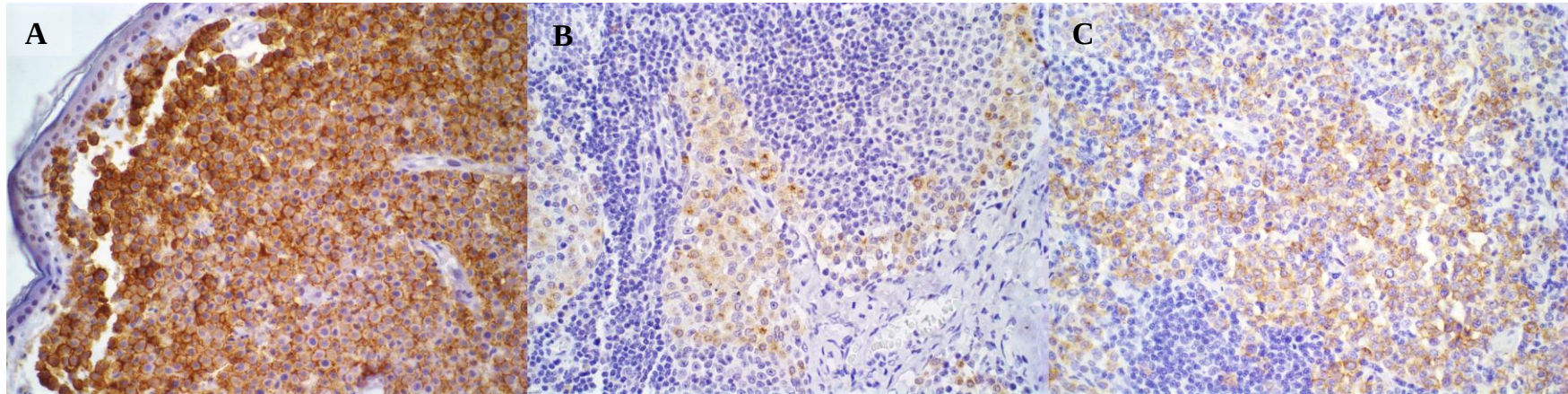
.....
.....

Anexo 5 – Achados anátomo-patológicos (microscopia) em mastocitomas caninos.



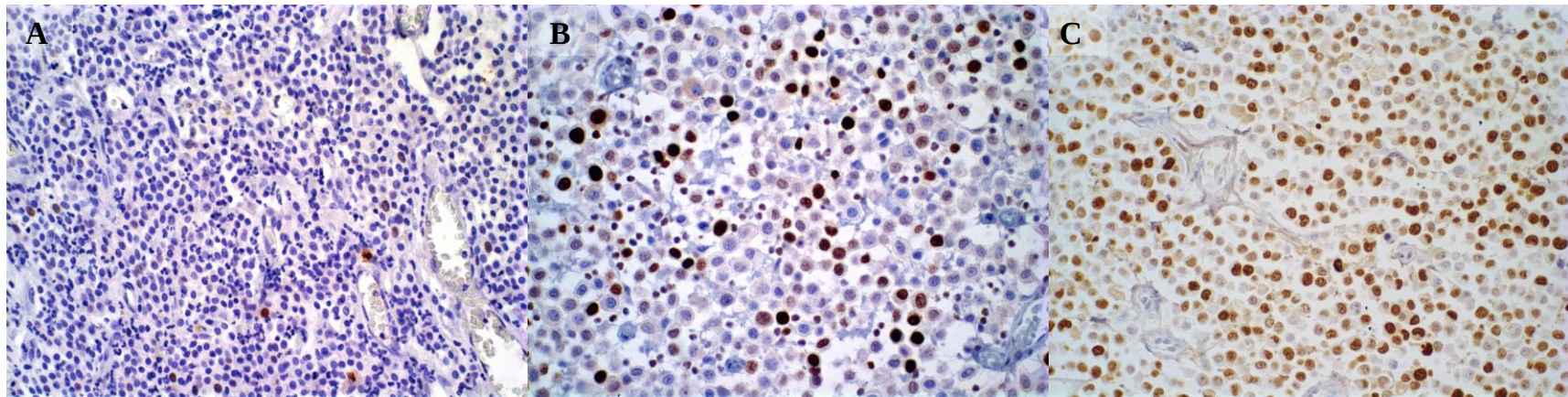
Legenda – Mastocitoma de grau 1 de Patnaik-baixo grau de Kiupel, apresentando granulação evidente e acentuada desmoplasia (A); mastocitoma de grau 2 de Patnaik-alto grau de Kiupel, apresentando plemorfismo moderado e multinucleações (seta amarela) (B); mastocitoma de grau 2 de Patnaik-alto grau de Kiupel, apresentando células multinucleadas (seta amarela) e figuras de mitose (seta vermelha) (C); mastocitoma de grau 2 de Patnaik-alto grau de Kiupel apresentando figuras de mitose. Hematoxilina-eosina, 40x.

Anexo 6 – Padrões de expressão de KITr na imuno-histoquímica.



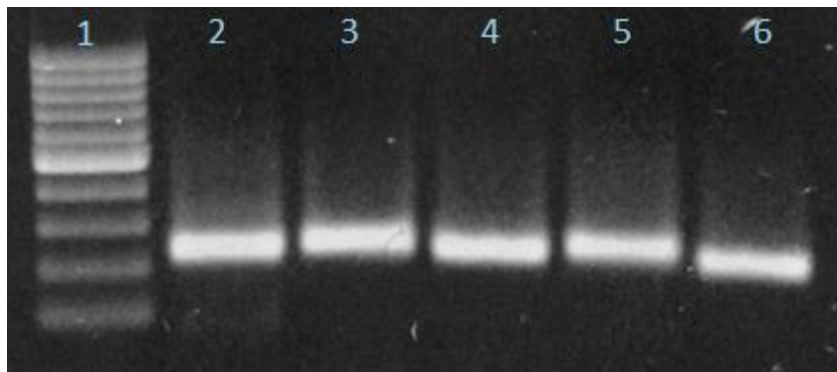
Legenda – Padrões de expressão de KITr em mastócitos neoplásicos, sendo KIT I (A), KIT II (B) e KIT III (C). CD117 (policlonal; 1:800), Hematoxilina de Harris, 40x. Laboratório de Patologia Comparada, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG.

Anexo 7 – Expressão de Ki-67, na imuno-histoquímica.

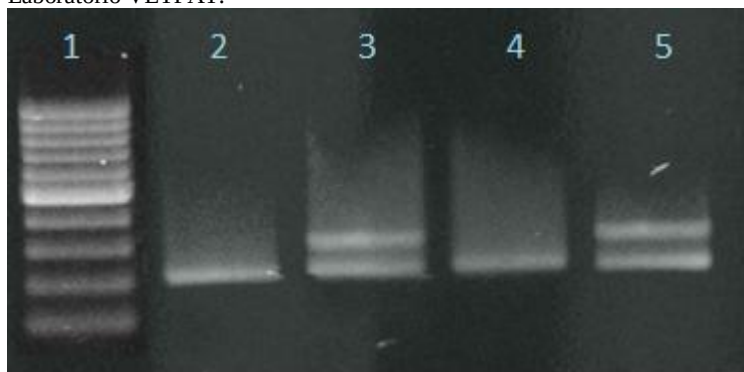


Legenda – Expressão de Ki-67. MIB-1 (monoclonal, 1:25), Hematoxilina de Harris, 40x. Laboratório de Patologia Comparada, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG.

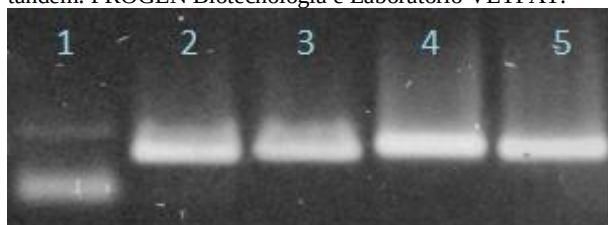
Anexo 8 – Resultados obtidos após a amplificação do segmento de interesse no mastocitoma canino, após separação em gel de agarose 1,2 % e revelação utilizando o *Blue Green Loading Dye*.



Legenda – 1 – Padrão de peso molecular (GeneRuler 100bp); 2, 3, 4, 5 e 6 – Gene nativo. PROGEN Biotecnologia e Laboratório VETPAT.



Legenda – 1 – Padrão de peso molecular (GeneRuler 100bp); 2 e 4– Gene nativo; 3 e 5 –Duplicação interna em tandem. PROGEN Biotecnologia e Laboratório VETPAT.



Legenda – 1 – Deleção; 2, 3, 4 e 5 – Gene nativo. PROGEN Biotecnologia e Laboratório VETPAT.

Anexo 9 – Posicionamento dos pacientes submetidos à radioterapia após excisão cirúrgica de mastocitoma canino.



