

BEATRIZ TEREZI SEIXAS

**ANÁLISE CLÍNICA E SOBREVIDA DE CÃES COM MASTOCITOMAS  
CUTÂNEOS METASTÁTICOS E SUA RELAÇÃO COM CARACTERÍSTICAS  
HISTOLÓGICAS, IMUNOHISTOQUÍMICAS E GENÉTICAS**

Dissertação apresentada à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.  
Área: Medicina e Cirurgia Veterinárias.  
Orientador: Prof. Dr. Roberto Baracat de Araújo.  
Co-orientadores: Dra. Gleidice Eunice Lavalle, Prof. Dr. Felipe Pierezan, Prof. Dr. Rodrigo dos Santos Horta

Belo Horizonte – MG

2019

Escola de Veterinária da UFMG - Campus da Pampulha, Av. Pres. Antônio Carlos, 6.627  
Cep. 31270-901 Caixa Postal 567 - (031) 499-2229 - Fax (031) 499-2230 - Belo Horizonte, MG – Brasil

S462a Seixas, Beatriz Terenzi, 1999-  
Análise clínica e sobrevida de cães com mastocitomas cutâneos metastáticos e sua relação com características histológicas, imunohistoquímicas e genéticas/ Beatriz Terenzi Seixas,- 2019.

58 f.: il.

Orientador: Roberto Baracat de Araújo  
Coorientadores: Gleidice Eunice Lavalle  
Felipe Pierezan  
Rodrigo dos Santos Horta

Dissertação (Mestrado) Apresentado a Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais.

Área de concentração: Medicina e Cirurgia Veterinárias.

Bibliografia: f.: 49 - 56.

Anexo: f.: 57 - 58.

1. Cão – Teses - 2. Doenças – Teses - 3. Linfoma – Teses - 4. Tumores em animais – Teses – I. Araújo, Roberto Baracat de, II . Lavalle, Gleidice Eunice – III. Pierezan, Felipe – IV. Horta, Rodrigo dos Santos - V. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária – VI. Título.

CDD – 636.089 69

Bibliotecária responsável Cristiane Patrícia Gomes – CRB2569

MS11

## FOLHA DE APROVAÇÃO

**BEATRIZ TEREZI SEIXAS**

Dissertação submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração Medicina e Cirurgia Veterinária.

Aprovado(a) em 29 de novembro de 2019, pela banca constituída pelos membros:

*Roberto Baracat de Araújo*

Prof(a). Dr.(a). Roberto Baracat de Araújo  
Presidente - Orientador(a)

*Adriago Barboza de Nardi*

Prof(a). Dr.(a). Adriago Barboza de Nardi

*Marina Rios de Araújo Campos*

Prof(a). Dr.(a). Marina Rios de Araújo Campos

*Gleidice Eunice Lavelle*

Prof(a). Dr.(a). Gleidice Eunice Lavelle

## **Agradecimentos**

São muitos os privilégios que me permitem a conclusão de mais esta etapa, e muitas as pessoas que me ajudaram a chegar aqui. Meus orientadores, Professor Roberto Baracat e Dr Rodrigo Horta, que me ajudaram e apoiaram. O laboratório VETPAT e o Dr Felipe Soeiro, que viabilizaram as análises deste estudo. Minha família, os amigos da oncologia, da veterinária, da vida toda, sem os quais eu não teria sanidade nem razão para continuar. Os animais que passaram por mim, como companheiros ou pacientes, que sempre me ensinam e me lembram do motivo de tanta dedicação.

Agradeço em especial à Dra Gleidice Lavalle, minha maior inspiradora e incentivadora: sempre levo comigo o questionamento “o que Gleidice faria?”.

Lute a luta como você acha que deve lutar e não como exigem que você lute que vão dizer que você não sabe o que é uma luta que vão dizer que você não tem força pra lutar que vão dizer que eles é que sabem lutar que vão dizer que eles lutam há mais tempo do que você luta que vão dizer que é melhor você desistir da luta que vão dizer que não é assim que se luta que vão dizer que você não sabe lutar que vão dizer que você nunca lutou que vão dizer que você não está lutando a mesma luta que eles estão lutando os supostos donos da luta.

“A Luta”, Santarosa Barreto, 2018.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO .....</b>	<b>9</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>10</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>12</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>13</b>
2.1. Aspectos Clínicos .....	13
2.2. Fatores Prognósticos .....	14
2.3. Tratamento .....	24
2.4. Heterogeneidade Celular .....	25
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>27</b>
3.1. Coleta de Dados .....	27
3.2. Avaliação anátomo-patológica.....	28
3.3. Avaliação imuno-histoquímica.....	29
3.4. Pesquisa de mutações no gene <i>c-KIT</i> .....	30
3.5. Análise Estatística .....	31
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>32</b>
4.1. Tratamento .....	33
4.2. Graduação Histológica .....	33
4.3. Proliferação celular .....	35
4.4. KIT .....	40
4.5. Sobrevida.....	43
<b>5. CONCLUSÃO .....</b>	<b>45</b>
<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>46</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>48</b>
<b>8. ANEXOS .....</b>	<b>56</b>
Anexo 1 – Termo de aprovação pelo comitê de ética.....	56
Anexo 2 - Dados completos dos 17 casos avaliados no projeto.....	57

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1</b>	Sistema de Estadiamento Clínico de Mastocitoma (World Health Organization - WHO)	16
<b>Tabela 2</b>	Proposta de revisão do Sistema de Estadiamento Clínico de Mastocitoma da World Health Organization (WHO), por Horta et al (2018)	17
<b>Tabela 3</b>	Sistema de classificação histológica do envolvimento de linfonodos pelo mastocitoma canino (adaptado de Weishaar et al., 2014)	19
<b>Tabela 4</b>	Correlação entre graduação histológica, aspecto microscópico e sobrevida, segundo Patnaik et. al, 1984	21
<b>Tabela 5</b>	Sistema de graduação proposto por Kiupel et al. (2011), para o mastocitoma canino.	22
<b>Tabela 6</b>	Valores de referência para o índice de concordância de Kappa (Landis & Koch, 1977)	32
<b>Tabela 7</b>	Valores da Graduação de Patnaik (1984) para tumores primários e linfonodos	35
<b>Tabela 8</b>	Valores da Graduação de Kiupel (2011) para tumores primários e linfonodos	36
<b>Tabela 9</b>	Padrão de expressão de KIT para tumores primários e linfonodos	41
<b>Tabela 10</b>	Presença de duplicações internas em tandem no exon 11 do gene <i>c-KIT</i> para tumores primários e linfonodos	42

## Lista de Figuras

<b>Figura 1</b>	Diagrama de drenagem linfática (Kiupel et al, 2019)	18
<b>Figura 2</b>	Gráfico de dispersão para a variável Índice Mitótico	37
<b>Figura 3</b>	Diagrama de Bland-Altman para a variável Índice Mitótico	38
<b>Figura 4</b>	Gráfico de dispersão para a variável Ki67	39
<b>Figura 5</b>	Diagrama de Bland-Altman para a variável Ki67	40
<b>Figura 6</b>	Curva de Sobrevida Global para os animais tratados	44
<b>Figura 7</b>	Curva de Intervalo Livre de Doença para os animais tratados	45

## Lista de Abreviaturas

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

ATP – Adenosina trifosfato.

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

COX-2: ciclo-oxigenase 2.

DNA – *Deoxyribonucleic acid* (ácido desoxirribonucleico).

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).

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

K-RAS – *Kirsten Rat sarcoma*.

OMS – Organização Mundial de Saúde.

p – Nível de significância.

PAAF – Punção aspirativa por agulha fina.

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

RAF – *Rapidly accelerated fibrosarcoma*.

RNA – Ribonucleic acid (ácido ribonucleico).

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

SG – Sobrevida global

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

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais.



## Resumo

Mastocitomas são neoplasias cutâneas frequentes em cães que apresentam comportamento biológico e prognóstico variável. A avaliação de características do tumor e do paciente ajudam o clínico a determinar sua conduta. O objetivo deste trabalho foi comparar a apresentação das principais características histológicas, imunohistoquímicas e genéticas avaliadas nos mastocitomas em tumores primários e sua respectiva metástase em linfonodo. Para tanto, foram incluídos animais atendidos no serviço de Oncologia do Hospital Veterinário da UFMG com diagnóstico histopatológico de mastocitoma e metástase em linfonodo comprovada histopatologicamente. Foram avaliadas as graduações dos mastocitomas pelos sistemas de Kiupel e Patnaik, o índice mitótico, a fração de crescimento estimada pelo valor percentual de Ki-67, o padrão de expressão do receptor KIT e o status mutacional do exon 11 do gene *c-KIT*. Não foi encontrada correlação significativa entre as características do linfonodo e do tumor primário para nenhum dos fatores avaliados, demonstrando a necessidade de avaliar as duas lesões quando houverem, para melhor definição do prognóstico e do tratamento. Também foi encontrado uma incidência de duplicações internas em tandem no exon 11 do gene *c-KIT* de 35%, maior do que a média relatada em outros estudos, sugerindo que a presença de mutações é mais frequente em pacientes de estadio avançado e prognóstico pior. Também foi demonstrada a necessidade de avaliar os fatores prognósticos em conjunto, pois isoladamente podem levar o clínico a subestimar ou superestimar a agressividade de um mastocitoma. Concluiu-se que em casos de mastocitoma com metástase em linfonodo, é importante avaliar um conjunto amplo de fatores prognósticos no tumor primário e no linfonodo.

Palavras-chave: cão, neoplasias, ki67, linfonodo, metástase, proto-oncogene *c-KIT*, receptor KIT, duplicação gênica

## Abstract

*Mast cell tumors are one of the most important cutaneous malignancies in dogs, and can present with varied biological behaviour and prognostic. Gathering and evaluating tumor and patient prognostic characteristics can be of great value in the decision making process for the clinical oncologist. The goal of this research was to compare the presentation of the main histological, immunohistochemical and genetical characteristics evaluated commonly in mast cell tumors, in both the cutaneous mass and its lymphonodal methastasis. To achieve that, patients referred to the Oncology sector of Federal University ou Minas Gerais (Brazil) that presented with histologically diagnosed mast cell tumor with also histologically detected lymphonodal methastasis were evaluated. The evaluated characteristics included histological graduation bt the Kiupel and Patnaik systems, mitotic index, growth fraction estimated by the percentage of Ki-67, KIT receptor pattern and mutational status in exon 11 of the c-KIT oncogene. No correlation was found between the cutaneous mass and its lymphonodal methastasis regarding the evaluated features, thus showing the need to perform these analysis in both locations, when affected, to better determine the prognostic and course of treatment for the patient. It was also noted a greater incidence of internal tandem duplications in exon 11 of the c-KIT oncogene, which happened in 35% of cases, suggesting that patients of advanced clinical staging and worse prognosis have these mutations more frequently. The study also demonstrated a need to evaluate a panel of prognostic characteristics, and not any of the aspect individually, under risk of underestimating or overestimating the aggressiveness of a mast cell tumor. The conclusion was that, in cases of metastatic mast cell tumors, it is important to evaluate a comprehensive panel of prognostic characteristics in the primary tumor but also in the metastatic lymphnode.*

*Key-words: dog, neoplasms, ki67, lymphnode, metastasis, c-KIT proto-oncogene, gene duplication*



## 1. Introdução

O mastocitoma é a neoplasia cutânea mais comum no cão, representando entre 16% e 21% de todos os tumores cutâneos. Geralmente se apresentam como lesões únicas, mas sua manifestação é extremamente variável, podendo se confundir com diversas outras neoplasias cutâneas, devendo sempre ser considerado como diagnóstico diferencial (Dobson e Scase, 2007).

Por apresentar comportamento clínico extremamente variável, e por vezes extremamente agressivo, a conduta clínica permanece um desafio na rotina oncológica (London e Thamm, 2013). Diversos fatores clínicos, histopatológicos, imunohistoquímicos e genéticos vem sendo avaliados na tentativa de se determinar mais precisamente o prognóstico e a conduta adequada a cada paciente (Dobson e Scase, 2007). A graduação histopatológica por dois sistemas (Patnaik et al., 1984; Kiupel et al., 2011) , o número de mitoses, o estadiamento, a avaliação da fração de crescimento tumoral pela marcação imunohistoquímica com ki67, a expressão do receptor de membrana KIT, a presença de mutações no gene *c-KIT* tem sido alguns, se não os principais aspectos avaliados na determinação desse painel prognóstico em casos de mastocitoma (London e Thamm, 2013; Gil da Costa, 2015; Horta et al., 2018), sendo a ocorrência de metástase em linfonodo um fator prognóstico negativo importante (Cahalane et al., 2004; Weishaar et al., 2014).

Na rotina clínica, esses fatores prognósticos são avaliados no tumor primário quando da sua excisão ou biópsia, porém não se sabe se há concordância entre a expressão dessas características com relação ao tumor primário e sua metástase (Marconato et al., 2004), e no evento de discordância, qual desses fragmentos deve ser avaliado para tomada de decisões (Amagai et al., 2013).

O objetivo deste trabalho foi determinar qual o grau de concordância entre o tumor primário e sua metástase quanto aos principais fatores prognósticos e seu impacto na tomada de decisão quanto à necessidade de examinar as características das múltiplas lesões no mesmo animal visando uma melhor avaliação do prognóstico.

## 2. Revisão de Literatura

O mastocitoma é a neoplasia cutânea mais comum em cães e, embora ocorra majoritariamente em animais mais velhos (média de 8 a 9 anos de idade), ocasionalmente podem ocorrer em animais mais jovens, não havendo predileção por gênero. Diversas raças apresentam maior risco para o desenvolvimento de mastocitomas, como Boxer, Boston Terrier, Bulldog, Pug, Labrador, Golden Retriever, Beagle e Schnauzer, sugerindo uma etiologia genética (London e Thamm, 2013). Sua etiologia, entretanto, é pouco conhecida, embora sejam sugeridos fatores inflamatórios (London e Thamm, 2013). Algumas alterações genéticas e moleculares podem ser identificadas com frequência em mastocitomas, com destaque para as mutações no gene *c-KIT*, que podem ter impacto no prognóstico e tratamento (Welle et al., 2008).

### 2.1. Aspectos Clínicos

Sua aparência é extremamente variável, e pode ser frequentemente relacionada com seu comportamento e grau histológico. Mastocitomas diferenciados comumente se apresentam como nódulos cutâneos únicos, de crescimento lento e tamanho entre 1 e 4 cm. Também podem se apresentar como tumores subcutâneos, muitas vezes sendo confundidos com lipomas (Welle et al., 2008). Já os mastocitomas indiferenciados podem estar associados a características como crescimento rápido, ulceração, dor, inflamação local e presença de nódulos satélite (Bostock, 1986; Welle et al., 2008).

Os principais sítios de metástase de mastocitoma são fígado e baço, sendo a via linfática responsável pela disseminação tumoral. Raramente é observada ocorrência de mastocitoma em outros órgãos, como no trato gastrointestinal, na conjuntiva, glândulas salivares, nasofaringe, cavidade oral, uretra e medula espinhal. (London e Thamm, 2013).

A forma visceral da doença, também dita disseminada ou *mastocitose sistêmica*, é geralmente precedida por uma lesão cutânea inicial, com disseminação de mastócitos para os órgãos internos, e normalmente tem um comportamento mais agressivo e um prognóstico mais desfavorável (Grano et al., 2012; London e Thamm, 2013). Pode ocorrer infiltração do

mastocitoma em linfonodos, fígado, baço, trato gastrointestinal e medula óssea, e os sinais clínicos e síndromes paraneoplásicas associadas geralmente estão relacionados com a liberação de substâncias vasoativas pelos mastócitos (O’Keefe et al., 2008; Grano et al., 2012).

O diagnóstico primário de mastocitoma geralmente se dá pela punção aspirativa do nódulo cutâneo ou subcutâneo, sendo a citologia um método extremamente sensível para seu diagnóstico (Lavalle et al., 2003). O resultado da citologia é determinante para a conduta clínica e cirúrgica a ser tomada, que também é variável de acordo com a presença ou não de fatores prognósticos desfavoráveis (Govier, 2003).

## **2.2. Fatores Prognósticos**

A avaliação dos fatores prognósticos presentes é de fundamental importância para determinação da conduta, do tratamento e da expectativa de vida do paciente.

Diversos fatores podem influenciar uma avaliação prognóstica de um cão com mastocitoma, entre eles a localização da lesão, sua aparência macroscópica, velocidade de crescimento, tamanho, presença de síndromes paraneoplásicas, raça e estadiamento. Alguns marcadores de proliferação têm sido avaliados na tentativa de se obter uma melhor previsão do comportamento de mastocitomas, especialmente daqueles de grau II. Porém o fator prognóstico mais frequentemente avaliado é, sem dúvida, a graduação histopatológica (Welle et al., 2008).

Tumores localizados em junções mucocutâneas, cavidade oral, focinho, orelhas, prepúcio, região perianal e bolsa escrotal, tendem a apresentar características mais agressivas e maior chance de metástases (Dobson e Scase, 2007). Presença de ulceração, inflamação ou prurido também estão associadas a um pior prognóstico (Bostock, 1986; London e Thamm, 2013). Cães das raças Bulldog e Boxer, apesar de desenvolverem mastocitomas com maior frequência que outras raças, tendem a apresentar tumores menos agressivos (Dobson e Scase, 2007; London e Thamm, 2013). Há evidência de que Shar-Peis desenvolvem mastocitomas de comportamento mais agressivo (London e Thamm, 2013).

O estadiamento clínico tem grande importância prognóstica, devendo ser realizado em todos os pacientes (Dobson e Scase, 2007; Welle et al., 2008, Blackwood et al., 2012). O sistema de estadiamento proposto pelo World Health Organization (WHO) é o mais utilizado (Tabela 1), porém a presença de múltiplos nódulos é um ponto controverso, pois não há

consenso se seria uma manifestação metastática atípica ou nódulos independentes e qual sua relevância prognóstica quando não há metástase em linfonodos (Dobson e Scase, 2007; Welle et al., 2008; London e Thamm, 2013). Recentemente uma adaptação desse sistema de estadiamento foi proposta por Horta et al (2018), demonstrando melhor correlação com o prognóstico e sobrevida (Tabela 2). O novo sistema de classificação separa o estágio III em III.1 quando não há acometimento de linfonodo e III.2 quando há confirmação de metástase em linfonodo, resultando num sistema com 5 estágios que apresenta melhor correlação com o prognóstico.

Mesmo animais com risco intermediário a avançado podem se beneficiar de um protocolo de tratamento adequado com resultados positivos quanto a sobrevida, porém no estadiamento IV o paciente é considerado terminal e não responde de forma duradoura aos tratamentos (Welle et al., 2008; Hume et al., 2011).

Tabela 1 – Sistema de Estadiamento Clínico de Mastocitoma (World Health Organization - WHO)

<b>Estadiamento</b>	<b>Descrição</b>
0	Presença de um tumor incompletamente excisado da derme, identificado histologicamente, sem envolvimento de linfonodo regional.
I	Presença de um tumor confinado à derme, sem envolvimento de linfonodo regional.
II	Presença de um tumor confinado à derme, com envolvimento de linfonodos regionais.
III	Tumores dérmicos múltiplos, tumores grandes e infiltrativos com ou sem envolvimento de linfonodo regional.
IV	Qualquer tumor com metástase à distância, com envolvimento de sangue ou medula óssea

Tabela 2 – Proposta de revisão do Sistema de Estadiamento Clínico de Mastocitoma da World Health Organization (WHO), por Horta et al (2018)

<b>Estadiamento</b>	<b>Descrição</b>
I	Presença de um tumor confinado à derme, sem envolvimento de linfonodo regional.
II (III.1)	Tumores dérmicos múltiplos (>3), sem envolvimento de linfonodo regional.
III (III.2)	Presença de um tumor confinado à derme, com envolvimento de linfonodos regionais.
IV	Tumores grandes e infiltrativos, sem delimitação, ou tumores dérmicos múltiplos (>3) com envolvimento de linfonodos regionais
V	Qualquer tumor com metástase à distância, com envolvimento de sangue ou medula óssea

A avaliação do linfonodo que drena a região do tumor é fundamental, e passa por uma avaliação clínica através de um exame físico para detecção de aumento de volume, alteração em formato ou consistência, até exames diagnósticos citológicos ou exérese e avaliação histológica (Kiupel et al, 2019).



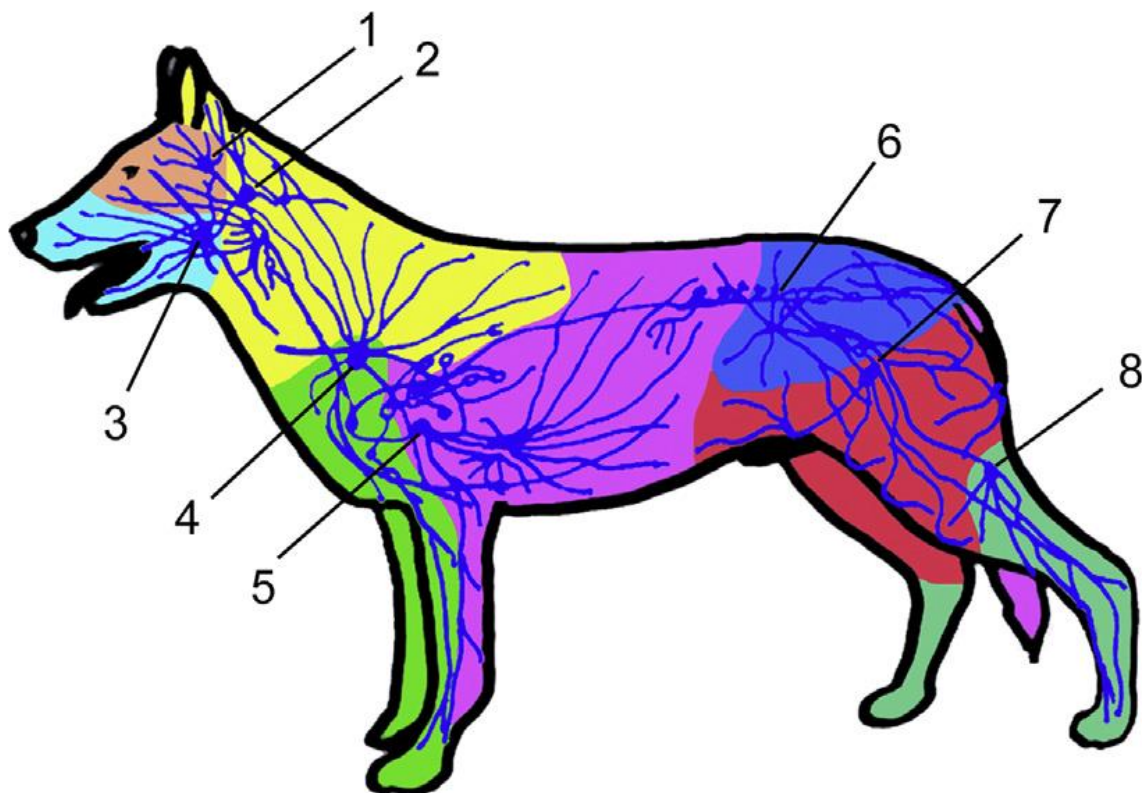


Figura 1: Diagrama de drenagem linfática. Principais linfonodos: 1= parotídeo, 2 = sub-mandibular, 3 = retrofaríngeo, 4 = pré-escapular, 5 = axilar, 6 = ilíaco, 7 = inguinal, and 8 = popliteo (Kiupel et al, 2019)

A detecção da metástase em linfonodo pode se dar por citologia ou avaliação histopatológica de amostra removida cirurgicamente, devendo-se levar em consideração que até 24% dos cães saudáveis podem apresentar uma quantidade aumentada de mastócitos em seus linfonodos (Bookbinder et al., 1992), especialmente quando se considera que o próprio mastocitoma e sua inflamação associada podem recrutar mastócitos fisiológicos por via linfática especialmente após manipulação e degranulação (Kiupel, 2017), de forma que critérios mais específicos para determinação citológica e histopatológica da metástase devem ser adotados (Krick et al., 2009). A distinção entre mastócitos normais e neoplásicos no linfonodo pode ser difícil, sendo geralmente avaliada a quantidade, o pleomorfismo e a agregação dos mastócitos (Mutz et al, 2017).

A presença de metástase em linfonodo no momento do diagnóstico está diretamente relacionada com um maior risco de óbito devido à doença, porém seu efeito sobre o prognóstico

não está bem estabelecido, pois parte dos animais alcança um longo tempo de sobrevida com tratamento (Dobson e Scase, 2007; Welle et al., 2008; Hume et al., 2011; London e Thamm, 2013). A excisão cirúrgica de linfonodos regionais com manifestação de doença metastática está associada com melhor prognóstico (Marconato et al, 2018), e um estudo encontrou 21% de macrometástases de mastocitoma em linfonodos sem alteração palpável (Ferrari et al, 2018). Hume et al (2011) encontraram uma sobrevida de 194 dias pra animais com metástase nodal confirmada em comparação com 503 dias para animais sem metástase, num grupo de 43 animais com mastocitoma estadio III.

O evento de recorrência tumoral tem efeito negativo significativo no prognóstico, com ocorrência de óbito devido ao tumor chegando a 80 a 100% dos casos (Horta et al., 2018). Embora esses pacientes ainda se beneficiem de tratamento envolvendo cirurgia e terapias adjuvantes, o prognóstico permanece desfavorável (Tham et al., 1999; Horta et al., 2018)

A classificação histopatológica do nível de acometimento do linfonodo regional em cães com mastocitoma proposta por Weishaar et al. (2014) pode ser vista na Tabela 3, e visa auxiliar na classificação dos mastócitos presentes em linfonodos suspeitos de pacientes com mastocitoma. Quando agrupados em HN0/HN1 e HN2/HN3, 90% e 56% dos pacientes destes dois grupos atingiram sobrevida de dois anos, demonstrando correlação da classificação com o prognóstico (Weishaar et al., 2004).

Tabela 3 – Sistema de classificação histológica do envolvimento de linfonodos pelo mastocitoma canino (adaptado de Weishaar et al., 2014)

<b>Grau</b>	<b>Descrição</b>	<b>Critérios histopatológicos</b>
<b>HN0</b>	Não metastático.	0-3 mastócitos isolados nos seios (subcapsular, paracortical ou medular) e/ou parênquima do linfonodo por campo 40x.
<b>HN1</b>	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.
<b>HN2</b>	Metástase inicial.	Agregados de mastócitos (mais que três células) nos seios (subcapsular, paracortical ou medular) e/ou parênquima, ou cordões sinusóides de mastócitos.
<b>HN3</b>	Metástase avançada.	Alteração da arquitetura do linfonodo, com focos de mastócitos organizados em manto ou cordão.

A análise histopatológica é uma classificação do tumor de acordo com suas características microscópicas, podendo ser traduzida em uma graduação bem estabelecida e que se correlaciona consistentemente com o prognóstico (London e Thamm, 2013; Warland et al., 2015). O sistema de graduação mais tradicionalmente utilizado é aquele proposto por Patnaik et al. (1984), que divide os mastocitomas em três graduações, sendo o grau I aquele mais bem diferenciado, normalmente apresentando comportamento menos agressivo, e o grau III aquele com tumores mais anaplásicos, de comportamento mais agressivo (Warland et al., 2015), conforme mostrado na Tabela 4. A Tabela 4 mostra também a alta correlação da graduação histopatológica com a sobrevida dos animais diagnosticados (London e Séguin, 2003; London e Thamm, 2013).

O sistema de Patnaik et al. (1984) não propõe uma classificação para os tumores subcutâneos, e utiliza fatores subjetivos, dando margem para grande variação individual na avaliação pelos patologistas (Northrup et al., 2005; Dobson e Scase, 2007). Seu sistema culmina na inclusão de 40% ou mais dos mastocitomas no grau intermediário (grau 2), agrupando tumores com comportamento biológico distinto (Gross et al., 2005), de forma que 15% a 30% de tumores classificados como bem ou intermediariamente diferenciados resultam em morte do paciente, de forma não prevista pela classificação em três graus (London e Thamm, 2013). A avaliação de mitoses nesse sistema resulta em tumores com índices de proliferação variados sendo classificados dentro do mesmo grau, conforme demonstrado por Romansik et al (2007). O critério de 0-2 mitoses por campo para o grau II permite que tumores com 0-20 mitoses/10 campos (40x) tenham a mesma classificação, enquanto animais com  $\leq 5$  mitoses/10 campos (40x) tiveram uma sobrevida significativamente menor que aqueles com  $>5$  mitoses/10 HPF (2 meses e 70 meses de sobrevida média, respectivamente) (Romansik et al, 2007).

Tabela 4 – Correlação entre graduação histológica, aspecto microscópico e sobrevida, segundo Patnaik et. al, 1984

<b>Grau</b>	<b>Características</b>	<b>Animais vivos após 1500 dias</b>
<b>I</b>	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.	<b>83%</b>
<b>II</b>	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.	<b>44%</b>
<b>III</b>	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.	<b>6%</b>

Foi proposto um novo sistema de graduação por Kiupel et al. (2011), com o objetivo de eliminar o grau intermediário, classificando todos os mastocitomas entre alto ou baixo grau. Visando maior repetibilidade entre patologistas, e melhor predição do comportamento biológico dos tumores, o sistema se baseia na avaliação de algumas características celulares quantificáveis em valores objetivos.

Tabela 5 - Sistema de graduação proposto por Kiupel et al. (2011), para o mastocitoma canino.

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

Em estudos com tumores avaliados pelos dois sistemas de graduação, o sistema alternativo proposto por Kiupel se mostrou melhor na previsão da mortalidade dos animais (Kiupel et al., 2011; Takeuchi et al., 2013; Sabbatini et al., 2015). No entanto, mesmo o sistema de dois níveis de Kiupel não consegue prever com exatidão o comportamento dos mastocitomas avaliados, visto que em um estudo realizado com 386 animais, Stefanello et al (2015) encontrou metástase em linfonodo regional em 15% dos mastocitomas classificados como baixo grau, sendo mais interessante a avaliação dos dois sistemas em conjunto e em associação com outros fatores prognósticos clínicos e moleculares (Sabbatini et al., 2015; Horta et al., 2018). Adoção do novo sistema por patologistas está ocorrendo gradualmente, e por enquanto o sistema Patnaik é o mais utilizado (Warland et al., 2015).

Outros marcadores prognósticos mais recentemente pesquisados são os marcadores de proliferação e metabolismo celular, que ajudam a determinar a possibilidade de um mastocitoma apresentar comportamento agressivo. Marcação para AgNORs, PCNA, Ki67, índice mitótico e a expressão do receptor de membrana KIT, tem se mostrado recursos com grande importância na predição do comportamento de mastocitomas (London e Thamm, 2013, Warland et al., 2015).

Multiplicação celular descontrolada é considerada uma das características definidoras do câncer (Hanahan e Weinberg, 2011). A avaliação do índice proliferativo em mastocitomas é

um fator prognóstico relevante, podendo ser realizada através de diversos marcadores (Scase et al, 2006).

O índice mitótico (IM) é a contagem das células que se encontram na fase M do ciclo celular. Como sua observação representa apenas uma fase específica do ciclo celular, ao menos 20% dos mastocitomas de alto grau terão um índice mitótico baixo (Kiupel et al, 2011). Embora um alto índice mitótico esteja claramente associado a um comportamento mais agressivo e por isso sua avaliação esteja incluída nos sistemas de gradação (Patnaik et al, 1983; Kiupel et al, 2011), um IM baixo não é preditor de comportamento mais benigno, e portanto não deve ser usado como único marcador de proliferação (Kiupel et al, 2019). O valor de corte proposto por Romansik et al. (2007), que encontrou prognóstico e sobrevida piores para mastocitomas com mais que 5 mitoses em 10 campos (40x) é o mais frequentemente utilizado, embora recentemente Horta et al. (2018) tenham encontrado maior sensibilidade na determinação do prognóstico ao adotar um valor de corte de 2 figuras de mitose em 10 campos (40x). É importante avaliar o IM em todos os casos de mastocitoma, especialmente por ser uma avaliação facilmente realizada nas colorações histopatológicas de rotina, mas também por sua associação com prognóstico e sobrevida, porém sua avaliação deve ser associada com outros parâmetros prognósticos e, preferencialmente com outras metodologias de avaliação de proliferação celular (Sledge et al., 2016; Horta et al., 2018; Kiupel et al., 2019).

O índice de proliferação de uma população celular é definida pelo número de células que estão em divisão (fração de crescimento) e pela velocidade com que essa divisão está ocorrendo (tempo de geração). Idealmente, para se ter uma mensuração mais fidedigna da proliferação celular, esses dois aspectos devem ser avaliados em conjunto.

AgNORs (regiões organizadoras nucleares argirofílicas), são estruturas nucleolares na transcrição de RNA ribossomal, contadas a partir da coloração histoquímica com impregnação pela prata. Embora seja uma técnica pouco aplicada na rotina, sua quantidade se relaciona com a velocidade de proliferação celular, estando significativamente relacionado com o grau de Patnaik e o prognóstico (Scase et al., 2006; Webster et al., 2007).

Ki67 é uma proteína nuclear expressada por células em todas as fases do ciclo celular exceto G0, e que desaparece rapidamente após a mitose. É mensurado pela contagem de núcleos celulares marcados pelo anticorpo monoclonal MIB-1, e é considerado o marcador quantitativo não-subjetivo mais preciso para avaliação da proliferação celular, com valor prognóstico

independente no mastocitoma canino (Webster et al, 2007; Strefezzi et al, 2010; Horta et al, 2018). Seu índice é utilizado como um marcador de proliferação celular, tendo relação moderada com o número de mitoses e estando relacionado com prognóstico (Scase et al., 2006; Webster et al., 2007).

Horta et al (2018) encontraram um valor de corte para a marcação do Ki67 em mastocitomas de 5,6%, com 92% de sensibilidade, porém não sendo um marcador prognóstico independente, devendo ser avaliado em conjunto com outras características. Esse valor condiz mais com os resultados observados clinicamente e com o valor de corte de 7% encontrado por Strefezzi et al (2010) do que a referência prévia de 1,8% (Maglennon et al., 2008), que classificava como tendo alto risco alguns animais que apresentavam boa progressão clínica e longa sobrevida. Também é frequentemente adotado o método da contagem de células com imunomarcação positiva pelo MIB-1 em 5 campos de 10mmx10mm, selecionados por apresentarem um maior número de células marcadas (considerados “*hot-spots*”) numa gradícula de 10x10 de 1cm<sup>2</sup> na objetiva de 40x. Para esse método foi encontrado um valor de corte de 23 células marcadas para MIB-1 em um ou mais campos “*hot-spots*”, por Webster et al (2007),

O receptor de membrana KIT é um receptor de tirosina kinase regulado pela expressão do proto-oncogene *c-KIT*, cuja ativação está envolvida na proliferação, motilidade e sobrevivência celular. São observados diferentes padrões de expressão celular da proteína KIT nas células de mastocitoma, chamados padrões I, II e III, de acordo com a localização predominante da marcação do receptor. O padrão I tem expressão peri-membranosa e é encontrado em mastócitos não neoplásicos e em mastocitomas bem diferenciados, e não está relacionado a comportamento agressivo (Kiupel, 2004). A perda da expressão membranar e uma marcação citoplasmática focal define o padrão II, e uma expressão citoplasmática difuso em pelo menos 10% das células é característica do padrão III. Os padrões aberrantes II e III, especialmente o padrão III (citoplasmático difuso) estão associados com pior prognóstico e menor sobrevida (Kiupel et al., 2004; Horta et al., 2018).

Mutações no gene *c-KIT* (mais comumente observadas nos exons 11, 8 e 9) levam a ativação indiscriminada do receptor de membrana, independente de sua ligação a SCF (stem cell factor). A presença dessas mutações (especialmente duplicações em tandem no exon 11) estão presentes com maior frequência em mastocitomas de maior grau histológico e estão associados com alto risco de recorrência e metástases, menor intervalo livre de doença (ILD) e menor sobrevida (Downing et al., 2002; Zemke et al., 2002; Webster et al., 2006; Takeushi et al.,

2013). Sua incidência é relativamente baixa em mastocitomas, tendo sido encontrada em 10% dos pacientes por Horta et al (2018), mas sua presença pode direcionar o tratamento para o uso de terapias alvo como os Inibidores de Tirosina Kinase (London et al., 2009)

Boa resposta à terapia citorrredutora com glicocorticóides está associada com tumores de baixo grau, com melhor padrão de expressão do rKIT e menor índice de Ki67, estando portanto relacionada com marcadores de prognóstico favorável (Horta et al., 2018)

### **2.3. Tratamento**

A definição do tratamento dos mastocitomas cutâneos é baseada em critérios como sua apresentação clínica, estadiamento e a presença de fatores prognósticos (London e Séguin, 2003; Horta et al, 2018). O tratamento de escolha para todos os mastocitomas é a cirurgia com margens amplas, dentro das possibilidades da localização anatômica. Estudos recentes demonstraram que uma margem lateral de 2 cm e de um plano fascial em profundidade é suficiente para excisão completa de mastocitomas de grau I e II de até 4cm (Simpson et al., 2004, Fulcher et al., 2006; Sledge et al, 2016). Mastocitomas bem a moderadamente diferenciados (graus I e a maioria dos de grau II) normalmente são tratados com sucesso com excisão cirúrgica com margens amplas, sendo recomendada reavaliação periódica quanto a recorrência e metástases.

O uso pré-cirúrgico de glicocorticóides para redução do volume tumoral aumenta muito as chances de se conseguir uma boa margem cirúrgica de segurança. Nos casos em que a excisão completa não é possível devido à localização da lesão, é recomendada uma combinação com terapia adjuvante, como a radioterapia (Welle et al., 2008; London e Thamm, 2013). Pode ser realizada complementação do tratamento local com radioterapia ou ampliação de margens, quando possível, quando as margens histológicas estiverem comprometidas e a avaliação do grau histológico e índice de proliferação indicarem a necessidade (Sledge et al., 2016) . O uso de água deionizada intralesional em mastocitomas não completamente excisados pode reduzir a chance de recidivas, embora estudos mais recentes não tenham encontrado efeito benéfico associado ao seu uso (London e Séguin, 2008).

Em casos de mastocitoma de alto risco e risco moderado, que podem apresentar comportamento mais agressivo e pior prognóstico, terapias adjuvantes sistêmicas devem ser



empregadas na tentativa de evitar ou atrasar a progressão da doença, complementando o tratamento cirúrgico (Welle et al., 2008; Sledge et al, 2016; Horta et al, 2018). Para determinar se há necessidade de tratamento sistêmico, é importante considerar vários dos fatores prognósticos, conforme sugerido por Horta et al (2018), que considera de alto risco os mastocitomas que apresentam estadiamento II, III com metástase em linfonodo e IV na escala da WHO ou com histórico de recorrência tumoral. O autor considera de risco intermediário os casos de mastocitoma primário (não recorrente) e em estádios I ou III sem metástase em linfonodo que apresente qualquer uma das seguintes características: graduação de Patnaik/Kiupel grau II/alto grau ou grau III/alto grau, mais que 2 mitoses em 10 campos (40x), ki67 maior que 5,6%, expressão de KIT padrão III ou duplicação no exon 11 do gene *c-KIT*.

Combinações variadas de agentes quimioterápicos são empregadas com bons resultados (prednisona e vimblastina, prednisona/vimblastina e lomustina, ciclofosfamida, vimblastina e prednisona), assim como a radioterapia em casos de margens cirúrgicas comprometidas e metástase em linfonodo regional (London e Thamm, 2013; Warland et al., 2015).

Opções mais recentes de tratamento incluem as terapias de alvo molecular usadas no tratamento de mastocitomas, chamadas “small molecule Tyrosine Kinase Inhibitors” (TKIs) (London e Thamm, 2013). Essas drogas agem bloqueando o sítio de ligação de ATP em proteínas-quinases da membrana da célula, atuando como inibidores competitivos e impedindo assim sua cascata de fosforilação e consequente proliferação e metabolismo celular (London, 2009). Duas drogas já são aprovadas para uso veterinário, toceranib e masitinib, e a droga de uso humano imatinib vem sendo estudada. Resultados na utilização dos TKIs tem sido promissor, inclusive numa possível associação com tratamento quimioterápico ou radioterapia (Robat et al., 2012; London e Thamm, 2013; Horta et al, 2017).

## **2.4. Heterogeneidade Celular**

A população de células em um tumor é heterogênea, tanto geneticamente quanto fenotipicamente, e pressões seletivas no microambiente das células neoplásicas leva a seleção de populações celulares com vantagem para sobrevivência e proliferação. Sabe-se que, no

mecanismo de invasão tumoral e formação de focos metastáticos, as células tumorais sofrem mudanças em características específicas, que permitem sua disseminação e a colonização de outros focos (Hanahan and Weinberg, 2011). Há diversos trabalhos relatando significativa discordância entre o tumor primário e sua metástase, como em Kalikaki et al (2008), que encontrou discordância de mutações em genes de EGFR (receptor do fator de crescimento epidérmico) (28%) e em K-RAS (24%) em casos de câncer de pulmão de células não pequenas em humanos. Albanese et al. (2004) também relataram discordância de 61% em mutações em genes de K-RAS e 23% em TP53 em casos de carcinoma colorretal e suas respectivas metástases. Também há estudos encontrando discordância no status mutacional do gene que codifica o rKIT em casos de melanoma acral em seres humanos (Dai B. et al., 2013). Em alguns casos observa-se uma expressão maior de fatores prognósticos negativos na metástase em comparação com o tumor primário, como a marcação mais intensa para COX-2 em metástases de osteossarcoma pediátrico em comparação com o tumor primário em seres humanos (Dickens et al, 2002) ou a alteração do imunofenótipo em metástase linfonodal de tumores de mama de cadela relacionada a pior prognóstico e pior evolução da doença (Beha et al., 2012). Em mastocitomas, já foi relatado mudança no status mutacional entre o tumor primário e sua metástase em dois casos (Amagai et al., 2013), porém não foram avaliadas outras características como graduação histopatológica, expressão de rKIT ou marcação para ki67.

Quando se pensa em tratamento sistêmico para uma neoplasia já apresentando quadro metastático, o objetivo é destruir as células disseminadas, que podem ser biologicamente diferentes do tumor primário, especialmente quando se considera que a neoplasia primária muitas vezes já foi removida cirurgicamente (Cho et al., 2008).

É importante então determinar a concordância entre o imunofenótipo e características histológicas do tumor primário e da metástase, para que seja feita uma melhor utilização de ferramentas diagnósticas, e uma determinação prognóstica de maneira mais eficaz e informada, podendo haver impacto na escolha do tratamento do animal.

### **3. Materiais e Métodos**

Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as diretrizes e aprovação da comissão de ética no uso de animais da Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA/UFMG), protocolo 149/2018 (Anexo 1).

#### **3.1. Coleta de Dados**

Foram utilizadas amostras de tecido de 17 animais da rotina clínica do setor de Oncologia do Hospital Veterinário da UFMG, referentes a casos atendidos no período de março de 2012 a dezembro de 2018

Foram incluídos cães com mastocitoma em estadio II ou mais alto de acordo com a classificação da OMS e com envolvimento de linfonodo regional, diagnosticados através de avaliação histopatológica de linfonodo removido cirurgicamente e com metástase avançada (HN3 de acordo com a classificação de Weishaar et al., 2014). As amostras coletadas consistiram de blocos de parafina de animais que realizaram procedimentos cirúrgicos no decorrer do tratamento e amostras de animais que vieram a óbito ou foram eutanasiados no decorrer da pesquisa e que já haviam sido diagnosticados com mastocitoma metastático. Para indivíduos que apresentavam tumores múltiplos, foi avaliada a lesão com características de pior prognóstico. Nos casos avaliados retrospectivamente em que já haviam análises histológicas e imunohistoquímicas solicitadas pelo clínico responsável, foi feito o levantamento desses dados e a recuperação do bloco de parafina do tumor primário e do linfonodo metastático para complementação das avaliações. Nos casos prospectivos, os exames de histopatologia, imunohistoquímica e PCR que não haviam sido realizados como parte da avaliação oncológica de rotina foram realizados como parte do experimento. Todas as avaliações foram realizadas pelo laboratório especializado Vetpat, em Campinas – SP.

Os dados relativos ao histórico, idade, gênero, estadiamento, localização e tamanho da lesão, tratamento e sobrevida foram obtidos através de acesso ao sistema informatizado do Hospital Veterinário da UFMG.

Foram avaliados fatores prognósticos histológicos, imunohistoquímicos e genéticos do tumor primário e da metástase. Esses fatores foram a graduação histológica pelos sistemas de três níveis (Patnaik et al, 1984) e de dois níveis (Kiupel et al, 2011); o índice proliferativo através da imunomarcagem para Ki67; a expressão celular do receptor KIT e a presença ou não de duplicação interna em tandem no exon 11 do gene *c-KIT*.

Em alguns casos não foi possível a realização de exames no bloco de parafina do linfonodo, por se tratarem de casos mais antigos e as amostras estarem autolisadas. Nesses casos foram utilizados apenas os dados já disponíveis através dos exames realizados no decorrer do tratamento do paciente ou como parte de projeto de pesquisa realizado em 2012, por isso o espaço amostral difere para cada variável analisada.

### **3.2. Avaliação anátomo-patológica**

Todas amostras, retrospectivas e prospectivas, foram avaliadas por no mínimo dois patologistas, no laboratório de patologia Vetpat, em Campinas, SP. Os espécimes cirúrgicos foram avaliados macroscopicamente quanto ao tamanho do fragmento e tamanho tumoral, consistência e coloração. As bordas do fragmento foram marcadas 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 - HPF), 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 porém não houve nenhum caso no grupo amostral avaliado.

Nos linfonodos metastáticos foram avaliados os mesmos parâmetros dentro das limitações relacionadas ao tamanho dos grupamentos celulares, incluindo graduação pelos

estudos de Patnaik et al. (1984) e Kiupel et al. (2011).

### **3.3. Avaliação imuno-histoquímica**

Secções histológicas de 3 µm foram obtidas de porções representativas de cada tumor e fixadas em lâminas gelatinizadas. Os cortes foram desparafinizados e rehidratados em uma sequência de xilol e alcoóis. A recuperação antigênica foi realizada com solução de recuperação (Envision Flex Target Retrieval Solution, High pH, Dako Cytomation) em calor pressurizado (20-25 mmHg, 95 °C/30 minutos). A peroxidase endógena foi bloqueada por imersão em peróxido de hidrogênio a 10%. Em seguida, foi realizada a incubação, a 4°C, por 16 horas (overnight), com anticorpo policlonal de coelho CD1173 (1:300, Dako Cytomation), para avaliação do KITr ou anticorpo monoclonal de camundongo MIB-14 (1:500, Dako Cytomation), para avaliação da proteína Ki-67 (índice de proliferação celular).

Posteriormente, o anticorpo secundário (Envision Flex/HRP, Dako Cytomation) foi incubado em câmara úmida por 30 minutos a 37°C. A revelação da reação foi obtida pelo cromógeno 3,3-diaminobenzidina tetrahydroclorido (Envision Flex DAB + Chromogen Envision Substrate Buffer, Dako Cytomation) e a contracoloração foi realizada com Hematoxilina de Mayer.

O padrão de imunomarcção para KITr foi avaliado a partir da 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 mastocitoma canino previamente testadas e os controles negativos foram obtidos por substituição do anticorpo primário pelo soro normal.

### 3.4. Pesquisa de mutações no gene *c-KIT*

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). A desparafinização foi realizada, previamente, a partir da adição de 700 µL de removedor de parafina e incubação a 30 °C, por 5 minutos, em 3 lavagens consecutivas. 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), 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'-TGGGGTTCCTAAAGTCATTGT-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).

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) e 4 µL de cada oligonucleotídeo iniciador (*c-KIT* F e *c-KIT* R). A programação no termociclador GenePro (BIOER Technology) inclui 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), constituindo 10µL na proporção 10:1, e aplicado em gel de agarose 1,2 %, com tampão Tris-borato-EDTA, 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), Blue Green Loading Dye (LGC Biotecnologia) e água miliqué, na proporção 1:1:2, é aplicado no mesmo volume.

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

### 3.5. Análise Estatística

Os dados foram preparados para análise. Os índices de concordância Kappa e Kappa ponderado para todas as variáveis foram calculados segundo Cohen (1960) e Fleiss et al., (1969) (Tabela 5). A correlação intraclasse foi calculada segundo Shrout & Fleiss (1979). O diagrama de Bland–Altman para as variáveis índice mitótico e Ki67 foi construído segundo Bland & Altman (1986). Detalhes dos métodos utilizados e suas interpretações para a área da saúde estão descritas em Ranganathan et al., (2017).

Tabela 6 - valores de referência para o índice de concordância de Kappa (Landis & Koch, 1977)

<b>Valor de Kappa</b>	<b>Interpretação</b>
<b>&lt;0</b>	Ausência de concordância
<b>0 - 0,19</b>	Concordância pobre
<b>0,20 - 0,39</b>	Concordância leve
<b>0,40 - 0,59</b>	Concordância moderada
<b>0,60 - 0,79</b>	Concordância substantiva
<b>0,80 - 1,00</b>	Concordância quase perfeita

A sobrevida e o intervalo livre de doença foram avaliados de acordo com o método de Kaplan-Meier (Kaplan & Meier, 1958), sendo censurados os pacientes que vieram a óbito por outras causas e aqueles que foram eutanasiados no momento do diagnóstico. A avaliação da correlação entre o índice de ki67 e o índice mitótico foi realizada através da correlação linear de Pearson.

Todas as análises estatísticas foram realizadas através do software R versão 3.6.1 (R Core Team, 2019).

#### **4. Resultados e Discussão**

Foram incluídos nesse estudo 17 cães apresentando uma ou mais lesões cutâneas de mastocitoma e com metástase em linfonodo, com idades entre 6 e 20 anos, média de  $11 \pm 3,6$  anos. A idade foi compatível com os dados da literatura de que a ocorrência é mais frequente em animais mais velhos, porém acima da média de 8 a 9 anos descrita em London e Thamm (2013).

Dos 17 animais, 47% (8) eram fêmeas e 53% (9) eram machos, em concordância com a literatura, que diz não haver predisposição de gênero para a ocorrência de mastocitomas (Welle et al, 2008; London e Thamm, 2013). Foram registrados indivíduos de várias raças, sendo as únicas com mais de uma ocorrência o Shar-pei (dois indivíduos, ou 12% dos casos) e cães sem raça definida (três indivíduos, ou 18% dos casos). A incidência de mastocitomas metastáticos e de comportamento agressivo em Shar-peis já foi descrita (Welle et al, 2008; London e Thamm, 2013), sendo frequente uma progressão rápida e desfavorável em indivíduos dessa raça. Outras raças encontradas no presente estudo também são citadas como predispostas a desenvolverem mastocitomas, como Labrador, Pug, Golden Retriever, Schnauzer e Cocker (Patnaik et al, 1984; Bostock, 1986; London e Thamm, 2013).

Foi observada uma maior ocorrência de tumores em região de prepúcio e escroto (35%) seguido de tumores nos membros (23%) e mama (17%). Tumores de região prepucial e escrotal estão associados com pior prognóstico (Cahalane et al, 2004; London e Thamm, 2013), e na prática clínica do setor de oncologia da UFMG temos observado um pior comportamento dos mastocitomas localizados em pele da região das mamas, embora seja apenas uma evidência anedotal.

Em relação ao tamanho, 76% (13/17) dos animais tinham tumor primário maior que 3cm no momento do diagnóstico, reforçando a hipótese de que tamanho da lesão está relacionado com pior comportamento da doença, como sugerido também por London e Thamm (2013). No presente estudo, 70% (12/17) das lesões primárias estavam ulceradas, também de acordo com a literatura (Mullins et al, 2006; ), que associa a presença de ulceração com um pior prognóstico.



#### **4.1. Tratamento**

Onze animais foram tratados com cirurgia e terapia adjuvante. Todos receberam Lomustina como parte do protocolo de tratamento, que consiste de 4 a 6 sessões com intervalo de 21 dias, na dose de 60 a 90 mg/m<sup>2</sup>. Três animais receberam Clorambucil em dose metronômica, de 4-6mg/m<sup>2</sup> a cada 48 horas, durante 8 semanas, após o fim do protocolo com Lomustina. Todos os protocolos incluíram a administração de prednisona, na dose de 40 mg/m<sup>2</sup>, diariamente, durante os primeiros sete dias, seguida por 25 mg/m<sup>2</sup>, também diariamente, durante 30 dias e, por fim, na dose de 25 mg/m<sup>2</sup>, a cada 48 horas, por mais 60 dias. Alguns animais receberam, ainda, terapia de resgate com outros fármacos, de forma que dois animais também receberam Vimblastina, dois receberam Masitinib, e um animal foi tratado com Vimblastina, Lomustina e Masitinib em momentos diferentes.

Um animal realizou apenas biópsia incisional e posteriormente foi tratado com Lomustina, apresentando doença progressiva e óbito após 37 dias. Dois animais foram eutanasiados logo após o diagnóstico por apresentarem quadro avançado e os tutores declinarem o tratamento. Outros dois pacientes realizaram a cirurgia, mas os tutores declinaram da complementação quimioterápica, e um animal veio a óbito no pós-operatório imediato devido à injúria renal aguda.

Não foram realizadas avaliações de correlação entre as variáveis analisadas, sua variação entre tumor primário e linfonodo e ILD e SG, pois não houve padronização dos protocolos de tratamento estabelecidos, por se tratar de um estudo retrospectivo. A influência das características mensuradas no ILD e SG não poderia ser considerada de forma confiável devido a influência dos diferentes tratamentos no resultado final de cada indivíduo.

#### **4.2. Graduação Histológica**

Para a graduação de Patnaik, foram avaliados 14 casos – 12 casos prospectivos e 2 casos antigos para os quais já havia essa variável avaliada no tumor primário e no linfonodo. Em sete casos (50%) a graduação do linfonodo e do tumor primário foi a mesma, em cinco casos (36%), a graduação do linfonodo foi inferior à do tumor primário e em dois casos (14%), a graduação do linfonodo foi superior à do tumor primário (Tabela 6). Não houve concordância entre a graduação do tumor primário e do linfonodo metastático, sendo encontrado um valor

Kappa ponderado de -0,06 (valor  $p = 0,78$ ) com um intervalo de 95% de confiança entre -0.35 e 0.53. Para a graduação do linfonodo são consideradas as características morfológicas celulares e o índice mitótico determinados por Patnaik et al. no estabelecimento do modelo de graduação, já que não pode ser avaliado o nível de invasão das camadas da derme, edema adjacente, e na metástase normalmente não é observada necrose.

Tabela 7 – Valores da Graduação de Patnaik (1984) para tumores primários e linfonodos

		Tumor Primário		
		I	II	III
Linfonodo	I	0	0	1
	II	0	4	4
	III	0	2	3

Para a graduação de Kiupel, foram avaliados 12 casos. Em nove casos (75%) houve concordância do tumor primário e do linfonodo como Alto Grau, e em três casos (25%) a metástase apresentou características compatíveis com o alto grau de Kiupel, enquanto o tumor primário foi considerado de baixo grau (Tabela 7). Não houve concordância entre a graduação do tumor primário e do linfonodo metastático, sendo encontrado um valor do índice de concordância Kappa para esta variável igual a zero, pois todas as classificações do Linfonodo foram “Alto Grau”, não havendo nenhuma classificação “Baixo Grau”. Não foi possível calcular o valor  $p$  e o intervalo de 95% de confiança. Embora o sistema de Kiupel também não tenha sido definido para graduação de metástases, sua utilização encontra menos desafios, pois as características avaliadas dependem apenas da existência de uma amostra tecidual que permita a avaliação de 10 campos (40x) para contagem das células apresentando as características definidoras de alto ou baixo grau, o que deve ser possível na maioria das macrometástases (HN3 de acordo com Weishaar et al., 2014).

Tabela 8 – Valores da Graduação de Kiupel (2011) para tumores primários e linfonodos

		Tumor Primário	
		Alto	Baixo
Linfonodo	Alto	9	3
	Baixo	0	0

Entre os tumores primários, 25% (3/12) foram classificados como grau II/Baixo Grau, 17% (2/12) como Grau II/Alto Grau, e 58% (7/12) como grau III/Alto Grau. A incidência alta de tumores de alto grau está de acordo com o esperado para um grupo composto apenas por animais de estadiamento avançado e prognóstico desfavorável. É interessante observar que, caso houvesse sido realizada graduação ou exérese apenas do tumor primário, ou caso não houvesse sido realizados exames de imunohistoquímica e PCR, 25% desses casos poderiam ter sido subtratados por apresentarem características histológicas mais favoráveis, já que foram classificados como grau II/Baixo Grau no tumor primário mas apresentavam metástase em linfonodo de graduação mais alta. É interessante também observar que quando se considera isoladamente a graduação histopatológica grau II/Baixo Grau destes tumores primários, seria esperado uma evolução menos agressiva (Kiupel et al., 2011; Takeushi et al., 2013; Sabattini et al., 2015; Horta et al., 2018), porém todos esses indivíduos apresentaram progressão com metástase em linfonodo e óbito em decorrência do mastocitoma, demonstrando que a graduação histopatológica deve sempre ser avaliada em conjunto com outros fatores prognósticos, não apenas nos casos de graduação intermediária.

### 4.3. Proliferação celular

O índice mitótico (IM) foi avaliado em 12 casos, nos quais também se avaliou o índice de Ki67. Os valores de mitoses no tumor primário variaram entre 2-17, com uma média de  $8,2 \pm 5,6$  figuras de mitose em 10 campos de maior aumento, sendo que cinco casos apresentaram IM abaixo do valor de corte de cinco mitoses em 10 campos (40x) estabelecido por Romansik et al. (2007), e apenas um caso apresentou IM abaixo do valor de corte de duas ou mais mitoses encontrado por Horta et al (2018). Nos 12 linfonodos correspondentes, o IM variou entre 2-42,

com uma média de  $17,2 \pm 14,1$  figuras de mitose em 10 campos de maior aumento, sendo que em dois casos a metástase apresentou IM inferior a cinco figuras de mitose, porém em nenhum caso o IM da metástase foi inferior a 2.

Quando a taxa de proliferação foi avaliada pelo IM, não houve concordância entre o número de mitoses do tumor primário e do linfonodo. O valor da correlação intraclassa foi de -0,14 (valor  $p = 0,67$ ) com um intervalo de 95% de confiança entre -0.63 e 0.45. Pelo gráfico de dispersão abaixo (Figura 2), nota-se uma associação fraca entre os valores de Mitose para o tumor primário e o linfonodo. Houve aumento no número de mitoses da metástase em comparação com o tumor primário em 75% (9) dos casos, e uma diminuição do valor de mitoses no linfonodo em 25% (3) dos casos. Não houve nenhum caso de valores próximos da concordância, como se pode observar no gráfico. Há três valores baixos de Mitose do tumor primário associados a valores elevados no linfonodo.

A diferença média entre as mitoses no tumor primário e no linfonodo foi de -9,6 com um intervalo de 95% de confiança entre -39,9 e 20,7, sendo um intervalo muito amplo em relação à média dessa variável (Figura 3). A concordância varia em relação ao valor de mitose mensurado, sendo observado que para baixos valores de IM no tumor primário podem ocorrer valores altos no linfonodo do paciente. Para valores altos de IM no tumor primário há uma maior tendência de que seja observado um IM elevado também no linfonodo.

Figura 2 : Gráfico de dispersão para a variável Índice Mitótico

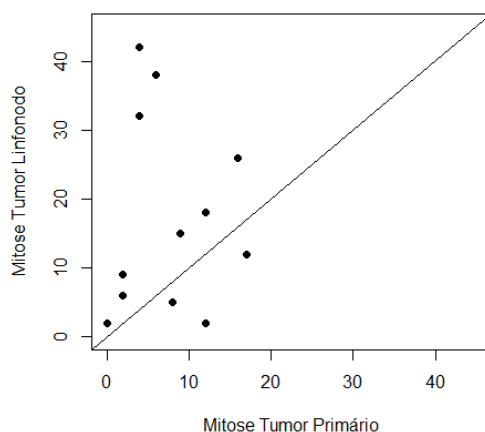
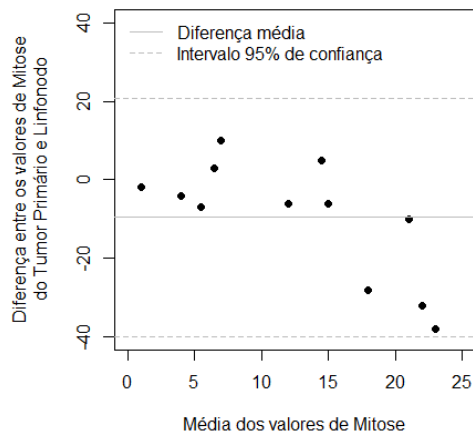


Figura 3: Diagrama de Bland-Altman para a variável Índice Mitótico



Doze animais tinham os blocos de parafina em boa condição para realização de imunohistoquímica para Ki67. O valor médio de Ki67 para os tumores primários foi de 10,1%, sendo que seis casos tinham índice de Ki67 superior ao valor de corte de 5,6% encontrado por Horta et al (2018) e de 7% adotado por Strefezzi et al (2010) e seis tinham índice inferior. Já nos 12 linfonodos correspondentes, o valor médio de Ki67 foi de 4,7%, sendo que três casos (25%) tinham índice de Ki67 superior ao valor de corte de 7% e 9 casos (75%) tinham o índice inferior. Não foi encontrada concordância significativa entre os valores de Ki67 para o tumor primário e o linfonodo.

O valor da correlação intraclassa foi de -0,08 (valor  $p = 0,60$ ) com um intervalo de 95% de confiança entre -0.59 e 0.49. Pelo gráfico de dispersão abaixo (Figura 4), nota-se uma associação fraca entre os valores de Ki67 para o tumor primário e o linfonodo. Não houve nenhum caso de concordância exata entre o índice para os dois fragmentos. Houve aumento do índice de Ki67 na metástase em comparação com a lesão primária em 33% (5/12) dos casos e uma redução da taxa de proliferação em 67% (8/12) dos linfonodos. Porém em quatro casos a variação foi muito pequena, eventos representados no gráfico como os pontos próximos à reta. Excluindo estes casos de variação muito discreta (menos que 0,5% no índice de Ki67), houve

aumento do índice de Ki67 na metástase em comparação com a lesão primária em 37% (3/12) dos casos e uma redução da taxa de proliferação em 62% (5/12) dos linfonodos.

Esse resultado pode ser preocupante quando se considera que um animal pode deixar de receber terapia adjuvante caso se avalie apenas uma lesão com Ki67 baixo, já que não foi verificada uma concordância significativa entre os valores de Ki67 para o tumor primário e o linfonodo.

Para o diagrama de Bland-Altman (Figura 5) a diferença média (Ki67 tumor primário – Ki67 linfonodo) foi de -0,06 com um intervalo de 95% de confiança entre -0,20 e 0,32, sendo um intervalo muito amplo em relação à média dessa variável. A concordância entre tumor primário e linfonodo varia em relação ao valor de Ki67 mensurado, sendo que valores baixos de Ki67 no tumor primário estão mais frequentemente relacionados a valores baixos de Ki67 no linfonodo, enquanto que para valores altos de Ki67 no tumor primário podem ser encontrados valores baixos no linfonodo. Podem inclusive ser observados no gráfico dois valores elevados de Ki67 do tumor primário associados a valores baixos no linfonodo.

Figura 4: Gráfico de dispersão para a variável Ki67

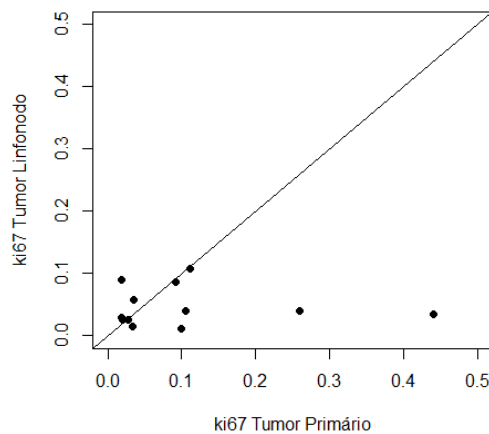
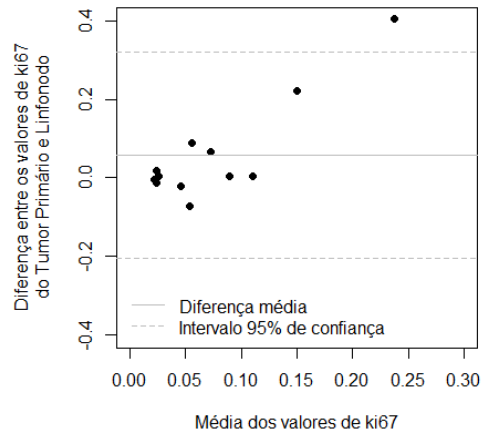


Figura 5: Diagrama de Bland-Altman para a variável Ki67



Além disso, não foi encontrada correlação significativa entre os valores de Ki67 e Índice Mitótico. A correlação linear de Pearson entre as variáveis Mitoses e Ki67 não foi significativa (valor  $p = 0,18$ ) e teve um valor de  $-0,26$  com um intervalo de 95% de confiança de  $-0,58$  a  $0,13$ . Embora estudos tenham encontrado uma correlação moderada entre o IM e o ki67 (Scase et al., 2006; Webster et al., 2007, Horta et al., 2018), neste estudo não foi verificada tal correlação, possivelmente devido ao grupo amostral reduzido.

Como o índice mitótico identifica apenas as células que se encontram na fase M do ciclo celular, a quantidade de células que estão de fato em processo de divisão celular pode ser subestimada, e, portanto não deve ser usado como único marcador de proliferação (Sledge et al., 2016; Kiupel et al., 2019), mas deve ser sempre considerado, por ter correlação com o prognóstico e por ser uma avaliação facilmente executável e de baixo custo (Sledge et al, 2016). A melhor forma de se avaliar a proliferação celular é através do uso de um marcador de fração de crescimento (como o ki67) associado a um marcador de tempo de geração (como AgNORs, ainda pouco disponíveis na prática no Brasil), porém o ki67 é considerado por si só um marcador prognóstico independente (Webster et al., 2007; Strefezzi et al., 2010; Horta et al.,

2012) e deve compor um painel de avaliação de risco dos casos de mastocitoma.

#### 4.4. KIT

Foram avaliados 17 casos quanto à expressão do receptor KIT através da imunomarcção para CD117 no tumor primário e no linfonodo. Foi verificada uma concordância marginalmente significativa entre o tumor primário e o linfonodo. O valor Kappa ponderado foi de 0,40 (valor  $p = 0,07$ ) com um intervalo de 95% de confiança entre -0.03 e 0.82.

Nesses 17 casos, 10 (59%) tiveram padrão de expressão de KIT igual no linfonodo e no tumor primário. Entre os casos que apresentaram mudança na expressão, quatro (23%) linfonodos apresentaram expressão em padrão mais próximo do fisiológico quando em comparação com o tumor primário, e três (18%) apresentaram um padrão de KIT mais aberrante no linfonodo em comparação com o tumor primário (Tabela 9). Em 3 casos o tumor primário apresentava padrão de KIT membranar (KIT I), e no linfonodo apresentou marcação aberrante, assim como houveram 3 casos em que a metástase apresentou padrão de KIT I e no tumor primário a marcação foi no padrão KIT II. Nesses pacientes, caso houvesse sido realizada avaliação de apenas uma das lesões, poderia ter ocorrido subtratamento devido à uma identificação daquele tumor como de comportamento menos agressivo.

Tabela 9 – Padrão de expressão de KIT para tumores primários e linfonodos

		Tumor Primário		
		I	II	III
Linfonodo	I	2	3	0
	II	3	7	1
	III	0	0	1



A presença de mutações no exon 11 do proto-oncogene *c-KIT* no tumor primário e sua respectiva metástase nodal foi avaliada em 17 animais. Não foi verificada uma concordância significativa. O valor Kappa foi de 0,11 (valor  $p = 0,69$ ) com um intervalo de 95% de confiança entre -0.40 e 0.61. Foi observada uma incidência de mutação de 35% (6/17 animais), maior do que os 10% relatados por Horta et al (2018). Isso pode estar relacionado ao estadió mais avançado dos pacientes envolvidos neste estudo, tanto como fator sugestivo de prognóstico mais desfavorável no momento do diagnóstico quanto por possibilidade de ocorrência de mutação ao longo da progressão da doença (Downing et al., 2002; Webster et al., 2006; Takeuchi et al., 2013). Dentre os 17 casos, 12 (70%) mantiveram o mesmo status mutacional, 3 casos (17%) adquiriram mutação na metástase e 2 casos (11%) tiveram o gene normal na metástase apesar da presença de duplicação no tumor primário (Tabela 10). A alta incidência de mutações encontrada em um grupo composto por animais de estadió avançado e pior prognóstico pode ajudar a direcionar a realização da pesquisa de mutação nos pacientes, mostrando que é importante realizar este exame nos animais considerados de risco alto a intermediário.

Tabela 10 – Presença de duplicações internas em tandem no exon 11 do gene *c-KIT* para tumores primários e linfonodos

		<b>Tumor Primário</b>	
		<b>Duplicação</b>	<b>Normal</b>
<b>Linfonodo</b>	<b>Duplicação</b>	1	3
	<b>Normal</b>	2	11

Estudos anteriores avaliaram a concordância entre tumor primário e sua metástase nodal com relação à presença de duplicações internas em tandem (ITD) no exon 11, e encontraram resultados variáveis. Amagai et al. (2013) encontraram discordância em dois casos de mastocitoma cutâneo com relação à metástase – um caso de metástase em linfonodo e outro em cavidade peritoneal. Foi realizada pesquisa de mutações no exon 11 através de PCR para as diferentes lesões do mesmo indivíduo, seguido de sequenciamento das amostras do PCR para identificação das sequências mutadas. O estudo conclui que é importante realizar a avaliação

genética das diversas lesões de mastocitoma em um mesmo indivíduo para uma melhor previsão da resposta aos ITK e do prognóstico. Embora Marconato et al (2014) tenham encontrado 100% de concordância em avaliação semelhante, tal resultado não pode ser considerado conclusivo para definição de condutas pois se trata de um evento definitivo, já que uma vez que se evidencia a ocorrência da divergência de mutação entre o tumor primário e a metástase está estabelecida a possibilidade desta ocorrência, independentemente dos resultados negativos prévios.

Amagai et al. (2013) encontraram discordância quando avaliou a presença de ITD em um grupo de 12 animais com mastocitomas múltiplos, embora o estudo não especifique quantos desses indivíduos tinham metástases e quantos tinham lesões cutâneas múltiplas. Sabemos pelos resultados de Horta et al (2018) que a presença de metástase em linfonodo em animais com lesões múltiplas ou únicas tem um prognóstico mais desfavorável em comparação com animais com lesões cutâneas múltiplas porém sem metástase, resultado que inclusive consolidou a sugestão de uma nova proposta de estadiamento para os mastocitomas caninos. A noção de que a ocorrência de ITD no exon 11 contribui para um comportamento tumoral mais agressivo já foi descrita (Zemke et al, 2002; Amagai et al, 2013; Horta et al, 2018) e é reforçada pelos resultados obtidos aqui, devido a uma maior incidência de duplicações em mastocitomas de pior prognóstico. Portanto não é surpreendente que o presente estudo, que incluiu apenas animais classificados como estadio III (de acordo com a proposta revista de Horta et al., 2018), tenha encontrado uma incidência maior de ITD do que o descrito previamente.

Mastocitomas que apresentam ITDs apresentaram melhor resposta a terapias alvo com inibidores de tirosina kinase (ITKs), medicamentos que tem sido cada vez mais utilizados na oncologia veterinária, embora animais sem a mutação possam também apresentar boa resposta ao tratamento (Hahn et al., 2008,2010; London et al., 2009).

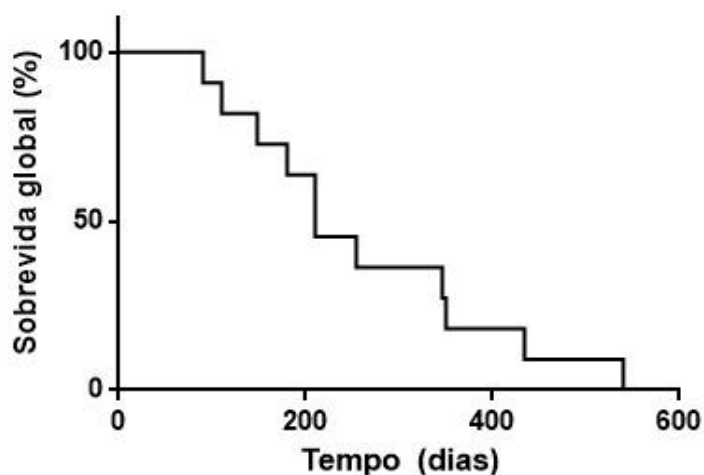
A ausência de mutação no tumor primário não necessariamente significa ausência de mutação na metástase, portanto a realização dessa análise apenas em uma das lesões pode se mostrar ineficiente para a indicação e predição de resposta a esse tipo de medicamento, conforme descrito por Amagai et al. (2013). Além disso, outras mutações com ganho de função já foram descritas em outras porções do proto-oncogene *c-KIT* (Letard et al., 2008), e é observada resposta aos ITKs em pacientes em que não foi observada presença de ITDs no exon 11, único segmento do gen avaliado rotineiramente, assim como ausência de resposta ou resposta aquém do esperado em pacientes em que a duplicação é identificada. Tais mutações

podem estar ocorrendo de maneira dinâmica, contribuindo para a carcinogênese e progressão tumoral em certos estágios da doença, mas não sendo perpetuadas quando não houver vantagem evolutiva para superação das adversidades impostas pelo organismo e microambiente tumoral (Amagai et al., 2013).

#### 4.5. Sobrevida

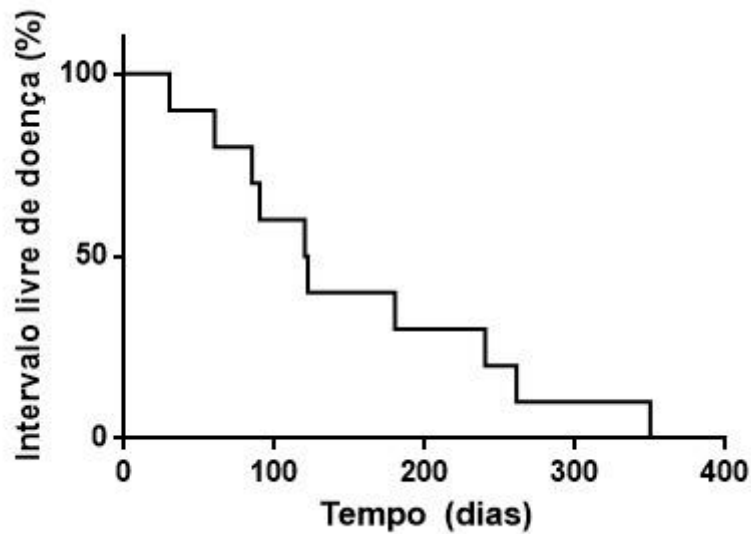
Seis animais foram censurados da análise de sobrevida, quatro não foram tratados por recusa do tutor, um veio a óbito no pós-operatório imediato devido a injúria renal aguda, e um realizou apenas biópsia incisional e posterior tratamento com TKIs, sem atingir remissão. No presente estudo 11/17 (65%) animais receberam tratamento com cirurgia e quimioterapia adjuvante – foram utilizados protocolos com Lomustina e Prednisona, além de Vimblastina e Chlorambucil em alguns casos - ou TKIs, de acordo com a indicação clínica do oncologista responsável pelo caso. A mediana de sobrevida global (SG) foi atingida aos 210 dias para os animais tratados (Figura 6).

Figura 6: Curva de Sobrevida Global para os animais tratados



O intervalo livre de doença (ILD) foi definido como o tempo decorrido entre o evento cirúrgico onde se atingiu controle local e a progressão da doença, na forma de recidiva ou ocorrência de metástase. A mediana para ILD foi atingida aos 121 dias para o mesmo grupo de animais (Figura 7).

Figura 7: Curva de Intervalo Livre de Doença para os animais tratados



Todos os animais incluídos no estudo podem ser considerados pacientes de alto risco e de prognóstico desfavorável de acordo com Horta et al. (2018), mas também Blackwood et al. (2012), por já apresentarem metástase em linfonodo. Não é surpreendente então que todos os animais tenham vindo a óbito em decorrência do mastocitoma.

A sobrevida e ILD encontrados (medianas de 210 e 121 dias, respectivamente) se assemelham àqueles encontrados por Hume et al (2011), que observou ILD e SG para animais com metástase em linfonodo, tratada localmente com cirurgia ou radioterapia, de 133 dias e 240 dias, respectivamente. Nesse mesmo estudo, animais com metástase em linfonodo que não receberam tratamento local tiveram uma sobrevida de 42 dias, mostrando que animais com metástase em linfonodo podem ter uma maior sobrevida com tratamento (local e sistêmico) e que o diagnóstico de doença metastática não significa que não se deva investir no tratamento com intenção de controle de doença, ao invés de apenas paliativo.

A probabilidade de metástase pode ser extremamente baixa em alguns pacientes (Warland et al., 2014), e o estadiamento deve ser realizado de acordo com uma avaliação individualizada do risco daquele paciente segundo Blackwood et al. (2012). Todos os animais devem passar por exame físico, com avaliação cuidadosa em busca de novas lesões na pele, mas também com investigação dos linfonodos regionais, seguindo o diagrama de drenagem linfática da Figura 7 (Kiupel et al., 2019), com avaliação citológica e/ou análise histopatológica, com a remoção do linfonodo durante a biópsia incisional ou excisão definitiva (Horta et al., 2018).

A interpretação do exame citológico dos linfonodos deve ser cuidadosa, pois até 24% dos cães hípidos podem apresentar mastócitos fisiológicos, em concentrações aumentadas, nos linfonodos (Bookbinder et al., 1992), e mastocitomas podem recrutar mastócitos inflamatórios para o linfonodo regional, especialmente após manipulação (Kiupele et al., 2019). Na ocorrência de metástase em linfonodos ou em mastocitomas em locais com potencial drenagem para linfonodos internos, recomenda-se o estadiamento completo, incluindo realização de exames de imagem, com destaque para a ultrassonografia abdominal (Blackwood et al., 2012; Warland et al., 2015), podendo chegar à indicação de tomografia computadorizada, na presença de imagens suspeitas em locais em que a conduta sofreria alteração. Nos casos em que se suspeite de metástase à distância, um melhor estadiamento pode incluir a avaliação citológica, com punção guiada pela ultrassonografia ou tomografia de alterações suspeitas no tórax ou abdômen. Em casos em que haja suspeita de invasão medular ou mastocitemia, pode ser realizada punção de medula óssea e mielograma, embora o acometimento medular seja raro e usualmente associado a um quadro clínico terminal grave (Dobson e Scase, 2007; Welle et al., 2008; London e Thamm, 2013; Warland et al., 2014).

## **5. Conclusão**

Com os resultados obtidos, concluímos que é importante realizar a avaliação histológica, imunohistoquímica e genética dos mastocitomas primários e das metástases em linfonodo quando ocorrerem. A concordância entre tumor primário e metástase foi baixa para todos os parâmetros avaliados: status mutacional, graduação histopatológica, expressão de KIT, ki67 e índice mitótico. Assim, sugere-se a avaliação histológica, imunohistoquímica e genética das lesões primárias e metastáticas em mastocitoma de cão.

Animais de estadiamento avançado e com mastocitomas de alto risco tem maior chance de apresentar ITD no exon 11 do gene *c-KIT*, quando comparados com estudos que avaliam populações de pacientes de mastocitoma de estadiamentos variados.

É importante avaliar o painel de fatores prognósticos do mastocitoma canino em conjunto, pois foram observados animais com tumores de Grau II/Baixo Grau, baixo IM, baixo ki67, expressão de KIT em padrão membranar e ausência de mutação, características que se avaliadas isoladamente poderiam indicar comportamento menos agressivo e bom prognóstico, e que desenvolveram quadros avançados e vieram a óbito em decorrência da doença.

## 6. Considerações Finais

O mastocitoma é uma neoplasia de grande importância na prática oncológica veterinária, tanto por sua prevalência quanto pela mortalidade associada aos casos de comportamento agressivo. A definição de conduta e tratamento permanece desafiadora, especialmente naqueles casos de grau II de Patnaik, que podem apresentar comportamento variável. Para uma maior segurança na tomada de decisão, é importante que o clínico oncologista se muna de informações que são sabidamente relevantes para o prognóstico desse tipo de paciente. Para uma avaliação abrangente do prognóstico desse paciente, são avaliados os seguintes parâmetros: tamanho, localização, raça, presença de ulceração e síndromes paraneoplásicas, estadiamento, histórico de recorrência, graduação histológica de Kiupel e Patnaik, índice mitótico, invasão de linfáticos, margens cirúrgicas, distribuição predominante (cordão ou manto), infiltrado eosinofílico, Ki67, expressão de KIT e mutação do proto-oncogene *c-KIT*. Com todas essas informações em mãos, o clínico pode definir melhor sua conduta e oferecer tratamentos mais adequados e personalizados à necessidade de cada indivíduo.

As evidências agrupadas no presente estudo apontam para uma definição de conduta importante no manejo e avaliação de pacientes com mastocitoma, que acrescenta complexidade à interpretação dos resultados de exame: é importante a avaliação dos fatores prognósticos na lesão primária e no linfonodo, caso haja evidência de metástase. Os fatores prognósticos podem diferir significativamente entre um sítio e outro, e interferir na avaliação prognóstica e de tratamento daquele paciente. Embora todo paciente com metástase em linfonodo já seja por si só candidato à complementação terapêutica além da cirurgia, a avaliação dos fatores dá uma noção melhor do prognóstico e da escolha do protocolo terapêutico, ainda mais sabendo-se que quando o linfonodo é tratado localmente, há diferença em sobrevida e ILD. Além disso, considerando-se a maior indicação dos pacientes com ITD no exon 11 do gene *c-KIT* a receberem tratamento com ITKs e sua melhor resposta a essas terapias, a detecção de mutação no linfonodo pode determinar a conduta terapêutica deste paciente, mesmo quando não há mutação no tumor primário.

Além disso, uma investigação adequada dos linfonodos que drenam a região acometida pelo mastocitoma é fundamental para que não ocorra subtratamento de pacientes com doença disseminada. A investigação de linfonodos suspeitos através de citologia é um exame de triagem que deve ser avaliado com cuidado, sendo a histopatologia definitiva para confirmação

do acometimento linfonodal significativo.

Porém, o que se vê na maioria das práticas clínicas ainda é uma sub-utilização desses exames e um estadiamento inadequado desses pacientes, seja por desconhecimento ou limitação financeira. Infelizmente esses exames e o tratamento oncológico veterinário ainda são uma realidade elitizada. O que não pode continuar ocorrendo é, nas situações em que é financeira e estruturalmente possível a realização de exames complementares e complementação terapêutica adequada, que isso não seja realizado por desconhecimento dos fatores prognósticos de relevância e a forma de avaliá-los. Este trabalho complementa então a definição do painel de avaliação do paciente de mastocitoma, demonstrando a importância de se avaliar as lesões primárias e metastáticas do paciente para melhor avaliação prognóstica e tratamento adequado.

## 7. Referências Bibliográficas

ALBANESE, I.; SCIBETTA, A.G.; MIGLIAVACCA, M. et al. Heterogeneity within and between primary colorectal carcinomas and matched metastases as revealed by analysis of Ki-ras and p53 mutations. *Biochem Biophys Res Commun.*, v.325, p.784-91, 2004.

AMAGAI, Y.; TANAKA, A.; MATSUDA, A.; et al. Heterogeneity of internal tandem duplications in the c-KIT of dogs with multiple mast cell tumours. *Journal of Small Animal Practice*, v.54, n.7, p.377-380, 2013.

ARAÚJO, M.R.; PREIS, I.S.; LAVALLE, G.E.; et al. Histomorphological and immunohistochemical characterization of 172 cutaneous round cell tumours in dogs. *Pesq Veter Bras*, v.32, n.8, p.772-780, 2012.

BEHA, G.; BRUNETTI, B.; ASPRONI, P. et al. Molecular portrait-based correlation between primary canine mammary tumor and its lymph node metastasis: possible prognostic-predictive models and/or stronghold for specific treatments?. *BMC veterinary research*, v.8(1), p.219, 2012.

BLACKWOOD, L.; MURPHY, S.; BURACCO, P. et al. European consensus document on mast cell tumours in dogs and cats. *Vet Comp Oncol*, v10(3), e1–e29, 2012.

BOOKBINDER, P.F.; BUTT, M.T.; HARVEY, H.J.. Determination of the number of mast cells in lymph node, bone marrow, and buffy coat cytologic specimens from dogs. *J Am Vet Med Assoc*, v.200(11), p.1648–1650, 1992.

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

CAHALANE, A.K.; PAYNE, S.; BARBER, L.G.; et al. Prognostic factors for survival of dogs with inguinal and perineal mast cell tumors treated surgically with or without adjunctive treatment: 68 cases (1994-2002), *J Am Vet Med Assoc*, v.225, n.3, p.401-408, 2004.



CHO, E. Y.; HAN, J. J.; CHOI, Y. L. et al . Comparison of Her-2, EGFR and cyclin D1 in primary breast cancer and paired metastatic lymph nodes: an immunohistochemical and chromogenic in situ hybridization study. *J Kor Med Sci*, v.23(6), p.1053-1061, 2008.

DA COSTA, R. M. C-KIT as a prognostic and therapeutic marker in canine cutaneous mast cell tumours: from laboratory to clinic. *Vet J*, v.205(1), p.5-10, 2015.

DAI, B.; CAI, X.; KONG, Y-Y. et al. Analysis of KIT expression and gene mutation in human acral melanoma: With a comparison between primary tumors and corresponding metastases/recurrences. *Hum Pathol*, v.44, p.1472–1478, 2013.

DICKENS, D., KOZIELSKI, R., KHAN, J. et al. Cyclooxygenase-2 Expression in Pediatric Sarcomas. *Ped Dev Pathol*, v.5, p.356-64, 2002

DOBSON, J.M.; SCASE, T.J. Advances in the diagnosis and management of cutaneous mast cell tumours in dogs. *J Small Anim Pract*, v.48: p.424–431, 2007

DOWNING, S., CHIEN, M.B., KAAS, P.H., et al. Prevalence and importance of internal tandem duplications in exons 11 and 12 of c-KIT in mast cell tumors of dogs. *Am J Vet Res*, v.63, p.1718–1723, 2002.

FERRARI, R., MARCONATO, L., BURACCO, P. et al. The impact of extirpation of nonpalpable/normal-sized regional lymph nodes on staging of canine cutaneous mast cell tumours: a multicentric retrospective study. *Vet Comp Oncol*; v.16(4), p.505–10, 2018.

FIDLER, I.J., KRIPKE, M.L. Metastasis results from preexisting variant cells within a malignant tumor. *Science*, v197, p.893–895, 1977.

FONSECA-ALVES, C.E.; BENTO D.D.; TORRES NETO R.; et al. Ki67/KIT double immunohistochemical staining in cutaneous mast cell tumors from Boxer dogs. *Res in Vet Science*, 2015.

FULCHER, R.P.; LUDWIG, L.L.; BERGMAN, P.J. et al. Evaluation of two centimetre lateral surgical margin for excision of grade I and grade II cutaneous mast cell tumours in dogs. *JAVMA*, v.228(2), p.210-215, 2006.

GOVIER, S.M. Principles of treatment for mast cell tumors. *Clin Tech in Small Anim Pract*, v.18, p.103-106, 2003.

GRANO, F.G., SILVA, J.E., MELO, G.D., et al. Visceral mast cell tumor and mastocytosis in a dog. *Braz J of Vet Path*, v.5(3), p.142-145, 2012

GRIER, R.L.; DI GUARDO, G.; SCHAFFER, C.B. et al. Mast cell tumor destruction by deionized water. *Am J Vet Res*, v.51, p.1116–1120, 1990.

GROSS, T.L.; IHRKE, P.J.; WALDER, E.J. et al. Mast cell tumors. In: GROSS, T.L.; IHRKE, P.J.; WALDER, E.J. et al. *Skin disease of the clinical and histopathologic diagnosis*. 2nd ed. Oxford, UK: Blackwell Publishing Company; 2005:853–865.

HAHN, K.A. OGILVIE, G.K; RUSK, T. et al. Masitinib is safe and effective for the treatment of canine mast cell tumors. *J Vet Int Med*, v.22, n.6, p.1301-1309, 2008.

HAHN, K.A.; LEGENDRE, A.M.; SHAW, N.G. et al. Evaluation of 12- and 24-month survival rates after treatment with masitinib in dogs with nonresectable mast cell tumors. *Am J Vet Res*, v.71, n.11, p.1354-1361, 2010.

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

HORTA, R.S., GIULIANO, A. ; LAVALLE, G. et al. Clinical, histological, immunohistochemical and genetic factors associated with measurable response of high-risk canine mast cell tumours to tyrosine kinase inhibitors. *Oncol Lett*, v.15, p.129-136, 2017.

HORTA, R.S., LAVALLE, G. E. ; COSTA, M. P. et al. Outcome of adjuvant chemotherapy with lomustine, vinblastine and chlorambucil on management of canine mast cell tumour of high to intermediate risk. *Arq Bras Med Vet Zoo*, v.69, p.1426-1436, 2017.

HORTA, R. S., LAVALLE, G. E., MONTEIRO, L. N. et al. Assessment of Canine Mast Cell Tumor Mortality Risk Based on Clinical, Histologic, Immunohistochemical, and Molecular Features. *Vet Pathol*, v.55(2), p.212–223, 2018.

HORTA, R.S., LAVALLE, G.E.; MONTEIRO, L.N. et al. Evaluation of Histological,

Immunohistochemical, Clinical and Genetic Prognostic Factors Associated with the Response of Canine Mast Cell Tumours to Glucocorticotherapy. *J Comp Pathol*, v.165, p.72-81, 2018.

HOWARD, E.B.; SAWA, T.R.; NIELSEN, S.W. et al. Mastocytoma and gastroduodenal ulceration: Gastric and duodenal ulcers in dogs with mastocytoma, *Pathol Vet* v.6(2), p.146-158, 1969.

HUME, C.T.; KIUPEL, M.; RIGATTI, L. et al. Outcomes of dogs with grade 3 mast cell tumors: 43 cases (1997-2007), *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 47(1):37-44, 2011.

JAFFE, M.H., HOSGOOD, G., KERWIN, S.C. et al. Deionised water as an adjunct to surgery for the treatment of canine cutaneous mast cell tumours. *J Small Anim Pract* v.41, p.7–11, 2000.

KALIKAKI, A.; KOUTSOPOULOS, A.; TRYPAKI, M. et al. Comparison of EGFR and K-RAS gene status between primary tumours and corresponding metastases in NSCLC. *Br J Cancer*; v.99, p.923-9, 2008.

KATONA, T.M.; JONES, T.D.; WANG, M. et al. Genetically heterogeneous and clonally unrelated metastases may arise in patients with cutaneous melanoma. *Am J Surg Pathol* v31, p.1029–1037, 2007.

KILLICK, D.R.; ROWLANDS, A.M.; BURROW, R.D. et al. Mast cell tumour and cutaneous histiocytoma excision wound healing in general practice, *J Small Anim Pract*, v.52(9), p.469-475, 2011.

KIUPEL, M., WEBSTER, J.D., KANEENE, J.B., MILLER, et al. “The use of KIT and tryptase expression patterns as prognostic tools for canine cutaneous mast cell tumors”. *Vet Pat* v.41, p. 371–377, 2004.

KIUPEL, M.; WEBSTER, J.G.D.; BAILEY. K.L. et al. Proposal of a two-tier histologic grading system for canine cutaneous mast cell tumours to more accurately predict biological behaviour, *Vet Pathol*, v.48(1), p.147-155, 2011.

KIUPEL, M. Mast cell tumors. In: Meuten DJ, editor. Tumors in domestic animals. 5th edition. Ames (IA): Wiley-Blackwell. p.176–202 2017.

KIUPEL M.; CAMUS, M. Diagnosis and Prognosis of Canine Cutaneous Mast Cell Tumors, *Vet. Clin. North Am., Small Anim. Pract.*, v.49, p.819-836, 2019.

KRICK, E.L.; BILLINGS, A.P.; SHOFER, F.S. et al. Cytological lymph node evaluation in dogs with mast cell tumours: association with grade and survival. *Vet Comp Oncol*, v.7(2), p.130–138, 2009.

LAVALLE, G.E.; ARAÚJO, R.B.; CARNEIRO, R.A.; et al. Punção aspirativa por agulha fina para diagnóstico de mastocitoma em cães. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoo.* v.55(4), p.500-502, 2003.

LIEGL, B.; KEPTEN, I.; LE, C. et al. Heterogeneity of kinase inhibitor resistance mechanisms in GIST. *J Pathol*, v.216, p.64–74, 2008.

LONDON, C.A. Tyrosine kinase inhibitors in veterinary medicine. *Top Companion Anim Med*, v.24, p.106-112, 2009.

LONDON, C.A.; SÉGUIN B. Mast cell tumors in the dog. *Vet. Clin. North Am., Small Anim. Pract.* v.33, p.473-489, 2003.

LONDON, C.A.; THAMM, D.H.; VAIL, D.M. Mast cell tumors In: WITHROW, S.J.; MAC EWEN, E.G. *Small Animal Clinical Oncology*, 5.ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 2013. cap.5, p.335 – 355.

MAGLENNON, G.A.; MURPHY, S.; ADAMS, V. et al. Association of Ki67 index with prognosis or intermediate-grade canine cutaneous mast cell tumours. *Vet Comp Oncol*. v.6(4), p.268–274, 2008.

MARCONATO, L.; ZORZAN, E.; GIANTIN, M.; DI PALMA, S.; CANCEDDA, S.; DACASTO, M. Concordance of *c-KIT* mutational status in matched primary and metastatic cutaneous canine mast cell tumors at baseline. *J Vet Int Med*, v.28, n.2, p.547-553, 2014.

MARCONATO, L., POLTON, G., STEFANELLO, D., et al. Therapeutic impact of regional lymphadenectomy in canine stage II cutaneous mast cell tumours. *Vet Comp Oncol*, v.16(4), p.580–9, 2018.

MULLINS, M. N., DERNELL, W. S., WITHROW, S. J., et al. Evaluation of prognostic factors associated with outcome in dogs with multiple cutaneous mast cell tumors treated with surgery with and without adjuvant treatment: 54 cases (1998–2004). *J Am Vet Med Ass*, v.228(1), p.91–95, 2006.

MUTZ, M.L., BOUDREAUX, B.B., ROYAL, A., et al. Cytologic comparison of the percentage of mast cells in lymph node aspirate samples from clinically normal dogs versus dogs with allergic dermatologic disease and dogs with cutaneous mast cell tumors. *J Am Vet Med Assoc*, v.251(4), p.421–8, 2017.

NORTHRUP, N.C., HARMON, B.G., GIEGER, T.L., et al. Variation among pathologists in histologic grading of canine cutaneous mast cell tumors. *J Vet Diagn Invest*, v.17, p.245–8, 2005.

O' KEEFE, D. A.; GUILLERMO COUTO, C.; BURKE SCHWARTZ, C.; et al. Systemic mastocytosis in 16 dogs. *J Vet Intern Med*, v.1(2), p.75-80, 1987.

PATNAIK, A.K.; EHLER, W.J.; MAC EWEN, E.G. Canine cutaneous mast cell tumor: morphologic grading and survival time in 83 dogs. *Vet Pathol*, v.21, p.469–474, 1984.

RIBEIRO, R.A.; SOUZA-FILHO, M.; SOUZA, M. et al. Role of resident mast cells and macrophages in the neutrophil migration induced by LTB<sub>4</sub>, fMLP and C5a. *Int Arch Allergy Immunol*, v.112: p.27–35, 1997.

ROBAT, C.; LONDON, C.; BUNTING, L. et al. Safety evaluation of combination vinblastine and toceranib phosphate (Palladia®) in dogs: a phase I dose-finding study. *Vet Comp Oncol*, v.10, p.174–183, 2012.

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

SABATTINI, S.; SCARPA, F.; BERLATO, D. et al. Histologic grading of canine mast cell tumor: is 2 better than 3? *Vet Pathol*, v.52(1), p.70–73, 2015.

SAMPAIO, I.B.M. Estatística Aplicada à Experimentação Animal. *In: Est Apl Exp Anim*, 3ed. 2010.

SCASE, T.J.; EDWARDS, D.; MILLER, J. et al. Canine mast cell tumors: correlation of apoptosis and proliferation markers with prognosis. *J Vet Int Med*, v.20(1), p.151–158, 2006.

SIMPSON, A.M.; LUDWIG, L.L.; NEWMAN, S.J. et al. Evaluation of surgical margins required for complete excision of cutaneous mast cell tumors in dogs. *J Am Vet Med Assoc*, v.224, p.236–240, 2004.

SLEDGE, D. G., WEBSTER, J., KIUPEL, M. Canine cutaneous mast cell tumors: A combined clinical and pathologic approach to diagnosis, prognosis, and treatment selection. *The Vet J*, v.215, p.43–54. 2016.

STEFANELLO, D., BURACCO, P., SABATTINI, S. et al. Comparison of 2- and 3-category histologic grading systems for predicting the presence of metastasis at the time of initial evaluation in dogs with cutaneous mast cell tumors: 386 cases (2009–2014). *J Am Vet Med Ass*, v.246, p.765–769, 2015.

TAKEUCHI, Y., FUJINO, Y., WATANABE, M., et al. Validation of the prognostic value of histopathological grading or *c-KIT* mutation in canine cutaneous mast cell tumours, a retrospective cohort study. *Vet J*, v.196, p.492–498, 2013.

TANIGUCHI, K.; OKAMI, J.; KODAMA, K. et al. Intratumor heterogeneity of epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer and its correlation to the response to gefitinib. *Cancer Sci*, v.99, p.929–935, 2008.

THAMM, D.H.; MAULDIN, E.A.; VAIL, D.M.. Prednisone and vinblastine chemotherapy for canine mast cell tumor—41 cases (1992–1997). *J Vet Intern Med.*; v.13(5), p.491–497, 1999.

TOBIAS, K., JOHNSTON, S. *Veterinary Surgery: Small Animal*. St. Louis, Mo.: Elsevier/Saunders, 2012.

WARLAND, J.; BRIOSCHI, V.; OWEN, L. et al. Canine mast cell tumours: decision-making and treatment. *In Practice*, v.37(7), p.315–332, 2015.

WEBSTER, J.D., YUZBASIYAN-GURKAN, V., KANEENE, J.B., et al. The role of *c-KIT* in tumorigenesis, evaluation in canine cutaneous mast cell tumors. *Neoplasia* v.8, p. 104–111, 2006.

WEBSTER, J.D., YUZBASIYAN-GURKAN, V., MILLER, R.A. et al. Cellular proliferation in canine cutaneous mast cell tumors: associations with *c-KIT* and its role in prognostication. *Vet. Pathol*, v.44, p.298–308, 2007.

WELLE, M.M.; BLEY, C.R.; HOWARD, J. et al. Canine mast cell tumours: a review of the pathogenesis, clinical features, pathology and treatment. *Vet Dermatol.* v.19(6), p.321-323, 2008.

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

## 8. Anexos

Anexo 1 – Termo de aprovação pelo comitê de ética



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

### CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Avaliação de características histológicas e imunofenotípicas de lesões primárias e metastáticas em mastocitoma de cão e sua relação com o prognóstico", protocolo do CEUA: 162/2018 sob a responsabilidade de Roberto Baracat de Araujo que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, em reunião de 20/08/2018.

Vigência da Autorização	20/08/2018 a 19/08/2023
Finalidade	Pesquisa
*Espécie/linhagem	Cão / Variados
Nº de animais	19
Peso/Idade	20kg / 9(anos)
Sexo	indiferente
Origem	Tutores

### Considerações posteriores:

20/08/2018	Aprovado na reunião do dia 20/08/2018. Validade: 20/08/2018 à 19/08/2023
------------	--

Belo Horizonte, 03/03/2020.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG  
[https://aplicativos.ufmg.br/solicite\\_ceua/](https://aplicativos.ufmg.br/solicite_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) 3409-4516  
[www.ufmg.br/bioetica/ceua](http://www.ufmg.br/bioetica/ceua) - [ceua@prpq.ufmg.br](mailto:ceua@prpq.ufmg.br)



	Raça	Sexo	Idade	Estadiamento	Tipo	Localização	Tamanho	Ulceração	Mitoses	Grau Patnaik	Grau Kiupel	ki67	CD117	c-kit	ILD	SG	Tratamento
1	pug	M	8	III	primário	Perianal	5cm	Sim	6	II	Alto	44%	I	Normal	60	90	Cirurgia + Lomustina
					linfonodo	Poplíteo	Aumentado	.	38	III	Alto	3,50%	I	Normal			
2	Shar Pei	F	6	II	primário	Cabeça	8cm	Sim	4	II	Baixo	26%	II	Normal	60	120	Cirurgia
					linfonodo	Pré-escapular	Aumentado	.	42	III	Alto	4%	II	Normal			
3	Labrador	M	11	III	primário	Bolsa Escrotal	4cm	Sim	2	II	Baixo	10%	II	Normal	261	434	Cirurgia+Lomustina, Clorambucil
					linfonodo	Inguinal	Aumentado	.	9	II	Alto	1,20%	II	Normal			
4	shar pei	M		III	primário	Membro	difuso	Sim	12	II	Alto	9,20%	I	Normal	sem cirurgia	37	Lomustina
					linfonodo	Poplíteo	Aumentado	.	18	II	Alto	8,70%	I	Normal			
5	pitbull	F	13	II	primário	Esterno	4cm	Não	9	III	Alto	1,80%	III	Duplicação	sem cirurgia	5	Não tratado
					linfonodo	Pré-escapular	Aumentado	.	15	III	Alto	3,00%	III	Normal			
6	daschund	M	12	III	primário	Bolsa Escrotal	5cm	Não	4	III	Alto	3,50%	II	Normal	240	346	Cirurgia + Lomustina, clorambucil
					linfonodo	Mesentérico		.	32	III	Alto	5,70%	II	Normal			
7	fox paulistinha	F	8	II	primário	Membro	10cm	Sim	8	III	Alto	3,30%	II	Normal	85	210	Cirurgia + Lomustina, Vimblastina, Masitinib
					linfonodo	Inguinal	4cm	.	5	II	Alto	1,50%	II	Normal			
8	maltês	M	7	II	primário	Membro	10cm	Sim	0	III	Alto	2,80%	II	Normal	120	120	Cirurgia
					linfonodo	Axilar	Aumentado	.	2	II	Alto	2,50%	II	Normal			
9	srd	m	12		primário	Bolsa Escrotal	5cm	Sim	2	II	Baixo	11,20%	II	Normal	sem cirurgia	6	Não tratado
					linfonodo	Inguinal	Aumentado	.	6	II	Alto	10,80%	II	Normal			
10	srd	F	20	II	primário	mama	3,5cm	Sim	17	III	Alto	1,80%	I	Normal	-	45	Cirurgia
					linfonodo	Inguinal	Normal	.	12	II	Alto	9,00%	II	Normal			
11	golden	M	?	II	primário	prepúcio	3cm	Sim	12	III	Alto	2,00%	II	Normal	30	110	Cirurgia + Lomustina, Vimblastina
					linfonodo	Inguinal	Aumentado	.	2	I	Alto	2,50%	I	Normal			
12	Labrador	F	12	III	primário	mama	4cm	Sim	16	III	Alto	10,50%	II	Normal	120	210	Cirurgia + Lomustina
					linfonodo	Inguinal	Aumentado	.	26	III	Alto	4%	I	Normal			
13	SRD	M	6	III	primário	Bolsa Escrotal	2,5cm	Sim	15	III	Alto	30%	III	Duplicação	90	254	Cirurgia + Lomustina
					linfonodo	Inguinal	Aumentado	.		II		NR	II	Normal			
14	Cocker	F	14	II	primário	Torax Lateral	10cm	Não	49	III	Alto	1,7%	II	Duplicação	350	350	Cirurgia + Lomustina, Clorambucil
					linfonodo	Axilar	Aumentado	.					I	Duplicação			
15	Pinscher	F	12	III	primário	Membro	2,1	Sim		II	Baixo	40,0%	II	Normal	180	540	Cirurgia + Vimblastina, Lomustina
					linfonodo	Pré-Escapular	Aumentado	.					II	Duplicação			
16	Poodle	M	12	III	primário	Bolsa Escrotal	2cm	Sim	15	II	Alto	12%	I	Normal		180	Cirurgia + Lomustina, Masitinib
					linfonodo	Inguinal	Aumentado	.		II			II	Duplicação			
17	Schnauzer	F	12	II	primário	Mama	7cm	Não	1	II	Baixo	35%	I	Normal	122	148	Cirurgia + Lomustina, Masitinib
					linfonodo	Inguinal	Normal	.					II	Duplicação			

Anexo 2 - Dados completos dos 17 casos avaliados no projeto