



UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

PADRÃO DE EXPRESSÃO DO RECETOR KIT NO MASTOCITOMA CANINO:
SELEÇÃO DOS INIBIDORES DOS RECETORES TIROSINA QUINASE

BEATRIZ QUINTINO ROGADO MENDES PAULA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutora Maria da Conceição da Cunha
e Vasconcelos Peleteiro

Doutora Berta Maria Fernandes Ferreira
São Braz

Doutor Fernando António da Costa
Ferreira

ORIENTADORA

Doutora Berta Maria Fernandes
Ferreira São Braz

CO - ORIENTADOR

Dr. Gonçalo Eduardo Vítor Vicente

2018

LISBOA



UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

PADRÃO DE EXPRESSÃO DO RECETOR KIT NO MASTOCITOMA CANINO:
SELEÇÃO DOS INIBIDORES DOS RECETORES TIROSINA QUINASE

BEATRIZ QUINTINO ROGADO MENDES PAULA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutora Maria da Conceição da Cunha
e Vasconcelos Peleteiro

Doutora Berta Maria Fernandes Ferreira
São Braz

Doutor Fernando António da Costa
Ferreira

ORIENTADORA

Doutora Berta Maria Fernandes
Ferreira São Braz

CO - ORIENTADOR

Dr. Gonçalo Eduardo Vítor Vicente

2018

LISBOA

“Mes chers parents je pars
Je vous aime mais je pars
Vous n'aurez plus d'enfants
Ce soir
Je ne m'enfuis pas je vole
Comprenez bien: je vole
Sans fumée, sans alcool
Je vole, je vole”

Michel Sardou

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço à minha orientadora, Professora Doutora Berta São Braz, por ter aceite este desafio, pela orientação cuidadosa, pelo seu carácter e exigência, pela dedicação, ajuda e preocupação demonstradas ao longo deste período e pelo incentivo para fazer sempre mais e melhor.

Ao meu co-orientador, Dr. Gonçalo Vicente, pela inspiração e confiança no desenvolvimento deste trabalho, pelo acompanhamento ao longo de ambos os meus estágios, pela transmissão de conhecimentos essenciais e por me desafiar a ser melhor. Tens a minha admiração e amizade. Inquestionavelmente, um dos meus modelos a seguir.

A toda a equipa do HEV-FMV, um obrigada gigante, por toda a amizade, disponibilidade e partilha de conhecimentos e experiências. Aos Médicos, pela confiança que depositaram em mim, pelo trabalho em equipa e pela inspiração e carinho. Aos Enfermeiros e Auxiliares, por toda a ajuda, ensinamentos, companhia e boa disposição, sem vocês era tão mais difícil. Às rececionistas, pela simpatia e cooperação.

Ao Professor Doutor António Ferreira, por me ter dado a possibilidade de estagiar no HEV-FMV e por toda a simpatia e boa disposição.

A toda a equipa do Laboratório de Anatomia Patológica da FMV. Ao Dr. Hugo Pissarra, pela ajuda preciosa e fundamental na observação das lâminas de imunohistoquímica, pelo tempo pessoal dispensado e por ter sempre uma palavra amiga. À Sandra Carvalho, pela contribuição imprescindível neste estudo e por todos os conhecimentos transmitidos.

Ao Laboratório Veterinário Vetpat pela disponibilização dos relatórios de histopatologia referentes aos casos clínicos utilizados, muito obrigada.

À Dra. Cláudia Rodrigues da VetOeiras e ao Dr. Miguel Figueiredo da Clínica Veterinária João XXI, pela disponibilidade demonstrada, gentileza e ajuda na recolha dos dados das fichas clínicas dos animais.

Ao Professor Telmo Nunes, pela ajuda crucial no tratamento estatístico dos resultados deste trabalho, pela disponibilidade, amabilidade e paciência.

Ao Professor Virgílio Almeida, por me auxiliar num dos momentos mais difíceis do meu percurso académico e por ter possibilitado a realização do meu primeiro estágio no HEV-FMV, onde tanto aprendi e contribuí de uma forma tão importante para a continuação dos meus estudos.

A todos os docentes da FMV-UL, pelo seu contributo inestimável na minha formação, assim como a todos os técnicos e administrativos. E, ainda, a todos os animais dos canis e estábulos da FMV que tanto me ajudaram a aprender.

Aos meus colegas de estágio 2015/2016, não tenho palavras para descrever o apoio e amizade com que me acolheram. Obrigada por toda a ajuda, companheirismo e espírito de equipa e entreajuda. Um agradecimento especial ao CP, por nos ter acompanhado sempre com a sua bondade e boa disposição, até ao final, ficará para sempre na minha memória.

Aos meus colegas de estágio 2017/2018, pelo grande trabalho de equipa e por toda a ajuda prestada, pela companhia e apoio durante estes 6 meses.

Às minhas companheiras de curso, que se transformaram em muito mais do que isso. Levo-as comigo para a vida. Bina, Tina, Dette, Lenka e Mer, obrigada do fundo do meu coração, pela amizade e por me fazerem acreditar nela novamente! Faço este percurso final, lado a lado com vocês e não poderia estar melhor acompanhada! Eternamente grata por todo o carinho. Não de sempre, mas para sempre!

À minha mãe, pelo apoio incondicional durante toda a minha vida, sem ela nada disto seria possível, por todo o amor, por todos os valores transmitidos e por todas as palavras de alento e coragem. Sou o produto da tua dedicação, o meu mais sincero e sentido obrigada!

Ao José, pelos conselhos profissionais e pessoais, pelo empenho e dedicação na minha educação e, especialmente, por todo o carinho com que tive o privilégio de crescer.

À Rita, por ter plantado a semente e me apoiado durante todo o meu percurso académico. Aos meus irmãos, Rebeca, Miguel e João, que de uma maneira ou de outra contribuíram para que me tornasse na pessoa que sou hoje. À Rosa, por todo o carinho e dedicação.

A todos os meus amigos, de Lagos e Tavira, pela amizade, por terem tornado esta caminhada mais fácil e divertida, por me apoiarem incondicionalmente hoje e sempre, e por não me fazerem esquecer de quem sou.

Ao meu Pedro, por ter acreditado em mim, me impulsionado e me amparado nos momentos mais difíceis, sendo o meu porto de abrigo. És o amor da minha vida.

A todos os outros que não consigo enumerar, mas que fazem parte da minha vida e me acompanharam, obrigada.

RESUMO

Padrão de expressão do recetor KIT no mastocitoma canino: seleção dos inibidores dos recetores tirosina quinase

Os mastocitomas representam cerca de 11 a 27% de todas as neoplasias cutâneas malignas do cão. Devido à sua prevalência e comportamento biológico variável, ao custo da terapêutica e ao potencial stress emocional para os tutores, é importante realizar um prognóstico preciso dos mastocitomas cutâneos e selecionar corretamente a abordagem terapêutica mais apropriada. Vários fatores clínicos podem influenciar o curso da doença, no entanto, o fator de prognóstico mais importante é a gradação histológica.

As mutações no *c-kit* e as alterações da expressão do KIT são conhecidas como indicadores de prognóstico negativo em mastocitomas cutâneos caninos. Além disso, animais portadores de mastocitomas com mutações no *c-kit* ou padrões de expressão anormais do KIT são potenciais candidatos à terapêutica alvo com inibidores dos recetores tirosina quinase (IRTQ). O principal objetivo deste estudo foi selecionar o melhor IRTQ para cada caso, com base no padrão de expressão do KIT. Um objetivo adicional foi a identificação e avaliação de fatores influenciadores de prognóstico, através de associações estatísticas e da análise de sobrevivência.

Os 42 casos de animais com mastocitomas investigados foram, inicialmente, distribuídos por sexo, idade, raça, localização, tipo de lesão e grau histológico do tumor e, ainda, padrão de expressão do KIT. A idade do animal mostrou associação significativa com o grau histológico ($p=0,0495$) e a localização tumoral com o padrão de expressão do KIT ($p=0,0271$). Além disso, o risco de desenvolvimento de tumores com padrões do KIT atípicos foi superior nos animais com idades superiores a 8 anos, lesões múltiplas e tumores de alto grau histológico.

Como bons indicadores influenciadores de prognóstico identificaram-se a idade no momento do diagnóstico ($p=0,01$) e o grau histológico do tumor ($p=0,002$). O risco de morte, relacionada com o mastocitoma, foi superior nos animais com tumores com padrões do KIT atípicos.

As variáveis que apresentaram impacto significativo no tempo de sobrevivência foram a idade, o grau histológico, o tratamento quimioterápico e o tratamento com IRTQ. Foram, ainda, obtidos melhores resultados nas fêmeas e nos mastocitomas com padrão de expressão 1.

Apesar das limitações do estudo, os resultados obtidos podem contribuir para o estabelecimento de um prognóstico e para a escolha da terapêutica a implementar em casos de mastocitoma cutâneo canino.

Palavras-chave: mastocitoma, cão, prognóstico, padrão de expressão do KIT, inibidores dos recetores tirosina quinase.

ABSTRACT

KIT expression in canine mast cell tumour: tyrosine kinase inhibitors selection

Mast cell tumours (MCT) are the most frequently diagnosed malignant skin neoplasm in dogs, representing up to 27% of all canine cutaneous neoplasms. Due to their prevalence and variable biologic behavior, the cost of therapeutics, and the potential emotional stress to owners, it is important to accurately prognosticate cutaneous mast cell tumours and to correctly select the most appropriate therapeutic approach. There are varied clinical factors that may influence the outcome; however, accurate histologic grading remains a cornerstone of MCT prognostication.

Mutations in *c-kit* and altered expression of KIT have been shown to be negative prognostic indicators for canine cutaneous mast cell tumours. Furthermore, those mast cell tumours that have *c-kit* mutations or abnormal KIT expression are potential candidates for targeted therapy with tyrosine kinase inhibitors.

The main goal of this study was to select the best tyrosine kinase inhibitor for each KIT expression pattern. An additional goal was the identification and evaluation of prognosis influencing factors, through statistical associations and survival analysis.

The 42 mastocytomas investigated were initially distributed by sex, age, race, location, type of lesion, histological grade and KIT expression. The animal age showed a significant association with the histological grade ($p = 0.0495$) and the tumor location with the KIT expression ($p = 0.0271$). In addition, the risk of developing tumors with atypical KIT patterns was higher in animals aged over 8 years, with multiple lesions and tumors of high histological grade.

The age at diagnosis ($p = 0.01$) and the histological grade of the tumor ($p = 0.002$) showed to be good prognostic indicators. The risk of death related to the mast cell tumour was higher in animals with tumors with atypical KIT patterns.

The variables that had a significant impact on survival time were age, histological grade, chemotherapeutic treatment and treatment with tyrosine kinase inhibitors. Better results were also obtained in females and mast cells tumours with expression pattern 1.

Lastly, despite the limitations of the study, the results obtained may be useful in establishing a prognosis and in the therapeutic choice in cases of canine cutaneous mast cell tumour.

Key words: mast cell tumour, dog, prognosis, KIT expression, tyrosine kinase inhibitors.

ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS.....	iii
RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	ix
ÍNDICE GERAL.....	xi
LISTA DE FIGURAS.....	xv
LISTA DE TABELAS.....	xvi
LISTA DE GRÁFICOS.....	xvi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	xvii
NOTA INTRODUTÓRIA.....	1
CAPÍTULO 1 – RELATÓRIO DE ACTIVIDADES DESENVOLVIDAS NO ESTÁGIO CURRICULAR.....	3
1. Medicina Geral.....	4
2. Cirurgia.....	4
3. Internamento.....	5
4. Medicina Interna.....	6
5. Dermatologia.....	6
6. Oftalmologia.....	6
7. Ecografia.....	7
8. Oncologia.....	7
9. Imagiologia.....	8
10. Unidade de isolamento de doenças infecciosas.....	8
11. Laboratório de Anatomia Patológica da FMV.....	8
12. Comunicações científicas.....	8
CAPÍTULO 2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	9
MASTOCITOMA CANINO.....	9
1. O Mastócito.....	9
1.1. Morfologia.....	9
1.2. Origem e diferenciação.....	10
1.3. Heterogeneidade.....	10
1.4. Recetores de superfície.....	11
1.5. Funções biológicas.....	13
1.6. Crescimento tumoral.....	14
2. Incidência e epidemiologia.....	14
2.1. Incidência.....	14
2.2. Raça.....	15
2.3. Sexo.....	15
2.4. Idade.....	15
3. Etiopatogenia.....	15
4. Apresentação clínica.....	17
4.1. Localização.....	17
4.2. Morfologia.....	18
4.3. Comportamento biológico.....	18

4.4.	Sinais paraneoplásicos	19
5.	Diagnóstico	20
5.1.	Avaliação citológica.....	20
5.2.	Estadiamento Clínico	21
5.3.	Avaliação histológica.....	25
5.3.1.	Características histológicas.....	25
5.3.2.	Grau histológico	26
5.3.3.	Margens cirúrgicas	29
6.	Prognóstico	30
6.1.	Fatores epidemiológicos.....	31
6.2.	Localização	31
6.3.	Apresentação clínica	31
6.4.	Ritmo de crescimento e tamanho tumoral	32
6.5.	Estadio clínico e metastização	32
6.6.	Grau histológico	33
6.7.	Margens cirúrgicas	34
6.8.	Proliferação celular.....	35
6.9.	Mutação do <i>c-kit</i> e padrão de expressão do KIT	38
6.10.	Ploidia, oncogenes e genes supressores.....	40
6.10.1.	Ploidia do ADN	40
6.10.2.	Oncogene Mdm2	40
6.10.3.	Gene supressor tumoral p53	40
7.	Tratamento.....	41
7.1.	Cirurgia	41
7.1.	Radioterapia.....	42
7.2.	Quimioterapia.....	42
7.2.1.	Protocolos clássicos.....	43
7.2.2.	Inibidores dos recetores tirosina quinase	44
7.3.	Tratamento com base nos fatores de prognóstico	46
CAPÍTULO 3 - PADRÃO DE EXPRESSÃO DO RECETOR KIT NO MASTOCITOMA CANINO: SELEÇÃO DOS INIBIDORES DOS RECETORES TIROSINA QUINASE.....		49
1.	Objetivos	49
2.	Material e métodos.....	49
2.1.	Amostra utilizada.....	49
2.2.	Parâmetros a avaliar	50
2.3.	Análise estatística	50
3.	Resultados	52
3.1.	Raça.....	52
3.2.	Idade.....	52
3.3.	Sexo.....	52
3.4.	Tipo de lesão.....	53

3.5. Localização	53
3.6. Grau histológico	54
3.7. Padrão de expressão do KIT.....	54
3.8. Tratamento.....	54
3.9. Associações estatísticas	55
3.9.1. Associações entre as variáveis epidemiológicas e clínicas	55
3.9.2. Associações entre as variáveis epidemiológicas e clínicas e as variáveis histológicas	56
3.9.3. Associações estatísticas entre as variáveis epidemiológicas, clínicas e histológicas e as variáveis imunohistoquímicas.....	56
3.10. Estudo de fatores influenciadores de prognóstico.....	57
3.11. Análise de sobrevivência	59
4. Discussão	64
5. Limitações do estudo	70
6. Conclusão e perspectivas futuras	71
BIBLIOGRAFIA.....	73
ANEXOS.....	87
Anexo I - Casuística discriminada por área cirúrgica	87
Anexo 2 – Poster apresentado no XIV congresso do Hospital Veterinário Montenegro.....	89

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática do recetor KIT. Adaptado de Lennartsson et al, 2005	12
Figura 2 – Etapas para o diagnóstico de mastocitomas caninos. Adaptado de Thamm & Vail, 2007.	21
Figura 3 – Método recomendado para avaliação das margens cirúrgicas, onde as linhas amarelas (A1-A4) representam os cortes radiais ao longo do eixo longo e eixo curto da amostra e as linhas vermelhas (A5-A8) representam os cortes tangenciais. Fonte: Sledge et al, 2016.....	29
Figura 4 – Diferentes índices de Ki-67. A) Índice Ki-67 baixo; B) Índice Ki-67 alto. Escala 25 µm. Original da autora.	36
Figura 5 – Diferentes padrões de expressão do KIT. A) Padrão de expressão 1 membranar; B) Padrão de expressão 2 citoplasmático focal ou pontilhado; 3) Padrão de expressão 3 citoplasmático difuso. Escala 25 µm. Original da autora.	39
Figura 6 – Considerações para tratamento local adicional de cães com mastocitomas cutâneos excisados. Adaptado de Sledge et al, 2016.....	46
Figura 7 - Considerações para a inclusão de terapêutica sistêmica no tratamento de mastocitomas cutâneos caninos. Adaptado de Sledge et al, 2016.....	47
Figura 8 - Considerações na inclusão de inibidores de tirosina quinase no tratamento de mastocitomas cutâneos caninos. Adaptado de Sledge et al, 2016.....	48
Figura 9 - Curva Kaplan-Meier de sobrevivência para o total da amostra.	59
Figura 10 - Curvas Kaplan-Meier de sobrevivência de acordo com a raça.....	59
Figura 11 - Curvas Kaplan-Meier de sobrevivência de acordo com a idade no momento do diagnóstico.	60
Figura 12 - Curvas Kaplan-Meier de sobrevivência de acordo com o gênero.....	60
Figura 13 – Curvas Kaplan-Meier de sobrevivência de acordo com a localização tumoral. .	61
Figura 14 – Curvas Kaplan-Meier de sobrevivência de acordo com a multiplicidade do tumor.	61
Figura 15 - Curvas Kaplan-Meier de sobrevivência de acordo com o grau histológico.....	61
Figura 16 - Curvas Kaplan-Meier de sobrevivência de acordo com o padrão de expressão do KIT.....	61
Figura 17 - Curvas Kaplan-Meier de sobrevivência de acordo com o tratamento quimioterápico.	63
Figura 18 - Curvas Kaplan-Meier de sobrevivência de acordo com o tratamento com IRTQ.	63

Figura 19 - Curvas Kaplan-Meier de sobrevivência de acordo com o tratamento com IRTQ, em cães com padrão de expressão do KIT 1.....	64
Figura 20 - Curvas Kaplan-Meier de sobrevivência de acordo com o tratamento com IRTQ, em cães com padrão de expressão do KIT 2.....	64
Figura 21 - Curvas Kaplan-Meier de sobrevivência de acordo com o tratamento com IRTQ, em cães com padrão de expressão do KIT 3.....	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Sistema de estadiamento clínico para mastocitomas caninos da OMS. Adaptado de Owen, 1980.	24
Tabela 2 - Sistema de gradação histológica proposto por Patnaik et al.(1984)	27
Tabela 3 - Sistema de dois níveis para o diagnóstico de mastocitoma. Adaptado de Kiupel et al. (2011)	28
Tabela 4 – Variáveis utilizadas na análise estatística.....	51
Tabela 5 - Distribuição dos mastocitomas por raça.....	52
Tabela 6 - Distribuição dos mastocitomas por padrão de expressão do KIT.	54
Tabela 7 - Associação entre a raça e a idade dos animais em estudo.	55
Tabela 8 - Associações entre a raça e idade e o grau histológico.....	56
Tabela 9 - Associações entre as variáveis epidemiológicas, clínicas e histológicas e o KIT.	57
Tabela 10 - Associações entre as variáveis epidemiológicas, clínicas, histológicas e imunohistoquímicas e a morte devida ao tumor.	58
Tabela 11 - Associação entre o grau histológico e a quimioterapia.....	62
Tabela 12 -Associação entre grau histológico e padrão de expressão do KIT e o tratamento com IRTQ.	62

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Contabilização de horas despendidas em cada serviço	3
Gráfico 2 - Distribuição dos mastocitomas por sexo.....	53
Gráfico 3 - Distribuição dos mastocitomas por tipo de lesão.	53
Gráfico 4 – Frequência relativa da distribuição dos mastocitomas por localização.....	53
Gráfico 5 - Distribuição dos casos por protocolo quimioterápico.	54
Gráfico 6 - Distribuição dos casos segundo a utilização de IRTQ.	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ADN – Ácido Desoxirribonucleico
- AgNORs – Regiões organizadoras nucleolares
- ATP – Adenosina Trifosfato
- CAMV – Centros de Atendimento Médico-Veterinários
- EMA – Agência Europeia de Medicamentos
- FcεR1 – Recetor de alta afinidade para a porção Fc da Imunoglobulina E
- FMV – Faculdade de Medicina Veterinária
- FMV-UL – Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa
- HEV-FMV – Hospital Escolar Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária
- Ig – Imunoglobulina
- IRTQ – Inibidores dos Recetores Tirosina Quinase
- MCT - *Mast cell tumour*
- MIMV – Mestrado Integrado em Medicina Veterinária
- Mq – Mastócito contendo quimase
- M_{TQ} – Mastócito contendo triptase e quimase
- M_T – Mastócito contendo triptase
- NGF – *Nerve Growth Factor* (Fator de crescimento nervoso)
- NK – *Natural Killer*
- OMS – Organização Mundial de Saúde
- OVH – Ovariohisterectomia
- PAAF – Punção Aspirativa por Agulha Fina
- PCNA – Antígeno Nuclear de Proliferação Celular
- PCR – *Polymerase Chain Reaction* (Reação em cadeia da polimerase)
- SCF – *Stem Cell Factor*
- TNF – *Tumor Necrosis Factor* (Fator de Necrose Tumoral)
- UIDI – Unidade de Isolamento de Doenças Infeciosas

NOTA INTRODUTÓRIA

Os mastocitomas são as neoplasias cutâneas mais comuns em cães (Finnie & Bostock, 1979; Bostock, 1986; Rothwell, Howlett, Middleton, Griffiths, & Duff, 1987), representando cerca de 7 a 21% de todos os tumores cutâneos (Finnie & Bostock, 1979; Macy, 1985; Bostock, 1986; Gieger, Northrup, & Wall, 2005; Welle, Bley, Howard, & Rüfenacht, 2008; Kiupel, 2016) e 11 a 27% de todas as neoplasias cutâneas malignas (Macy, 1985).

A predisposição racial, principalmente nos *Boxers*, surge descrita na maioria dos estudos sobre mastocitoma canino (Hottendorf & Nielsen, 1967; Bostock, 1973; Cohen, Reif, Brodey, & Keiser, 1974; Rothwell et al., 1987; Simoes, Schoning, & Butine, 1994; Miller, 1995; Thamm & Vail, 2007; Morris & Dobson, 2008; Shoop et al., 2015). A localização destes tumores foi, também, objeto de vários estudos, assim como a sua morfologia, fatores que podem influenciar o seu comportamento biológico (Hottendorf & Nielsen, 1967; Beaumont, O'Brien, Allen, & Tucker, 1979; Patnaik, Macewen, Black, & Luckow, 1982; Macy, 1985; Rothwell et al., 1987; Iwata, Ochiai, Kadosawa, Takiguchi, & Umemura, 2000; Naganobu et al., 2000; Takahashi et al., 2000; Gieger et al., 2003; Barsotti, Marchetti, & Abramo, 2007; Bahrami et al., 2014; Kiupel, 2016). Na maioria das vezes, os mastocitomas são benignos e solitários (Bostock, 1973; Thamm & Vail, 2007), e podem ser tratados com excisão cirúrgica (Macy, 1985; Weisse, Shofer, & Sorenmo, 2002; Govier, 2003; Thamm & Vail, 2007). No entanto, uma percentagem destes tumores são invasivos (Bostock, 1973; Thamm & Vail, 2007) e culminam em doença metastática fatal (Welle et al., 2008).

A avaliação diagnóstica de cães com suspeita de mastocitoma tem três objetivos: o diagnóstico definitivo através de citologia e/ou histopatologia; o estadiamento clínico, e documentação de sinais paraneoplásicos (Rogers, 1996).

Não existe nenhum fator que indique precisamente o comportamento biológico ou a resposta ao tratamento em cães com mastocitoma (Welle et al., 2008). Os fatores clínicos que podem influenciar o resultado incluem raça (Bostock, 1986; Miller, 1995; Baker-Gabb, Hunt, & France, 2003), sexo (Gerritsen, Teske, Kraus, & Rutteman, 1998), localização (Govier, 2003), morfologia (Bostock, 1973; Mullins et al., 2006; Thamm & Vail, 2007), presença de sinais sistêmicos paraneoplásicos (O'Keefe, 1990; Govier, 2003; Mullins et al., 2006; Thamm & Vail, 2007), ritmo de crescimento (Bostock, 1973), tamanho (Mullins et al., 2006) e estadio clínico (Sfiligoi, Rassnick, Scarlett, Northrup, & Gieger, 2005; Murphy, Sparkes, Blunden, Brearley, & Smith, 2006). O fator de prognóstico mais importante é a gradação histológica (Thamm, Turek, & Vail, 2006; Welle et al., 2008; Blackwood et al., 2012). No entanto, 5% dos cães com mastocitoma de baixo grau morre devido a doença associada ao mastocitoma e 20% desenvolve mastocitomas adicionais (Kiupel et al., 2011). Assim, é necessário complementar a gradação histológica com parâmetros microscópicos e moleculares que podem ser

avaliados com o objetivo de fornecer um prognóstico mais preciso e ajudar nas escolhas terapêuticas (Kiupel, 2016).

Em cães com mastocitoma cutâneo vários marcadores de proliferação celular (índice mitótico; Ki-67; AgNOR) têm sido associados ao tempo de sobrevivência, à ocorrência de metástases e ao intervalo livre de doença (Bostock, Crocker, Harris, & Smith, 1989; Simoes et al., 1994; Scase et al., 2006; Webster et al., 2007; Maglennon et al., 2008; Vascellari et al., 2012).

O proto-oncogene *c-kit* codifica o recetor tirosina quinase KIT, que desempenha um papel central na sobrevivência, proliferação, diferenciação e migração do mastócito. As mutações no *c-kit* e as alterações da expressão do KIT são conhecidas como indicadores de mau prognóstico de mastocitomas cutâneos caninos (Zemke, Yamini, & Yuzbasiyan-Gurkan, 2002; Webster, Yuzbasiyan-Gurkan et al, 2006; Takeuchi et al., 2013). Além disso, os mastocitomas com mutações no *c-kit* ou padrões de expressão anormais do KIT são potenciais candidatos à terapêutica alvo com Inibidores dos recetores tirosina quinase (IRTQ) (Kiupel, 2016).

Atualmente, a excisão cirúrgica é a principal modalidade de tratamento dos mastocitomas cutâneos caninos. A terapêutica local adicional, como a cirurgia secundária ou a radioterapia, deve ser considerada se as margens cirúrgicas estiverem contaminadas e o mastocitoma for de alto grau histológico, ou se for de baixo grau, mas apresentar altos índices de proliferação celular. A terapêutica sistémica deve ser considerada para cães com evidência de metástases no estadiamento clínico, ou com mastocitomas de alto grau histológico, ou com mastocitomas de baixo grau histológico que apresentem altos índices de proliferação celular, mutação ativa no exão 11 do *c-kit* ou padrões de expressão do KIT 2 ou 3. Se as células neoplásicas de um mastocitoma forem positivas para mutação ativa no exão 11 do *c-kit* ou apresentarem um padrão de expressão do KIT 2 ou 3 pode ser benéfico a inclusão de IRTQ no tratamento (Sledge, Webster, & Kiupel, 2016).

Devido à prevalência e comportamento biológico variável dos mastocitomas caninos, ao custo da terapêutica e ao potencial stress emocional para os tutores, é importante realizar um prognóstico preciso e selecionar corretamente a abordagem terapêutica mais apropriada (Kiupel, 2016). Assim, o principal objetivo deste estudo foi comparar os tempos de sobrevivência de animais com mastocitoma e diferentes padrões de expressão do KIT submetidos a terapêutica com fosfato de toceranib (Palladia®) e/ou masitinib (Masivet®), com o intuito de selecionar o melhor IRTQ para cada padrão de expressão do KIT. Adicionalmente, e com o propósito de caracterizar os tumores, foi objetivo suplementar deste estudo investigar a distribuição dos casos por sexo, idade e raça, e qualificar os mastocitomas em termos de localização, tipo de lesão, grau histológico e padrão de expressão do KIT. Foi, ainda, objetivo desta dissertação a identificação e avaliação de fatores influenciadores de prognóstico. Inicialmente apresenta-se uma revisão bibliográfica sumária sobre o assunto, de modo a contextualizar o estudo realizado.

CAPÍTULO 1 – RELATÓRIO DE ACTIVIDADES DESENVOLVIDAS NO ESTÁGIO CURRICULAR

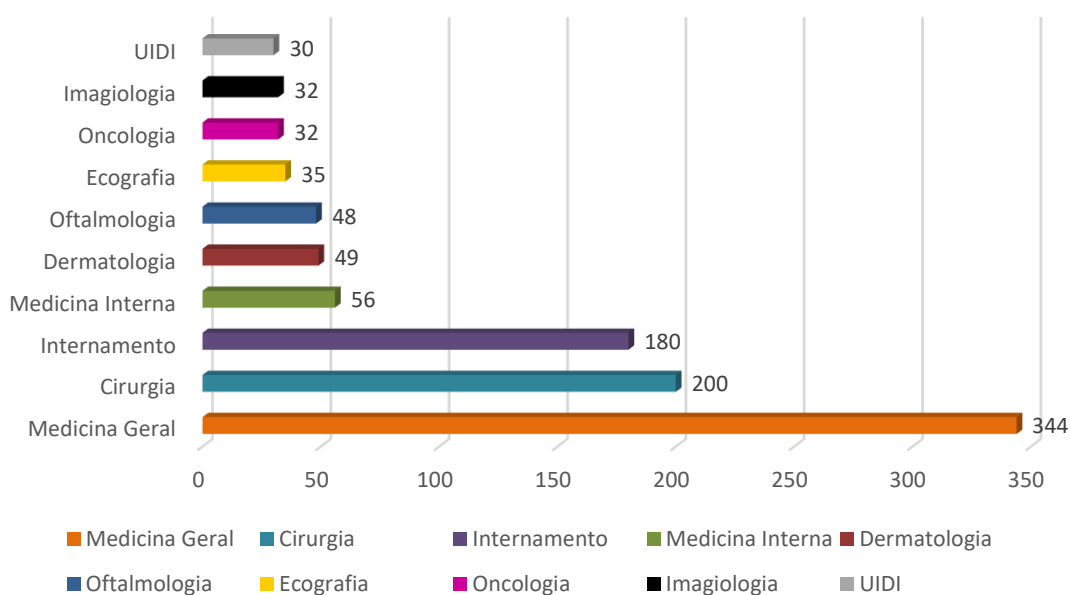
O estágio curricular do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária (MIMV) foi realizado no Hospital Escolar Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa (HEV-FMV), sob a orientação do Dr. Gonçalo Vicente, nas áreas de Medicina e Cirurgia de Animais de Companhia e Exóticos. O mesmo decorreu no período compreendido entre 18 de Setembro de 2017 e 16 de Março de 2018, perfazendo um total de 1006 horas de estágio (excluindo horas extra despendidas voluntariamente).

A carga horária foi distribuída segundo escalas semanais previamente definidas, com rotação pelos seguintes serviços: medicina geral, cirurgia, oftalmologia, ecografia, oncologia, medicina interna, imagiologia, dermatologia, internamento e unidade de isolamento de doenças infecciosas (UIDI). No gráfico 1, é apresentada a distribuição das horas despendidas em cada serviço.

As generalidades das funções exercidas durante o estágio foram supervisionadas e acompanhadas por parte da equipa hospitalar, nomeadamente, médicos, enfermeiros e/ou auxiliares; e enquanto estagiária auxiliei, ainda, os estudantes do 3º, 4º e 5º ano do MIMV.

O estágio possibilitou o meu desenvolvimento clínico e pessoal através do trabalho em equipa, da comunicação com os tutores dos animais, da delegação de tarefas e responsabilidades, da aplicação dos conhecimentos teóricos e da evolução a nível de raciocínio e prática clínica, oferecendo-me uma série de ferramentas úteis ao meu futuro como profissional.

Gráfico 1 - Contabilização de horas despendidas em cada serviço



1. Medicina Geral

O horário realizado em Medicina Geral compreendia turnos com duração de 8 horas, ocorrendo no período da manhã (8 às 16 horas) durante uma semana e no período da tarde (13 às 21 horas) na semana seguinte, e assim sucessivamente.

O serviço de medicina geral abrangeu primeiras consultas, consultas de rotina, consultas de seguimento, consultas de segunda opinião e consultas de referência, nas diversas áreas de especialidade: medicina preventiva, comportamento animal, neurologia, ortopedia, cirurgia (consultas pré ou pós cirúrgicas), cardiologia, endocrinologia, gastroenterologia, estomatologia, nefrologia e urologia, doenças infecciosas e parasitárias, pneumologia, reprodução, dermatologia, oftalmologia, oncologia, traumatologia e animais exóticos.

Neste serviço, as minhas principais responsabilidades consistiam na receção do tutor e animal, na pesagem do animal, na realização da anamnese, na realização do exame físico geral e na realização de exames específicos consoante o estímulo iatrotópico, por exemplo, exame ortopédico, neurológico e/ou oftalmológico. Posteriormente, era comunicada a história e principais sinais clínicos ao clínico responsável pelo caso, o qual prosseguia com a consulta. No final da sua atuação, sempre que possível, era realizada uma discussão de diagnósticos diferenciais, exames complementares a realizar e terapêutica a instituir. No decorrer das consultas, tive, ainda, a oportunidade de realizar vários procedimentos, entre os quais: elaboração e explicação do esquema vacinal, administração da vacina; microchipagem; contenção de animais; preparação e administração parentérica de medicamentos; colheitas de sangue e colocação de cateteres; requisição de análises; realização de punções aspirativas por agulha fina (PAAF); drenagem torácica e abdominal; cistocenteses e algaliação de machos e fêmeas; realização de zaragatoas para análise microbiológica; realização de eutanásias; realização de citologias e observação ao microscópio das mesmas; execução de pensos; medição da pressão arterial; elaboração de receitas para a prescrição de medicamentos; estabilização de pacientes críticos, o que compreendia a realização da triagem, estabelecimento de via respiratória e via venosa periférica aberta, administração de medicamentos e instauração de fluidoterapia, e, quando necessário, reanimação cardiorrespiratória.

2. Cirurgia

O horário realizado em Cirurgia compreendia turnos com duração de 8 horas, ocorrendo no período da manhã (8 às 16 horas).

Neste serviço, as minhas principais responsabilidades consistiam em consultar previamente a agenda cirúrgica com o objetivo de organizar o quadro de cirurgias localizado na sala de preparação e verificar: a história clínica do animal, a terapêutica em curso e análises clínicas pré-cirúrgicas; a admissão do animal; o preenchimento da ficha de internamento; a

preparação do local de recobro e a cateterização endovenosa do paciente. Após a chegada dos cirurgiões e estabelecimento da ordem de cirurgias, verificação de possíveis riscos anestésicos e escolha da medicação, era da minha competência o cálculo, preparação e administração da terapêutica médica pré-anestésica, incluindo o de indução anestésica; a intubação endotraqueal; a instituição de fluidoterapia; a monitorização anestésica; a tricotomia, limpeza e assepsia do campo cirúrgico e, por vezes, a preparação do material cirúrgico.

No decurso do procedimento cirúrgico, alternava com os meus colegas como circulante, anestesista, ajudante de cirurgião e cirurgião. Nessa altura, tive a oportunidade de realizar alguns procedimentos cirúrgicos com a supervisão do cirurgião responsável, tais como suturas de pele, ovariohisterectomia (OVH), orquiectomia em gatos e cães, destarizações e suturas gengivais pós-extrações dentárias.

Terminado o procedimento cirúrgico estava encarregue de vigiar a recuperação anestésica, contactar com os proprietários via telefónica informando do término da cirurgia e da hora da alta, discutir a alta com o cirurgião do caso, que constava do planeamento terapêutico e dos cuidados médicos necessários consoante a intervenção.

Durante a minha rotação de Cirurgia, tive a possibilidade de assistir a cirurgia de tecidos moles, cirurgia ortopédica, neurocirurgia, cirurgia oftálmica e dentisteria e cirurgia maxilofacial, estando a casuística discriminada por área cirúrgica disponível no Anexo I.

3. Internamento

O horário realizado no Internamento compreendia turnos previamente estabelecidos mensalmente com duração de 12 horas, tanto em regime diurno (8 às 20 horas) como em regime noturno (20 às 8 horas), culminando na realização de 60 horas em regime diurno e 120 horas em regime noturno.

O turno iniciava-se com a passagem dos casos clínicos dos animais internados onde eram discutidos o curso clínico, plano de tratamento e exames complementares necessários em cada caso. De seguida, iniciava-se a rotina deste serviço, que compreendia a monitorização dos animais, realização de passeios, alimentação, limpeza das jaulas e, se necessário, dos animais, preparação e administração de medicamentos, fisioterapia e verificação das taxas de fluidoterapia. Sempre que necessário, também se procedia à cateterização endovenosa, medição da pressão arterial, medição da glicémia, colheita de amostras biológicas, oxigenoterapia, algaliação e controlo da produção de urina, determinação do microhematócrito e proteínas totais presentes no soro, limpeza e desinfeção de feridas, realização de pensos e enemas. Fazia, também, parte das minhas responsabilidades auxiliar os tutores no horário das visitas, receber os animais que iriam ser internados e a entrega dos

animais aos tutores no momento da alta clínica, com as devidas explicações de terapêuticas e cuidados a adotar prescritos pelo clínico responsável pelo caso.

4. Medicina Interna

O horário realizado em Medicina Interna compreendia turnos com duração de 7 horas, ocorrendo no período da manhã (8:30 às 15:30 horas), com o intuito de acompanhar as consultas de referência do Dr. Rodolfo Leal, Especialista Europeu em Medicina Interna Veterinária Diplomado pelo Colégio Europeu.

Neste serviço, é dada ao estagiário a oportunidade de contactar com casos mais desafiantes e procedimentos mais invasivos não comuns na rotina clínica de medicina geral, o estagiário é incentivado a pôr à prova os seus conhecimentos e a procurar novas fontes de conhecimento. Durante a minha rotação, tive a oportunidade de contactar com casos de diversas áreas, entre as quais, gastroenterologia, endocrinologia, pneumologia e doenças imunomediadas, e assistir a vários procedimentos, como endoscopia digestiva alta e baixa, broncoscopia, lavagem broncoalveolar, rinoscopia e dilatação endoscópica por balão de estenose esofágica. Além de todas as atividades realizadas em Medicina Geral, anteriormente referidas, também fazia parte das minhas responsabilidades participar na elaboração dos relatórios clínicos referentes às consultas de Medicina Interna.

5. Dermatologia

O horário realizado em Dermatologia compreendia turnos com duração de 7 horas, ocorrendo no período da manhã (9 às 16 horas) durante uma semana e no período da tarde (14 às 21 horas) na semana seguinte, com o intuito de acompanhar as consultas de especialidade com o Dr. Hugo Pereira.

A participação nas consultas de especialidade de Dermatologia permitiu o contacto mais aprofundado com a recolha da história clínica dermatológica, com o exame físico dermatológico, com os diferentes exames complementares e com a prescrição de tratamento específico para as dermatopatias identificadas. De entre os procedimentos realizados nesta especialidade, foi-me possibilitada a realização de citologias cutâneas, raspagens cutâneas, tricogramas, colheitas de amostras bacteriológicas, otoscopias e utilização da lâmpada de Wood.

6. Oftalmologia

O horário realizado em Oftalmologia compreendia turnos com duração de 8 horas, ocorrendo no período da manhã (8 às 16 horas), às terças, quintas e sextas-feiras com o intuito de

acompanhar as consultas de especialidade com a Professora Esmeralda Delgado. Nos restantes dias os estagiários apresentavam-se no serviço de Medicina Geral.

Habitualmente, durante a manhã, eram realizadas as cirurgias oftálmicas, e as minhas responsabilidades eram idênticas às da rotação de Cirurgia, referidas anteriormente, estando a casuística discriminada por área cirúrgica incluída no Anexo I. Durante a tarde participava nas consultas de especialidade, o que permitiu o contacto mais aprofundado com a colheita da história clínica oftálmica, com o exame oftalmológico, com os diferentes exames complementares e com a prescrição de tratamento específico para as diferentes afeções oculares. Durante a execução do exame oftalmológico, tive a oportunidade de realizar testes de reflexos oculares, teste de schirmer, tonometria, oftalmoscopia direta e indireta e teste de fluoresceína. Tive, ainda, a possibilidade de assistir a outros procedimentos, como ecografia ocular e electrorretinografia.

7. Ecografia

O horário realizado em Ecografia compreendia turnos com duração de 7 horas, ocorrendo no período da tarde (14 às 21 horas), de segunda a quinta-feira e no período da manhã (9 às 16 horas) às sextas-feiras, com o objetivo de acompanhar as ecografias realizadas pela Dra. Joana Pontes.

Neste serviço, fazia parte das minhas funções a preparação e contenção do paciente e auxiliar na recolha de amostras biológicas por cistocentese, toracocentese e PAAF's ecoguiadas. Tive, também, a possibilidade de realizar diversas ecografias abdominais, sob supervisão da médica, treinar o correto posicionamento da sonda para visualização das estruturas intra-abdominais e consolidar conhecimentos prévios relativamente à aparência ecográfica normal e das várias alterações patológicas.

8. Oncologia

O horário realizado em Oncologia compreendia turnos com duração de 8 horas, ocorrendo no período da manhã (8 às 16 horas) durante uma semana e no período da tarde (13 às 21 horas) na semana seguinte, às terças e quintas-feiras no serviço de quimioterapia e nos restantes dias no serviço de Medicina Geral, com o objetivo de acompanhar as consultas e tratamentos quimioterápicos realizados pelo Dr. Gonçalo Vicente.

Neste serviço, as minhas principais responsabilidades incluíam a receção dos animais, a pesagem dos animais, a cateterização endovenosa e colocação dos animais a soro conforme necessário, a recolha de sangue para hemograma, a análise e interpretação desses resultados, o auxílio na preparação dos medicamentos quimioterápicos e a sua posterior administração.

9. Imagiologia

O horário realizado em Imagiologia compreendia turnos com duração de 8 horas, ocorrendo no período da tarde (13 às 21 horas).

No serviço de imagiologia foi possível participar nas técnicas de imagem incluindo radiografia abdominal e torácica, mielografia e tomografia computadorizada (TC). As minhas funções eram receber os animais, ajudar na contenção e no correto posicionamento dos mesmos, realizar a cateterização endovenosa, auxiliar na indução e monitorização anestésica, acompanhar a realização do exame e discutir os resultados de imagem obtidos. Tive, ainda, a oportunidade de participar na elaboração dos relatórios de imagem.

10. Unidade de isolamento de doenças infecciosas

O horário realizado na UIDI compreendia turnos previamente estabelecidos mensalmente com duração de 5 horas, ocorrendo no período da tarde (16 às 21 horas).

Nesta unidade, efetuei tarefas semelhantes às realizadas no internamento, anteriormente descritas, em ambiente controlado sendo obrigatório o uso de equipamento de proteção individual e o cumprimento das regras de segurança neste local aplicadas.

11. Laboratório de Anatomia Patológica da FMV

No laboratório de Anatomia Patológica da FMV tive a oportunidade de acompanhar o patologista Dr. Hugo Pissarra no diagnóstico dos diferentes padrões de expressão do KIT em mastocitomas, rever as lâminas relativas aos casos clínicos utilizados no estudo realizado e, ainda, participar na rotina laboratorial da técnica de imunohistoquímica conduzida pela técnica de laboratório Sandra Carvalho. Estas atividades possibilitaram a compreensão prática do tema, na observação dos vários padrões de expressão do KIT e da técnica de imunohistoquímica, e, também, o acompanhamento dos casos clínicos desde a consulta no HE-FMV até aos resultados laboratoriais no Laboratório de Anatomia Patológica da FMV.

12. Comunicações científicas

No decorrer do estágio, participei, com uma comunicação em painel – Dilatação por Balão de Estenose Esofágica (anexo II), como co-autora, no XIV Congresso do Hospital Veterinário Montenegro 2018, que se realizou entre 24 e 25 de Fevereiro de 2018, no Porto.

CAPÍTULO 2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

MASTOCITOMA CANINO

1. O Mastócito

Os mastócitos estão amplamente distribuídos pelo organismo, tanto no tecido conjuntivo como nas mucosas, e foi estimado que, se todos os mastócitos fossem agrupados, formariam um órgão do tamanho do baço. Os mastócitos são uma população heterogênea de células com aparentes diferenças no seu desenvolvimento, conteúdo em mediadores inflamatórios, ultraestrutura e, funcionalmente, na sua habilidade em interagir com o ambiente local. (Bradding & Holgate, 1999)

O mastócito participa ativamente em diversos processos fisiológicos, patológicos e imunológicos, como, imunidade inata e adquirida, reações alérgicas, remodelação tecidual, cicatrização de feridas, angiogênese, fibrose, doenças autoimunes e neoplasias (Bradding & Holgate, 1999; Puxeddu, Piliponsky, Bachelet, & Levi-Schaffer, 2003).

Os mastócitos localizam-se na proximidade de superfícies expostas ao ambiente externo, como a pele, a mucosa dos tratos gastrointestinal, respiratório e geniturinário, que são portas de entrada de infecção comuns. Estas células figuram, também, no tecido conjuntivo, perto de vasos e nervos (Ribatti & Crivellato, 2012). Os mastócitos cutâneos estão preferencialmente localizados no tecido perivascular sanguíneo e linfático, junto aos anexos cutâneos e nervos, o que lhes permite interagir prontamente com as células residentes da derme, bem como responder a proteínas estranhas circulantes e agentes infecciosos (Tharp, 1998).

1.1. Morfologia

O mastócito é uma célula mononucleada de 5 a 20 μm de diâmetro, (Tharp, 1998; Ribatti & Crivellato, 2012), que varia de forma consoante o seu habitat, sendo redonda quando isolada, oval quando adjacente aos vasos sanguíneos e poligonal ou fusiforme quando integrando o tecido conjuntivo (Yong, 1997). Esta célula tem, no seu citoplasma, uma composição normal em organelas, mas a sua característica mais evidente são os grânulos citoplasmáticos que variam entre 0,2 e 0,7 μm de diâmetro, consoante os autores (Tharp, 1998; Yong, 1997). Estes grânulos contêm numerosos mediadores inflamatórios que são libertados aquando da sua estimulação (Tharp, 1998). Cada mastócito contém, em média, 1000 grânulos ocupando cerca de 50 % do seu citoplasma (Helander & Bloom, 1974; Yong, 1997), e cada grânulo encerra numerosos mediadores inflamatórios pré-formados, como a histamina, os proteoglicanos (heparina e/ou sulfato de condroitina E), as proteases (quimase, triptase, catepsina G e carboxipeptidase) e peptídeos antimicrobianos (catelicidina); mediadores lipídicos produzidos

aquando da estimulação como os eicosanoides (leucotrienos, prostaglandinas e fator de ativação plaquetária). São, ainda, sintetizados e libertados aquando da estimulação uma variedade de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento (Tharp, 1998; Galli et al., 2005; Beaven, 2009). Os proteoglicanos, dentro dos grânulos dos mastócitos, permitem a ligação a uma variedade de corantes catiónicos, como o azul de toluidina ou o Giemsa, que coram metacromaticamente. (Tharp, 1998)

1.2. Origem e diferenciação

No homem, a diferenciação dos mastócitos efetua-se a partir de progenitores hematopoiéticos $CD34^+/c-kit^+/CD13^+$, presentes na medula óssea, no sangue periférico, no fígado fetal e no sangue do cordão umbilical (Hill & Martin, 1998), sendo precursores dos mastócitos, monócitos e mastócitos/monócitos (Kirshenbaum et al., 1999). Este precursor pluripotencial circula no sangue periférico com o aspeto de célula mononucleada agranular (Tharp, 1998), e posteriormente à sua migração para diversos tecidos, assume a sua típica aparência granular e completa a sua proliferação e diferenciação em mastócitos maduros com a concomitante diversidade fenotípica (Hill & Martin, 1998; Gurish e Austen, 2001).

A diferenciação e proliferação dos mastócitos são reguladas por dois mecanismos principais. O primeiro, é dependente de um fator de crescimento derivado dos fibroblastos (*Stem Cell Factor*- SCF), e o segundo, é dependente de citocinas procedentes de células T (Interleucinas 3, 4, 9 e 10) (Hill & Martin, 1998). O SCF, também conhecido por ligando do KIT, exerce o seu efeito através da sua ligação ao recetor transmembranar tirosina quinase (KIT), e está envolvido nos processos de quimiotaxia, adesão, diferenciação, proliferação, sobrevivência, síntese e secreção de mediadores inflamatórios. Além do SCF, o fator de crescimento nervoso (NGF) também apresentou propriedades promotoras do crescimento dos mastócitos em culturas hematopoiéticas humanas (Hill & Martin, 1998).

1.3. Heterogeneidade

Os mastócitos de diferentes tecidos exibem variações consideráveis nas suas características morfológicas, bioquímicas e funcionais (Hill & Martin, 1998; Welle, 1997). Esta capacidade de gerar populações individuais (dependendo da sua localização anatómica e dos processos biológicos em que participam) permite maior flexibilidade e diversidade da resposta dos mastócitos aos requerimentos fisiológicos, imunológicos, inflamatórios e outras respostas biológicas em que estejam envolvidos (Galli et al., 2005).

A heterogeneidade dos mastócitos foi primeiramente descrita no rato, onde se demonstrou que as células da pele eram distinguíveis das da mucosa intestinal pelas suas características histoquímicas e propriedades secretoras. Isto levou à terminologia distinta de mastócitos das mucosas e mastócitos do tecido conjuntivo para descrever as duas subpopulações (Hill &

Martin, 1998). Os mastócitos das mucosas contêm apenas triptase e são encontrados na mucosa intestinal e do pulmão, enquanto que os do tecido conjuntivo contêm triptase, quimase, carboxipeptidase e catepsina G e são encontrados na pele, cavidade peritoneal, e serosa e lamina própria do intestino (Noli e Miolo, 2001; Sur, Cavender, & Malaviya, 2007). No homem, foram inicialmente identificados dois tipos de mastócitos, com base em determinações bioquímicas e morfológicas. Os mastócitos da pele e submucosa intestinal contêm grânulos associados à triptase e à quimase, além de carboxipeptidase e catepsina G, denominando-se M τ Q (Tharp, 1998; Hill & Martin, 1998). Por outro lado, a maioria dos mastócitos do pulmão e da mucosa intestinal produz apenas triptase e foi denominado M τ (Hill & Martin, 1998; Tharp, 1998). Um considerável número de mastócitos, que exprime apenas quimase denominado M q , pode estar presente numa medula óssea normal ou reativa (Horny, Greschniok, Jordan, Menke, & Valent, 2003) e foi encontrado na pele, nos gânglios axilares e pulmão, bem como na mucosa e submucosa intestinal (Tharp, 1998; Sur et al., 2007). Os mastócitos do cão, tal como os mastócitos do Homem, são heterogêneos em relação ao seu conteúdo em proteases (Caughey, Lazarus, Viro, Gold, & Nadal, 1988). Com base no seu conteúdo em triptase e quimase e na sensibilidade ao formol, identificaram-se três tipos de mastócitos (M τ Q, M τ , M q) com a respetiva localização semelhante aos do Homem (Kube, Audigé, Küther, & Welle, 1998). Num estudo realizado sobre a distribuição dos mastócitos em cães (Noviana, Mamba, Makimura, & Horii, 2004), verificou-se a localização preferencial dos M τ no pulmão, a localização exclusiva dos M q no baço e as várias localizações dos M τ Q na língua, pulmão, fígado, baço e pele. Os mastócitos que contêm as duas enzimas são os mais comuns na pele canina, constituindo cerca de 70% dos mastócitos cutâneos (Noli & Miolo, 2001). Os mastócitos do trato gastrointestinal mais frequentes são os M τ Q (Kleinschmidt, Meneses, Nolte, & Hewicker-Trautwein, 2008).

O fenótipo dos mastócitos é, também, heterogêneo no seu conteúdo em proteoglicanos, sendo que os mastócitos do tecido conjuntivo do rato e os M τ Q do Homem contêm heparina, enquanto que os mastócitos da mucosa do rato e os M τ humanos contêm predominantemente sulfato de condroitina E (Hill & Martin, 1998; Noli & Miolo, 2001). No Homem, o fenótipo dos mastócitos também se apresenta heterogêneo no que respeita às diferentes citoquinas. Por exemplo, a IL-4 existe preferencialmente em M τ Q enquanto que a IL-5 e IL-6 estão quase exclusivamente restritas ao subtipo M τ (Bradding & Holgate, 1999; Puxeddu et al., 2003).

1.4. Recetores de superfície

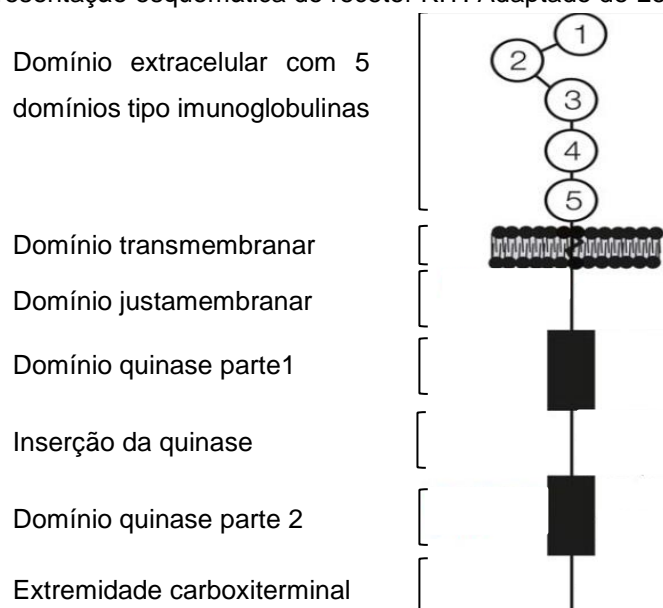
Os mastócitos expressam uma série de imunorecetores e outros recetores de superfície, o que lhes permite responder a diversos estímulos, contudo, os recetores com maior importância responsáveis pela regulação das funções destas células são o KIT e o recetor de alta afinidade para a IgE (Galli et al., 2005; Beaven, 2009; Gilfillan, Austin, & Metcalfe, 2011).

A principal função biológica dos mastócitos é a libertação de mediadores inflamatórios. Apesar deste processo ser despoletado por variados estímulos imunológicos ou não imunológicos, a via de sinalização mais importante *in vivo* é a agregação da imunoglobulina E (IgE), ligada ao seu recetor, a antígenos específicos.

O recetor da IgE expresso pelos mastócitos, conhecido como FcεR1, é composto por 4 subunidades, uma α, com o local de alta afinidade e especificidade de ligação com região Fc da IgE, uma β e duas γ (Hill & Martin, 1998), e tem domínio citoplasmático, transmembranar e extracelular (Tharp, 1998). Este processo de ativação celular, dependente do FcεR1, resulta em sucessivos eventos que culminam na secreção de mediadores inflamatórios pré-formados, mediadores lipídicos produzidos aquando estimulação, e síntese e secreção de fatores de crescimento, citoquinas e quimiocinas (Galli et al., 2005).

O proto-oncogene *c-kit* codifica um recetor transmembranar tirosina quinase tipo III (KIT ou CD117) (figura 1), que consiste numa proteína transmembranar constituída por uma componente extracelular (codificado pelos exões 1-9 do *c-kit*), contendo 5 domínios semelhantes a imunoglobulinas (que se liga ao SCF), um domínio transmembranar (exão 10) que ancora o KIT à membrana celular, um domínio justamembranar (exões 11 e 12) regulador negativo e um domínio citoplasmático tirosina quinase, dividido por uma sequência de inserção de quinase em regiões ligadoras de ATP (exão 13) e fosfotransferases (exão 16-20) (Hill & Martin, 1998; Lennartsson, Jelacic, Linnekin, & Shivakrupa, 2005; Roskoski, 2005; Webster, Kiupel, & Yuzbasiyan-Gurkan, 2006; Takeuchi et al., 2010). O KIT é expresso em mastócitos, melanócitos, progenitores hematopoiéticos e células germinativas. Nos tecidos normais do cão, o recetor KIT é expresso nos mastócitos, nas células de Purkinje do cerebelo, nas células epiteliais dos ductos e ácinos da glândula mamária, nas células intersticiais de Cajal no trato gastrointestinal e nas células endométricas uterinas (Morini, Bettini, Preziosi, & Mandrioli, 2004).

Figura 1 - Representação esquemática do recetor KIT. Adaptado de Lennartsson et al, 2005



O ligando para este receptor, designado por SCF, ativa o KIT, tanto na sua forma solúvel como na sua forma ligada à membrana citoplasmática de células do tecido conjuntivo. O SCF é produzido por células do estroma da medula óssea, fibroblastos e células epiteliais (Tharp, 1998). Foi, ainda, demonstrada (de Paulis et al., 1999) a presença, clivagem e libertação do SCF em mastócitos humanos. A ativação do KIT é essencial não só para a proliferação e diferenciação dos mastócitos nos tecidos mas, também, para a modificação dos sinais intracelulares mediados pelo FcεR1 e para as respostas fisiológicas, sendo um potencial alvo para terapêutica (Beaven, 2009). A sua sinalização é, ainda, importante na eritropoiese, linfopoiese, megacariocitopoiese, gametogénese e melanogénese (Roskoski, 2005).

1.5. Funções biológicas

A capacidade dos mastócitos atuarem tanto em processos fisiológicos como em processos patológicos está dependente não só da sua quantidade nos tecidos mas, também, da dimensão e natureza dos mediadores libertados (Gilfillan et al., 2011). No que toca aos processos fisiológicos, os mastócitos são conhecidos por regular a vasodilatação, homeostase vascular, respostas imunes inatas ou adquiridas e angiogénese. Por outro lado, estão implicados na patogenia de muitas doenças, nomeadamente, alergia, asma, anafilaxia, doenças gastrointestinais, vários tipos de neoplasia e doenças cardiovasculares (Krystel-Whittemore, Dileepan, & Wood, 2016)

Os mastócitos são geralmente considerados células chave na patogenia de doenças alérgicas como asma, rinite, dermatite atópica, urticária, anafilaxia, e alergias alimentares. Nestas reações de hipersensibilidade do tipo I, estas células são ativadas pela ligação de IgE a antígenos multivalentes, resultando na libertação de diferentes mediadores inflamatórios (Hill & Martin, 1998). No entanto, deveriam ser reconhecidos como uma componente crítica do sistema imunitário, pois desempenham um papel benéfico tanto na imunidade inata como na adquirida durante infeções bacterianas, virais e parasitárias (Sur et al., 2007; Galli et al., 2005). No que diz respeito à imunidade inata, os mastócitos são importantes na eliminação de bactérias através da libertação de mediadores pró-inflamatórios, incluindo o fator de necrose tumoral (TNF-α), leucotrienos e triptase (Sur et al., 2007). Os mediadores inflamatórios libertados aumentam a permeabilidade vascular e a acumulação de fluidos, e recrutam outras células, como eosinófilos, linfócitos NK e neutrófilos. Os mastócitos libertam ainda peptídeos antimicrobianos, como a catelicidina. A libertação de mediadores ajuda, também, na expulsão de parasitas do trato gastrointestinal ou respiratório através do aumento da permeabilidade vascular e da contração do músculo liso. Na imunidade adquirida, o papel dos mastócitos é o recrutamento de linfócitos T para apresentação de antígenos ou para ativação direta destas células, e, ainda, a estimulação de produção de imunoglobulinas por parte dos linfócitos B (Beaven, 2009; Krystel-Whittemore et al., 2016).

Os mastócitos foram implicados na cicatrização fisiológica de feridas e na fibrose, devido ao seu potencial para influenciar diretamente os fibroblastos e/ou indiretamente outras células levando a uma resposta pró-fibrótica (Puxeddu et al., 2003).

1.6. Crescimento tumoral

A inflamação no local de crescimento tumoral resulta na acumulação de uma variedade de tipos celulares, que estão intimamente ligados à cinética do crescimento tumoral. Os mastócitos são uma das células iniciais e persistentes, a infiltrar tumores em desenvolvimento, muitas vezes antes de ter ocorrido crescimento tumoral significativo ou angiogênese (Maltby, Khazaie, & McNagny, 2010). O recrutamento e ativação dos mastócitos é mediado maioritariamente pelo SCF produzido pelas células tumorais (Ribatti & Crivellato, 2012). Foi demonstrada a sua acumulação em pólipos adenomatosos, melanomas malignos, carcinomas mamários e carcinomas colorretais (Beaven, 2009; Ribatti & Crivellato, 2012).

Os potenciais efeitos dos mastócitos no crescimento tumoral podem ser efeitos diretos nas células tumorais, como a citotoxicidade por eles mediada, ou efeitos indiretos, como a angiogênese, a remodelação tecidual do ambiente envolvente e recrutamento de células imunitárias (Maltby et al., 2010).

Os mastócitos acumulam-se na fronteira entre tecidos saudáveis e malignos e são encontrados intimamente associados a vasos sanguíneos dentro do microambiente tumoral, expressam vários componentes angiogénicos e podem desempenhar um papel precoce na angiogênese de tumores em desenvolvimento. Na maioria dos tumores no Homem, quantidades elevadas de mastócitos estão associadas a uma maior vascularização, e por vezes, à diminuição do tempo de sobrevivência do paciente. A angiogênese providencia os nutrientes necessários ao crescimento tumoral e é necessária à metastização de tumores sólidos em locais distantes do corpo (Maltby et al., 2010). Os mastócitos participam na remodelação tecidual da matriz extracelular durante a cicatrização de feridas, desempenhando um papel importante no crescimento tumoral, promovendo a propagação do tumor e formação de metástases (Maltby et al., 2010). Acresce que, os mastócitos são reconhecidos pela sua capacidade para recrutar eosinófilos e neutrófilos, para ativar respostas adquiridas dos linfócitos B e T e na apresentação de antígenos, implicando-os na modulação da rejeição tumoral (Maltby et al., 2010; Ribatti & Crivellato, 2012).

2. Incidência e epidemiologia

2.1. Incidência

Os mastocitomas são as neoplasias cutâneas mais comuns em cães (Finnie & Bostock, 1979; Bostock, 1986; Rothwell et al., 1987), representando cerca de 7 a 21% de todos os tumores

cutâneos (Finnie & Bostock, 1979; Macy, 1985; Bostock, 1986; Gieger, Northrup, & Wall, 2005; Welle, Bley, Howard, & Rüfenacht, 2008; Kiupel, 2016) e 11 a 27% de todas as neoplasias cutâneas malignas (Macy, 1985).

2.2. Raça

Os mastocitomas já foram reportados na maioria das raças, no entanto, está descrita uma predisposição racial em *Boxer*, *Retriever do Labrador*, *Golden Retriever*, *Terrier*, *Shar Pei*, *Cocker Spaniel*, *Bulldog inglês*, *Bouledogue francês*, *Schnauzer*, *Braco de Weimar*, *Pug* e *Beagle* (Hottendorf & Nielsen, 1967; Bostock, 1973; Cohen, Reif, Brodey, & Keiser, 1974; Rothwell et al., 1987; Simoes et al., 1994; Miller, 1995; Thamm & Vail, 2007; Morris & Dobson, 2008; Shoop et al., 2015).

2.3. Sexo

Aparentemente, não existe predisposição sexual para a ocorrência de mastocitomas (Hottendorf & Nielsen, 1967; Patnaik, Ehler, & MacEwen, 1984; Macy, 1985; Rothwell et al., 1987; Thamm & Vail, 2007; Morris & Dobson, 2008; Kiupel, 2016). Um estudo realizado com uma amostra de 252 cães diagnosticados com mastocitoma (White, Hohenhaus, Kelsey, & Procter-Gray, 2011), refere que as fêmeas castradas têm um risco substancialmente superior de desenvolver esta neoplasia comparadas com as fêmeas inteiras, e que os machos castrados têm um risco possivelmente superior ao de machos inteiros, sendo a razão desconhecida.

2.4. Idade

A incidência de mastocitomas em cães aumenta com a idade, com uma média de 8-9 anos, mas com idades compreendidas entre 1 mês e 19 anos (Hottendorf & Nielsen, 1967; Cohen et al., 1974; Patnaik et al., 1984; Macy, 1985; Rothwell et al., 1987; Simoes et al., 1994; Thamm & Vail, 2007; Morris & Dobson, 2008; Shoop et al., 2015; Kiupel, 2016).

3. Etiopatogenia

A etiologia dos mastocitomas é desconhecida, no entanto, é provavelmente multifatorial, e a predisposição racial poderá indicar um envolvimento genético.

A transmissão hereditária foi investigada como uma possível etiologia nalgumas raças como *Boxer*, *Bulldog inglês* e *Boston Terrier*. No estudo de Stone, Jacky, & Prieur (1991) foram detetadas instabilidades em certos cromossomas, que no Homem predispõem ao

aparecimento de certas neoplasias, contudo estas alterações foram interpretadas como consequência do envelhecimento, e não como uma doença familiar ou racial.

Nalguns mastocitomas caninos foram identificadas alterações no gene supressor tumoral p53. O produto proteico deste gene tem funções importante que incluem a paragem do ciclo celular em células com ADN danificado, a indução de transcrição de enzimas reparadoras de ADN durante esta paragem e a indução de apoptose em células com danos genéticos irreparáveis. No entanto, a sequenciação deste gene, num número limitado de casos de mastocitoma, não revelou mutações (Thamm & Vail, 2007).

O KIT poderá desempenhar um papel importante na transformação tumoral e na proliferação de células malignas. A expressão do KIT foi demonstrada imunohistoquimicamente tanto em mastócitos caninos normais, como em neoplásicos, com maior expressão em mastocitomas pouco diferenciados (London, Kisseberth, Galli, Geissler, & Helfand, 1996; Kiupel, Webster, Kaneene, Miller, & Yuzbasiyan-Gurkan, 2004; Morini et al., 2004; Webster, Yuzbasiyan-gurkan, Kaneene, Miller, Resau & Kiupel, 2006). Além disso, diferentes padrões de expressão (citoplasmático e membranar) do KIT foram encontrados entre mastócitos caninos normais e neoplásicos, e os padrões de expressão citoplasmáticos atípicos, devido a mutações no *c-kit*, foram associados a um pior prognóstico (Kiupel et al., 2004; Webster, Yuzbasiyan-Gurkan et al, 2006; Webster, Yuzbasiyan-Gurkan, Miller, Kaneene, & Kiupel, 2007; Da Costa et al., 2007). Diferentes autores reportaram uma variedade de mutações no *c-kit* em mastocitomas caninos, particularmente no exão 11, incluindo diferentes mutações pontuais (deleções e substituições) e duplicações em *tandem* na região codificadora do domínio justamembranar. Estes estudos demonstraram que cerca de 14 a 46 % dos mastocitomas caninos são afetados por mutações no *c-kit* (Ma et al., 1999; London et al., 1999; Downing, Chien, Kass, Moore, & London, 2002; Zemke et al., 2002; Riva, Brizzola, Stefanello, Crema, & Turin, 2005; Webster, Yuzbasiyan-Gurkan et al, 2006; Letard et al., 2008). Foi, ainda, considerada uma associação significativa entre presença de mutações e alto grau histológico do tumor (Downing et al., 2002; Zemke et al., 2002). As mutações do *c-kit*, caracterizadas por duplicações internas em *tandem*, originam uma proteína transmembranar KIT ativada na ausência de ligandos (SCF), iniciando, assim, a sua sinalização celular descontrolada (Ma et al., 1999; London et al., 1999; Pryer et al., 2003), levando ao crescimento celular descontrolado e comportamento agressivo típico do desenvolvimento tumoral (Kitayama et al., 1996). As mutações do *c-kit* e padrões de expressão atípicos do recetor KIT estão associados a um aumento da expressão de Ki67 e AgNORs, que são ambos marcadores de proliferação celular aumentada (Da Costa et al., 2007; Webster et al., 2007). Apesar de todas estas descobertas, 50%, ou mais, dos mastocitomas caninos não estão relacionados com mutações no *c-kit*. Este facto sugere que as mutações neste gene estão associadas a um desenvolvimento e/ou progressão de alguns mastocitomas, mas mutações noutros genes podem estar envolvidas na iniciação e progressão da maioria dos mastocitomas caninos.

Além das mutações genéticas, alguns autores sugeriram a implicação da inflamação crônica cutânea no desenvolvimento dos mastocitomas (Govier, 2003). No entanto, foram documentados apenas casos raros de mastocitomas associados a dermatite crônica, cicatrização e a aplicação de produtos irritantes na pele (Hottendorf & Nielsen, 1967) .

Outros estudos sugeriram a possibilidade de uma causa viral, mas não foi encontrada evidência inequívoca de uma etiologia viral (Macy, 1985; Lombard, Moloney, & Rickard, 1963; Bowles et al., 1972).

4. Apresentação clínica

4.1. Localização

A maioria dos mastocitomas no cão aparecem na derme e no tecido subcutâneo (Macy, 1985; Rothwell et al., 1987). Os mastocitomas primários extracutâneos podem desenvolver-se na cavidade oral (Patnaik et al., 1982; Iwata et al., 2000; Hillman et al., 2010; Elliott et al., 2016), na cavidade nasal (Naganobu et al., 2000), na conjuntiva (Barsotti et al., 2007; Fife, Blocker, Fife, Dubielzig, & Dunn, 2011), na glândula salivar, na nasofaringe (Patnaik et al., 1982), na laringe (Beaumont et al., 1979), no músculo (Gieger et al., 2003), na medula espinhal (Moore et al., 2016), na uretra (Steffey, Rassnick, Porter, & Njaa, 2004), no útero (Bahrami et al., 2014), no trato gastrointestinal (Iwata et al., 2000; Ozaki, Yamagami, Nomura, & Narama, 2002), no fígado e baço (Takahashi et al., 2000) e no pulmão (Kiupel, 2016). Os mastócitos normais são encontrados em abundância nos pulmões e trato gastrointestinal, no entanto estes locais apresentam baixas taxas de prevalência de desenvolvimento de mastocitoma. O mastocitoma visceral (normalmente referido como mastocitose sistêmica) é geralmente o resultado da propagação sistêmica de um mastocitoma primário cutâneo agressivo, apesar de poder ocorrer como uma síndrome independente (O'Keefe, Couto, Burke-Schwartz, & Jacobs, 1987; Takahashi et al., 2000).

Os mastocitomas cutâneos surgem aproximadamente em 50% das vezes no tronco e região perineal, 40% nos membros e 10 % na cabeça e pescoço (Hottendorf & Nielsen, 1967; Bostock, 1973; Macy, 1985; Rothwell et al., 1987; Séguin et al., 2001; Sfiligoi et al., 2005; Kiupel, Webster, Miller, & Kaneene, 2005; Thamm & Vail, 2007).

Os mastocitomas subcutâneos localizam-se em qualquer parte do corpo, mas para cerca de 60% destes tumores os locais mais comuns são os membros, dorso e tórax (Newman, Mrkonjich, Walker, & Rohrbach, 2007; Thompson, Pearl, et al., 2011; Thompson, Yager, et al., 2011).

4.2. Morfologia

O mastocitoma cutâneo surge habitualmente sob a forma de nódulos solitários, no entanto, cerca de 10 a 20 % dos cães apresentam tumores múltiplos (Hottendorf & Nielsen, 1967; Macy, 1985; Sfiligoi et al., 2005; Murphy et al., 2006; Mullins et al., 2006; Thamm & Vail, 2007). A aparência clínica dos mastocitomas cutâneos pode variar grandemente, desde nódulos cutâneos a tumefações difusas ou, mais comumente, tumores eritematosos em relevo e sem pêlo. O tamanho varia entre poucos milímetros e massas de grandes dimensões (Kiupel, 2016). Num estudo com 300 cães (Hottendorf & Nielsen, 1967) a maioria dos tumores foram apresentados como nódulos cutâneos bem circunscritos mas alguns dos tumores de maior tamanho (>10 cm em diâmetro) eram pouco circunscritos e semelhantes a tumefações edematosas difusas da derme e epiderme. A epiderme apresentava-se eritematosa e ulcerada em aproximadamente 9% destes tumores. Em relação ao tamanho, 52% dos mastocitomas apresentavam diâmetro inferior a 3 cm, 41,8% variavam entre 3 e 10 cm e cerca de 6,3% apresentavam diâmetro superior a 10 cm.

Os mastocitomas subcutâneos múltiplos são raros e cerca de 95% são lesões solitárias (Thompson, Pearl, et al., 2011), que fazem protuberância sobre a pele, mas não penetram na derme e raramente ulceram. Os mastocitomas com origem no tecido subcutâneo são normalmente pouco circunscritos e podem assemelhar-se a lipomas (Kiupel, 2016).

4.3. Comportamento biológico

Os mastocitomas bem diferenciados apresentam-se como lesões solitárias, bem circunscritas, de crescimento lento e estão normalmente presentes durante meses, sendo provavelmente de desenvolvimento benigno. Enquanto que tumores pouco diferenciados se apresentam como lesões ulceradas, pruriginosas, invasivas, pouco circunscritas com maiores dimensões, de crescimento rápido, sendo provavelmente de desenvolvimento maligno. As últimas, estão normalmente na proximidade de lesões mais pequenas (Bostock, 1973; Thamm & Vail, 2007). Os mastocitomas de grandes dimensões, invasivos e gravemente ulcerados são geralmente malignos, no entanto, os mastocitomas com aparência bem diferenciada não devem ser assumidos como benignos (Kiupel, 2016).

Os mastocitomas malignos podem metastizar através da via linfática ou via sanguínea. Na maioria dos casos, o primeiro sinal de metastização é o aumento dos linfonodos locais. A metastização pulmonar é rara; já os mastocitomas disseminados normalmente metastizam para o baço, fígado e rins. A pele é, também, um local comum de desenvolvimento de metástases (O'Keefe, 1990; Morris & Dobson, 2008). A maioria dos mastocitomas metastiza em primeiro lugar os linfonodos locais (76-96%) e em seguida o baço (46%), o fígado (41%) ou outros órgãos viscerais (O'Keefe, 1990; Thamm & Vail, 2007; Welle et al., 2008). Podem ser observados mastócitos neoplásicos na medula óssea e no sangue periférico em casos de

disseminação sistêmica (Thamm & Vail, 2007). A forma visceral de mastocitomas (mastocitose disseminada) é normalmente precedida por um mastocitoma cutâneo indiferenciado primário (Govier, 2003; Thamm & Vail, 2007).

4.4. Sinais paraneoplásicos

Os sinais paraneoplásicos sistêmicos e locais, que estão ligados à liberação de histamina, heparina e proteases, são frequentemente observados (Kiupel, 2016). Além disso, a manipulação mecânica do tumor, durante o exame físico, pode induzir a desgranulação dos mastócitos, levando à formação de eritema e pápulas, sendo este sinal conhecido como sinal de Darrier (Thamm & Vail, 2007). O edema, o eritema e o prurido local são mediados pelos receptores H1 de histamina (Kiupel, 2016).

Uma possível complicação dos mastocitomas é a ulceração gastrointestinal. Cerca de 35% a 83% dos cães com mastocitoma, submetidos a necropsia, evidenciam úlceras gástricas; em cães com mastocitoma avançado, em comparação com cães normais e cães com mastocitoma inicial foram encontradas concentrações plasmáticas mais elevadas de histamina (Howard, Sawa, Nielsen, & Kenyon, 1969; Fox et al., 1990; Ishiguro et al., 2003). A estimulação dos receptores H2 nas células parietais, a produção de ácido gástrico em excesso e o desenvolvimento de úlceras e hipermotilidade gástrica são provocados por concentrações elevadas de histamina (Ishiguro et al., 2003). Esta complicação manifesta-se pela ocorrência de vômito, hemorragias gastrointestinais, anorexia e dor abdominal, e alguns cães podem até desenvolver anemia secundária devido a deficiência em ferro causada pela hemorragia gastrointestinal. Está, ainda, reportado o aparecimento de peritonite secundária à perfuração de úlceras gástricas (O'Keefe, 1990; Kiupel, 2016).

Em cães com mastocitoma estão, também, reportadas alterações da coagulação, que são provavelmente causadas pela liberação de heparina dos grânulos dos mastócitos (Macy, 1985; O'Keefe et al., 1987; O'Keefe, 1990).

No local de remoção de mastocitomas foram também observados atrasos na cicatrização, os quais foram atribuídos ao efeito local de enzimas proteolíticas e aminas vasoativas libertadas pelo tumor (Macy, 1985; O'Keefe, 1990; Thamm & Vail, 2007).

A liberação repentina de grandes quantidades de histamina pode provocar reações anafiláticas agudas ou colapso em cães com grandes mastocitomas ou tumores bastante difusos (Kiupel, 2016).

A desgranulação excessiva dos mastócitos durante a manipulação cirúrgica excessiva, criocirurgia ou hipertermia pode provocar choque hipotensivo (Macy, 1985).

5. Diagnóstico

A avaliação diagnóstica de cães com suspeita de mastocitoma tem três objetivos: o diagnóstico definitivo através de citologia e/ou histopatologia; o estadiamento clínico, e documentação de sinais paraneoplásicos (Rogers, 1996).

5.1. Avaliação citológica

A punção aspirativa por agulha fina (PAAF) de massas cutâneas e subcutâneas é uma técnica simples e deve ser realizada antes da cirurgia, devido à influência do diagnóstico pré-operatório no tipo e extensão da intervenção cirúrgica (O'Keefe, 1990; Govier, 2003; Dobson & Scase, 2007; Blackwood et al., 2012). Os mastocitomas podem geralmente ser diagnosticados através do exame citológico do conteúdo de PAAFs (O'Keefe, 1990; Rogers, 1996; Govier, 2003; Dobson & Scase, 2007), fornecendo um diagnóstico correto em 96 % dos casos de mastocitomas caninos confirmados histologicamente (Baker-Gabb et al., 2003).

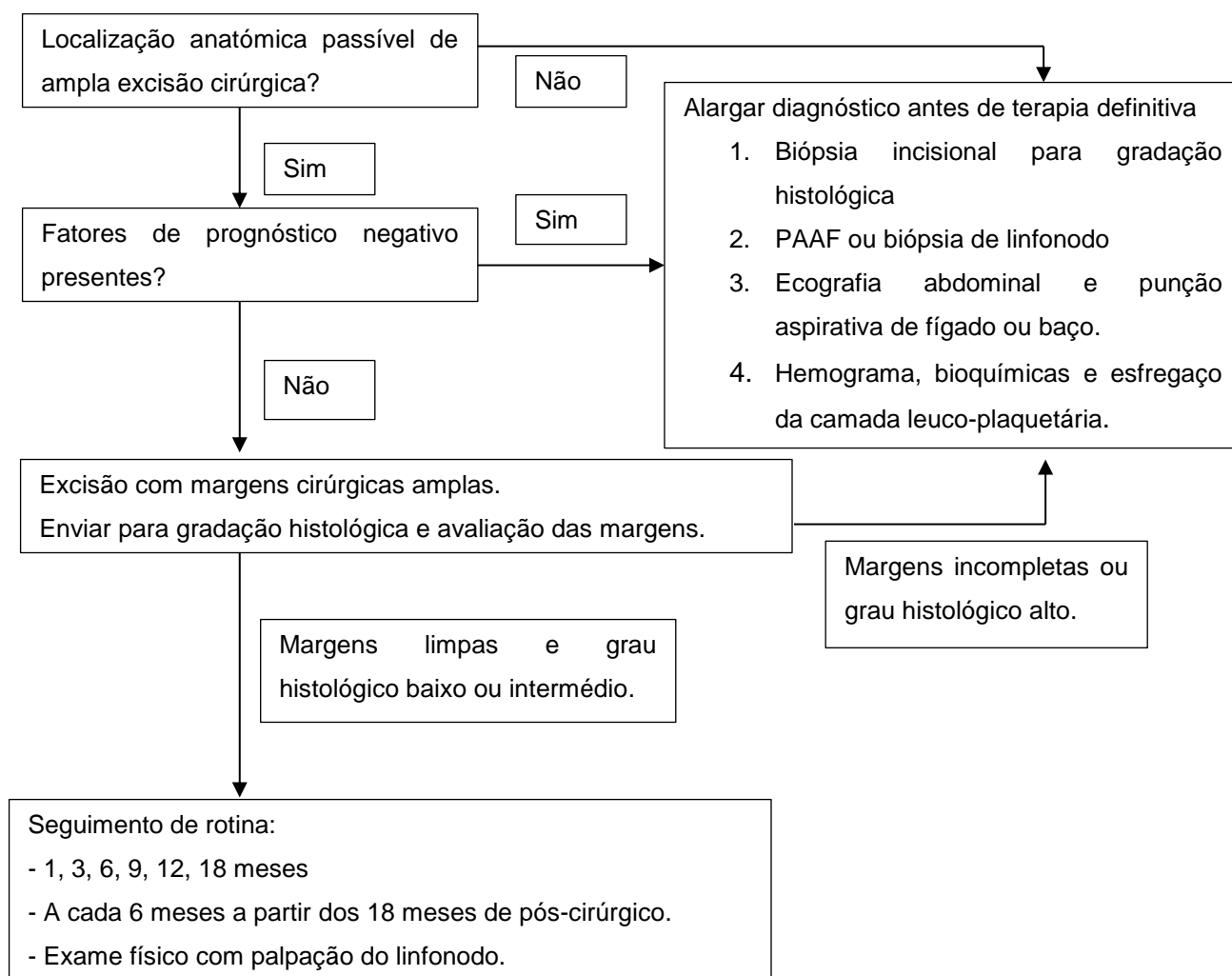
A citologia de mastocitomas revela uma população de células redondas discreta com um número e tamanho variável de grânulos citoplasmáticos desde azuis a roxos (Macy, 1985; O'Keefe, 1990; Govier, 2003; Kiupel, 2016). As células apresentam um núcleo tanto oval, como redondo, que pode estar mascarado pela intensa coloração de células bastante granuladas (Macy, 1985; Govier, 2003; Kiupel, 2016), sendo que os mastócitos pouco granulados são difíceis de reconhecer (O'Keefe, 1990; Thamm & Vail, 2007). Outras células encontradas na citologia são eosinófilos em número variável e/ou fibroblastos, devido aos fatores quimiotáticos (Macy, 1985; O'Keefe, 1990; Kiupel, 2016). Os grânulos dos mastócitos podem ser corados com as colorações hematológicas de rotina (Wright's, Giemsa, Leishman, etc.) mas também com colorações do tipo Romanowsky rápido (Diff-Quik) as quais são utilizadas na maioria das vezes (Macy, 1985; O'Keefe, 1990; Thamm & Vail, 2007). No entanto, alguns mastocitomas apresentam grânulos deficientemente corados com colorações rápidas, a não ser que a lâmina seja imersa durante vários minutos no fixador de álcool (Rogers, 1996; Strefezzi, Xavier, Kleeb, & Catão-Dias, 2009; Kiupel, 2016).

A morfologia celular e as características da coloração observadas na citologia fornecem uma indicação sobre o grau de diferenciação do tumor, no entanto, é necessária uma avaliação histológica para a correta classificação dos mastocitomas (Macy, 1985; Blackwood et al., 2012). Normalmente tumores de alto grau originam amostras com grande celularidade, células pobres em grânulos citoplasmáticos, núcleo irregular e aumento de pleomorfismo e figuras mitóticas (Macy, 1985; O'Keefe, 1990; Shelly, 2003). Em certos casos, as células pobres em grânulos de tumores de alto grau podem ser mais facilmente reconhecidas em preparações citológicas do que em secções histológicas devido à maior resolução dos grânulos em citologia (Macy, 1985; Kiupel, 2016).

5.2. Estadiamento Clínico

A extensão da investigação diagnóstica complementar e estadiamento clínico após o diagnóstico citológico de mastocitoma depende da presença ou ausência de fatores de prognóstico negativos (Figura 2) (Govier, 2003; Thamm & Vail, 2007). O estadiamento clínico de mastocitomas é uma tentativa de definir a localização e a extensão da neoplasia, de escolher a terapia apropriada para cada caso e de informar os tutores do prognóstico provável após o tratamento (Macy, 1985; O'Keefe, 1990; Rogers, 1996; Thamm & Vail, 2007).

Figura 2 – Etapas para o diagnóstico de mastocitomas caninos. Adaptado de Thamm & Vail, 2007.



Historicamente, um estadiamento completo incluía a avaliação citológica dos linfonodos regionais, o hemograma completo e o esfregaço da camada leuco-plaquetária (com o objetivo de documentar mastocitose sistémica), a ecografia abdominal com avaliação citológica do baço e fígado se justificado, as radiografias torácicas, e a punção aspirativa da medula óssea (Govier, 2003; Thamm & Vail, 2007). Atualmente, nos casos que requerem estadiamento clínico pré-cirúrgico, as investigações diagnósticas devem incluir no mínimo a PAAF do

linfonodo regional, mesmo que este se encontre de tamanho normal (Gieger et al., 2003), e a ecografia abdominal (Thamm & Vail, 2007; Blackwood et al., 2012; Kiupel, 2016).

Deve ser realizado um exame físico completo, com a medição do tumor primário, inspeção cuidadosa de tumores adicionais, palpação de linfonodos e palpação abdominal para detetar hepatomegalia ou esplenomegalia (O'Keefe, 1990).

Todos os linfonodos regionais devem ser examinados cuidadosamente para verificar sinais de aumento de tamanho e todos os linfonodos suspeitos devem ser aspirados para posterior avaliação citológica (Macy, 1985; London, 2008); no entanto, mesmo em casos em que o linfonodo regional não esteja aumentado de tamanho, pode ser importante a sua avaliação citológica (Garrett, 2014). Vários estudos (Gieger et al., 2003; Chaffin & Thrall, 2002; Lejeune et al., 2015) indicam a elevada ocorrência de metástases em linfonodos regionais de tamanho normal. A interpretação da citologia dos linfonodos pode ser difícil porque podem ser encontrados mastócitos em aspirados de linfonodos de animais normais (Rogers, 1996; Dobson & Scase, 2007). Assim, as diretrizes da Organização Mundial de Saúde (OMS) que sugerem a avaliação citológica apenas para a presença ou ausência de mastócitos podem levar a um diagnóstico incorreto de metástases (Séguin et al., 2001). Para colmatar estas lacunas de diagnóstico, as recomendações seguintes defendiam que o diagnóstico de metástases num linfonodo através de citologia só deveria ser considerado positivo quando os mastócitos representavam mais do que 3 % da população celular aspirada (Dobson & Scase, 2007). Contudo, mesmo com este critério, cerca de 25 % dos cães normais iria ser diagnosticado com mastocitoma metastizado (Thamm & Vail, 2007; Dobson & Scase, 2007; Blackwood et al., 2012). Com o objetivo de padronizar a interpretação de metástases nodais de mastocitoma, foram recentemente propostos dois esquemas de classificação para PAAF's de linfonodos ou biópsias dos mesmos, respetivamente (Krick, Billings, Shofer, Watanabe, & Sorenmo, 2009; Weishaar, Thamm, Worley, & Kamstock, 2014). Recorrendo à PAAF como meio de diagnóstico os critérios são os seguintes: 2-3 conjuntos de 2-3 mastócitos são considerados possíveis metástases; mais de 3 conjuntos de 2-3 mastócitos e/ou 2-5 conjuntos de mais de 3 mastócitos representam metástases prováveis; e segurança de presença de metástases é caracterizada por grande quantidade de mastócitos, e/ou a presença de conjuntos de mastócitos pouco diferenciados e/ou mais de 5 conjuntos de mais de 3 mastócitos (Krick et al., 2009). Nas biópsias nodais, foram identificados linfonodos com metástases evidentes (HN3) pela destruição e ausência da arquitetura normal do linfonodo devidos a discretos focos, nódulos, camadas, ou massas de células neoplásicas. Os linfonodos com metástases iniciais (HN2) apresentavam conjuntos de mais de 3 mastócitos no parênquima. Os linfonodos pré metastáticos (HN1) apresentavam mais de 3 mastócitos individualizados no parênquima de, no mínimo, 4 campos de alta ampliação. Os linfonodos livres de metástases tinham menos de 3 mastócitos individualizados, dispersos pelo parênquima, por campo de alta ampliação (Weishaar et al., 2014). Em casos suspeitos, a

excisão cirúrgica e avaliação histológica do linfonodo devem ser consideradas (Thamm & Vail, 2007).

O hemograma e os parâmetros bioquímicos sanguíneos devem ser incluídos nos testes de diagnóstico de todos os pacientes oncológicos, especialmente naqueles que apresentam sinais sistêmicos. As análises bioquímicas são importantes para avaliar os principais órgãos do animal antes de iniciar qualquer tratamento específico para o mastocitoma (Macy, 1985). A radiografia torácica raramente está indicada na avaliação de um paciente com mastocitoma, porque a frequência de metastização pulmonar é reduzida (Macy, 1985; Rogers, 1996; Thamm & Vail, 2007). Além disso, quando ocorre metastização pulmonar, é mais comum observar-se infiltrado intersticial difuso do que nódulos distintos (O'Keefe, 1990). Porém, em pacientes idosos, é sensata a realização de radiografias torácicas para excluir doenças concomitantes que possam complicar procedimentos futuros (Thamm & Vail, 2007).

A punção aspirativa de lesões ecograficamente suspeitas no fígado ou baço é recomendada, mas a interpretação pode ser complicada pela presença de mastócitos benignos nestes órgãos em animais normais (Thamm & Vail, 2007).

A fundamentação para a realização de esfregaços da camada leuco-plaquetária, em cães com mastocitoma cutâneo, para avaliar o envolvimento sistêmico tem sido contestada, visto que, a mastocitemia é bastante mais frequente em cães com processos inflamatórios do que com mastocitomas (McManus, 1999). Além do mais, o mastocitoma visceral constitui uma pequena minoria de todos os casos caninos. Assim, muitos autores abandonaram a rotina da realização do esfregaço da camada leuco-plaquetária, reservando este procedimento para casos específicos (Govier, 2003; Thamm & Vail, 2007; Dobson & Scase, 2007).

Também, a punção aspirativa de medula óssea deixou de ser recomendada no estadiamento clínico de mastocitomas (Thamm & Vail, 2007). A maioria dos cães com mastocitoma cutâneo não apresenta mastócitos circulantes ou evidência de infiltração da medula óssea (Dobson & Scase, 2007; Endicott et al., 2007; Thamm & Vail, 2007; Marconato et al., 2008) e o envolvimento do sangue periférico e da medula óssea é improvável na ausência de metástases do linfonodo regional e órgãos abdominais (Thamm & Vail, 2007; Dobson & Scase, 2007).

O sistema de estadiamento clínico para mastocitomas caninos da OMS (tabela 1) é amplamente utilizado, em conjunto com o grau histológico, no auxílio ao prognóstico e à seleção da terapêutica (Dobson & Scase, 2007).

A determinação exata de mastocitomas com estadio clínico II requer a identificação correta do linfonodo regional, assim como, a detecção de metástases no mesmo. O estudo de Worley (2012) sugere que o mapeamento dos linfonodos sentinela pode ser necessário para selecionar objetivamente o linfonodo com o maior risco de desenvolver metástases. De acordo com este estudo, 42% dos cães apresentavam metástases de mastocitoma em linfonodos sentinela diferentes dos linfonodos com a localização anatômica mais próxima (Worley, 2012).

Como já referido, a deteção de metástases no linfonodo pode, também, dificultar o correto estadiamento do tumor, devido à dificuldade para diferenciar células neoplásicas de células inflamatórias.

Tabela 1 – Sistema de estadiamento clínico para mastocitomas caninos da OMS. Adaptado de Owen, 1980.

Estadio	Descrição
I	Tumor solitário confinado à derme sem envolvimento do linfonodo regional Ia. Sem sinais sistémicos Ib. Com sinais sistémicos
II	Tumor solitário confinado à derme com envolvimento do linfonodo regional IIa. Sem sinais sistémicos IIb. Com sinais sistémicos
III	Múltiplos nódulos da derme ou tumores largamente infiltrativos, com ou sem envolvimento do linfonodo regional IIIa. Sem sinais sistémicos IIIb. Com sinais sistémicos
IV	Qualquer tumor com metastização à distância ou recidiva com metástases (incluindo envolvimento de sangue periférico e/ou medula óssea)

Vários estudos questionaram a utilidade deste sistema, especialmente no que diz respeito aos tumores de estadio clínico III (Thamm, Mauldin, & Vail, 1999; Dobson, Cohen, & Gould, 2004; Murphy et al., 2006; Mullins et al., 2006). Em primeiro lugar, de acordo com o sistema de estadiamento da OMS, nódulos cutâneos múltiplos e tumores muito infiltrativos são classificados igualmente no estadio III, apesar de não existirem diferenças na sobrevivência entre pacientes com mastocitomas solitários (estadio I) e aqueles com mastocitomas múltiplos (estadio III) do mesmo grau histológico; e cães no estadio II (com metástases no linfonodo regional) apresentarem pior prognóstico do que cães no estadio III (Thamm et al., 1999; Murphy et al., 2006; Mullins et al., 2006). Assim, vários autores sugerem que a categoria de nódulos múltiplos deveria ser removida do grupo de estadio III e que em cães com mastocitomas múltiplos cada nódulo deveria ser avaliado individualmente (Thamm & Vail, 2007; Dobson & Scase, 2007). Em segundo lugar, o termo “infiltrativo” é falacioso, visto que, de acordo com o sistema de gradação histológica para mastocitomas de Patnaik et al. (1984) todos os tumores de grau II ou III infiltram o tecido subcutâneo e por consequência, seriam classificados com o estadio III, apesar do prognóstico de alguns tumores de grau II ser razoavelmente bom (Dobson & Scase, 2007). O estudo de Newman et al. (2007), sugere, ainda, que alguns mastocitomas subcutâneos têm um prognóstico ligeiramente melhor a longo prazo do que mastocitomas cutâneos com alto grau histológico. Assim sendo, foi recomendada uma troca de critérios entre os estádios 2 e 3, já que o envolvimento do

linfonodo regional apresenta prognóstico pior do que a simples detecção de mastocitomas cutâneos múltiplos (Sledge et al., 2016).

A atribuição do estadiamento IV é, igualmente, controversa, já que a detecção clínica de metástases distantes se apresenta difícil. O uso de raio x torácico tem sido questionado e o uso de ecografia abdominal para estadiamento clínico também é discutível (Sato & Solano, 2004; Book et al., 2011). A ecografia abdominal é regularmente utilizada, em cães com metástases nos linfonodos, para avaliar envolvimento do fígado ou baço. No entanto, um estudo recente não encontrou alterações na ecografia abdominal de cães com doença metastática comprovada citologicamente (Book et al., 2011). Um estudo anterior concluiu que a ecografia abdominal era inespecífica (Sato & Solano, 2004). E outro estudo correlacionou positivamente a imagem com os resultados de punções aspirativas de fígado e baço, mas concluiu que os resultados da ecografia abdominal são inespecíficos (Stefanello et al., 2009). A maioria dos oncologistas não faz aspiração, ecoguiada, de fígado e baço com aspecto normal, em cães com mastocitoma cutâneo, o que pode resultar na possibilidade de metástases distantes serem subdiagnosticadas.

Como consequência das fragilidades do sistema de estadiamento clínico da OMS acima mencionadas, um número significativo de cães estão provavelmente a ser tratados mais agressivamente do que o necessário (Dobson & Scase, 2007).

5.3. Avaliação histológica

Apesar da avaliação citológica de PAAFs proporcionar um diagnóstico prático, não fornece uma gradação histológica do tumor. Assim sendo, deve ser realizada uma biópsia excisional com a finalidade de remover o mastocitoma completamente, e submeter as amostras a gradação histológica e avaliação das margens (O'Keefe, 1990; Rogers, 1996; Thamm & Vail, 2007; Dobson & Scase, 2007; Sledge et al., 2016).

Quando a extirpação do tumor não é exequível, deve ser efetuada uma biópsia incisional para permitir a gradação histológica do mesmo, no entanto, esta é considerada menos desejável (Sledge et al., 2016).

5.3.1. Características histológicas

Na maioria dos casos o diagnóstico de mastocitomas é relativamente fácil. Estes apresentam-se como massas infiltrativas cutâneas e/ou subcutâneas não encapsuladas, em crescimento, compostas por células redondas organizadas em cordões densos ou dispersas. A morfologia celular depende do grau de diferenciação, mas a maioria dos mastócitos neoplásicos tem uma membrana celular nítida, um núcleo redondo central e um número variável de grânulos citoplasmáticos que coram de azul claro acinzentado com hematoxilina e eosina ou de roxo com corantes metacromáticos como o azul de toluidina. O estroma de colagénio varia de

escasso a abundante e pode parecer edematoso ou hialinizado. Os eosinófilos em número variável encontram-se dispersos pela massa neoplásica ou formam agregados. Em resposta à infiltração eosinofílica, podem ser observadas deposição marcada de mucina e hialinização perivascular, e pode, também, estar presente vasculite eosinofílica. Focos de desgranulação marcada de eosinófilos podem aprisionar feixes de colagénio eosinofílicos formando “figuras em chama” (Welle et al., 2008; Kiupel, 2016).

Os mastocitomas bem diferenciados consistem em massas bem circunscritas, mas não encapsuladas (Kiupel, 2016) compostas por células redondas com um pequeno núcleo central, um discreto nucléolo e um grande citoplasma altamente granuloso. As células tumorais estão organizadas em linhas ou dispersas separadas por feixes de colagénio. A epiderme sobrejacente está geralmente intacta (Ginn, Mansell, & Rakich, 2007). Estes tumores estão confinados à derme no sistema de gradação histológica de Patnaik (Patnaik et al., 1984).

Os mastocitomas de grau intermédio não são tão bem circunscritos e são compostos por aglomerados de células com membrana celular nítida, um núcleo maior e menor número de grânulos do que os tumores bem diferenciados. Podem também estar presentes células gigantes, binucleadas ou fusiformes e raras figuras mitóticas. As células tumorais estão organizadas em grupos separados por feixes de colagénio que podem estar espessados ou hialinizados com áreas de edema e necrose (Ginn et al., 2007).

Os mastocitomas indiferenciados são pouco circunscritos e a maioria deles consiste em células pleomórficas, desde redondas a poligonais, com baixo número de grânulos citoplasmáticos. O núcleo é grande, vesicular, com forma irregular e apresenta vários nucléolos. Os grânulos citoplasmáticos são inaparentes ou finos. Estão presentes células binucleadas ou multinucleadas e numerosas figuras mitóticas. As células tumorais infiltram o tecido subcutâneo e os tecidos mais profundos. A necrose e ulceração são características secundárias comuns (Ginn et al., 2007).

5.3.2. Grau histológico

Os sistemas de gradação histológica que historicamente têm sido mais frequentemente utilizados para classificar mastocitomas foram descritos por Bostock (1973) e Patnaik et al. (1984). Ambos os sistemas classificam os mastocitomas em três graus: tumores bem diferenciados, tumores intermedicamente diferenciados e os tumores mal diferenciados. Com o objetivo de diminuir variações entre observadores, foi proposto um sistema de gradação histológica de dois níveis por Kiupel et al. (2011). Este sistema de classificação diminui a variação entre observadores e proporciona 96,8% de consistência entre eles, enquanto fornece correlações fortes com a sobrevida total, mortalidade associada ao mastocitoma e risco de metástases (Kiupel et al., 2011; Takeuchi et al., 2013; Vascellari et al., 2012; Sabbatini,

Scarpa, Berlato, & Bettini, 2015; Stefanello et al., 2015). Assim sendo, o sistema de classificação de dois níveis é considerado o padrão atual na gradação de mastocitomas (Sledge et al., 2016).

Antes da descrição do sistema de dois níveis, o sistema de classificação de Patnaik era o sistema de gradação histológica mais amplamente utilizado (tabela 2) (Blackwood et al., 2012; Sledge et al., 2016). De acordo com este sistema, os mastocitomas bem diferenciados eram designados como grau I, mastocitomas intermediamente diferenciados como grau II e mastocitomas mal diferenciados como grau III (Patnaik et al., 1984).

Tabela 2 - Sistema de gradação histológica proposto por Patnaik et al.(1984)

<p>Mastocitomas de grau I (36%)</p>	<p>Encontram-se confinados à derme superficial e espaços interfoliculares e são compostos por mastócitos monomórficos, redondos e distintos com citoplasma abundante, grânulos citoplasmáticos de tamanho médio e núcleo redondo, organizados em linhas ou pequenos grupos separados por feixes de colagénio. A presença de edema e/ou necrose é mínima. A observação de figuras mitóticas é rara ou inexistente.</p>
<p>Mastocitomas de grau II (43%)</p>	<p>Encontram-se localizados na derme superficial e/ou profunda e, podem, também, infiltrar o tecido subcutâneo e o músculo esquelético adjacente, apresentam mais celularidade que os anteriores e são compostos por células frequentemente pleomórficas, com grânulos citoplasmáticos de tamanho variável consoante a célula, e núcleo denticulado com um único nucléolo. A presença de edema difuso e necrose é comum, e raramente se observam figuras de mitose (0-2 por campo de alta ampliação).</p>
<p>Mastocitomas de grau III (20%)</p>	<p>Encontram-se localizados na derme, tecido subcutâneo e músculo adjacente, são mais celulares do que os de grau I e II, e são compostos por células pleomórficas intimamente aglomeradas, com grânulos citoplasmáticos finos ou indistinguíveis e núcleo vesiculoso de forma irregular com múltiplos nucléolos. É comum observar-se células multinucleadas e bizarras bem como figuras mitóticas (3-6 por campo de alta ampliação). A presença de edema, hemorragia e necrose é comum.</p>

Apesar do sistema de gradação de Bostock utilizar critérios morfológicos semelhantes para classificar mastocitomas caninos, não utiliza a profundidade do tumor e realça com mais detalhe a morfologia celular, além de que, os graus histológicos foram aplicados em ordem inversa em relação ao sistema de Patnaik, sendo menos intuitivo (Bostock, 1973).

De acordo com a classificação de Patnaik os mastocitomas subcutâneos são classificados, provavelmente, como mastocitomas cutâneos de grau II ou III, por causa da sua localização profunda, no entanto, os mastocitomas subcutâneos apresentam maior tempo de sobrevida e menores taxas de recidiva local e metástases do que os mastocitomas cutâneos de grau II. Assim, esta classificação deveria ser substituída pela classificação de dois níveis para os

mastocitomas cutâneos, e os mastocitomas subcutâneos deveriam ser categorizados como uma entidade separada. Os mastocitomas subcutâneos não são encapsulados, mas sim infiltrativos na maioria das vezes, embora alguns sejam bem circunscritos, contudo muitos são a combinação destes dois padrões (Thompson, Pearl, et al., 2011).

Estão documentadas inconsistências na aplicação das classificações de Patnaik e Bostock (Northrup, Harmon, et al., 2005; Northrup, Howerth, et al., 2005; Kiupel et al., 2011), aumentando a variação entre observadores na classificação dos tumores e resultando, em grande parte, em diferentes avaliações do índice mitótico e na inclusão inconsistente da profundidade do tumor. Em dois estudos, relacionados entre si (Northrup, Harmon, et al., 2005; Northrup, Howerth, et al., 2005), dez patologistas da mesma instituição classificaram 60 mastocitomas cutâneos caninos de acordo com os seus próprios critérios histológicos ou de acordo com o sistema de Patnaik, e obtiveram apenas 50,3 % e 62,1% de concordância entre eles, respetivamente. Num estudo mais recente (Kiupel et al., 2011), vinte e oito patologistas classificaram 95 mastocitomas cutâneos caninos e obtiveram apenas 63,1% de concordância em mastocitomas de grau I, 63% de concordância para mastocitomas de grau II e 74,6 % de concordância para mastocitomas de grau III.

O sistema de dois níveis divide os mastocitomas cutâneos caninos em mastocitomas de alto e baixo grau (tabela 3).

Tabela 3 - Sistema de dois níveis para o diagnóstico de mastocitoma. Adaptado de Kiupel et al. (2011)

<p>Mastocitoma de alto grau</p>	<p>Presença de qualquer dos seguintes critérios:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) sete ou mais figuras mitóticas em 10 campos de alta ampliação; 2) três ou mais células multinucleadas com três ou mais núcleos em 10 campos de alta ampliação; 3) três ou mais núcleos bizarros em 10 campos de alta ampliação; 4) cariomegalia e anisocariose, definido pela variação de pelo menos duas vezes dos diâmetros nucleares de pelo menos 10% das células neoplásicas. <p>Observação: para avaliar os diferentes parâmetros devem ser escolhidos os campos com maior atividade mitótica ou com o maior grau de anisocariose.</p>
<p>Mastocitoma de baixo grau</p>	<p>Ausência de cada um dos critérios 1 a 4.</p>

A consistência entre observadores no sistema de gradação de dois níveis e a sua superioridade na previsão da mortalidade e metástases associadas ao mastocitoma, em relação ao sistema de Patnaik, foram confirmadas e documentadas por vários estudos independentes (Vascellari et al., 2012; Takeuchi et al., 2013; Sabbatini et al., 2015; Stefanello et al., 2015).

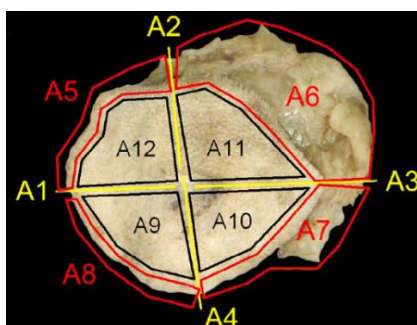
Para a avaliação citológica de PAAFs, foi proposta uma adaptação do sistema de gradação de dois níveis (Camus et al., 2016). Um alto grau foi atribuído a aspirados com células que tenham pouca granularidade ou presença de dois dos seguintes critérios: figuras mitóticas, células binucleadas ou multinucleadas, pleomorfismo nuclear ou >50% de anisocariose. Os cães portadores de tumores com alto grau citológico tinham 25 vezes mais hipóteses de morrer. No entanto, aproximadamente um terço dos mastocitomas classificados com alto grau, com base na citologia, foram identificados incorretamente quando comparados com o grau histológico (Camus et al., 2016).

5.3.3. Margens cirúrgicas

A avaliação das margens tumorais é uma parte importante da avaliação de mastocitomas cutâneos extirpados, sendo essencial para determinar a necessidade de terapia local adicional. No entanto esta avaliação, pode ser desafiante e de significado prognóstico limitado. A avaliação das margens de excisão pode ser difícil em mastocitomas agressivos ou inflamados, nos quais as células neoplásicas transpõem os limites da massa ou se misturam com a população de células inflamatórias circunjacente à massa. A dificuldade desta avaliação prende-se com a incapacidade de diferenciar com segurança mastócitos neoplásicos de mastócitos não neoplásicos. Atualmente, são assumidos como neoplásicos aglomerados de mastócitos ou “satélites” que se estendem a partir da massa primária, enquanto que mastócitos individuais bem diferenciados são considerados inflamatórios (Donnelly et al., 2013; Kiupel, 2016; Sledge et al., 2016).

Para a avaliação histológica das margens, não deve ser removido nenhum tecido da amostra da biópsia excisional e, idealmente, as margens cirúrgicas devem ser marcadas antes da submissão para exame histopatológico. O método recomendado para avaliação completa das margens (figura 3) inclui o exame de cortes histológicos representantes dos planos radiais ao longo do eixo longo e curto da amostra da biópsia excisional fixada em formol, o que permite a medição da distância livre de tumor nas margens laterais e profundas, e avaliação de cortes tangenciais das margens cirúrgicas para aferir se a excisão foi completa (Kiupel, 2016; Sledge et al., 2016).

Figura 3 – Método recomendado para avaliação das margens cirúrgicas, onde as linhas amarelas (A1-A4) representam os cortes radiais ao longo do eixo longo e eixo curto da amostra e as linhas vermelhas (A5-A8) representam os cortes tangenciais. Fonte: Sledge et al, 2016.



É, também, recomendada a classificação das margens avaliadas como margem infiltrada ou incompleta; margem próxima, com 1-2 mm; margem limpa, com 2-5 mm ou margem limpa com >5mm, segundo Kiupel, (2016). Outra classificação sugerida por Blackwood et al., (2012), define a avaliação histológica das margens como ressecção completa (sem células tumorais nas margens cirúrgicas); ressecção completa mas próxima (mastócitos presentes em 1 mm das margens cirúrgicas); ou ressecção incompleta (mastócitos presentes nas margens cirúrgicas).

Vários estudos sugerem, que a remoção cirúrgica de 2 cm de margens cutâneas e margens profundas de um plano fascial resultará na excisão completa de mastocitomas de grau I e II de Patnaik com <4 cm de diâmetro (Simpson et al., 2004; Fulcher et al., 2006). Outro estudo demonstrou que os mastocitomas de grau I e II, extirpados com pelo menos 1 cm de margens laterais e pelo menos 4 mm de margens profundas, não apresentaram recidiva, desde que as margens profundas incluíssem o músculo panicular ou a fáscia subjacente ou, na ausência destes, a camada superficial da musculatura (Schultheiss, Gardiner, Rao, Olea-Popelka, & Tuohy, 2011). Uma excisão adequada com baixa recidiva foi, também, alcançada utilizando uma abordagem modificada na ressecção de mastocitomas, aplicando margens laterais equivalentes ao diâmetro mais longo medido do tumor e um mínimo de profundidade equivalente a um plano fascial bem definido posteriormente ao tumor (Pratschke, Atherton, Sillito, & Lamm, 2013). Embora o comprimento de margens livres de tumor, que iria consistentemente prevenir recidivas, não tenha sido determinado, as recomendações para mastocitomas de alto grau incluem margens laterais de pelo menos 3 cm e margens profundas de um plano fascial (Govier, 2003; Donnelly et al., 2013). Infelizmente, o grau do mastocitoma é desconhecido no momento da extirpação cirúrgica, o que complica o planejamento cirúrgico, sugerindo a importância de inclusão, na avaliação citológica, de um sistema de gradação.

6. Prognóstico

Devido à prevalência e comportamento biológico variável dos mastocitomas caninos, ao custo da terapêutica e ao potencial stress emocional para os tutores, é importante realizar um prognóstico preciso dos mastocitomas cutâneos e selecionar corretamente a abordagem terapêutica mais apropriada (Kiupel, 2016).

Não existe nenhum fator que preveja o comportamento biológico ou a resposta ao tratamento em cães com mastocitoma (Welle et al., 2008). Os fatores clínicos que podem influenciar o resultado incluem a raça (Bostock, 1986; Miller, 1995; Baker-Gabb et al., 2003), o sexo (Gerritsen et al., 1998), a localização (Govier, 2003), a morfologia (Bostock, 1973; Mullins et al., 2006; Thamm & Vail, 2007), a presença de sinais sistêmicos paraneoplásicos (O'Keefe, 1990; Govier, 2003; Mullins et al., 2006; Thamm & Vail, 2007), o ritmo de crescimento (Bostock, 1973), o tamanho (Mullins et al., 2006) e o estadio clínico (Sfiligoi et al., 2005;

Murphy et al., 2006). No entanto, o fator de prognóstico mais importante é a gradação histológica (Thamm et al., 2006; Welle et al., 2008; Blackwood et al., 2012)

Caso seja necessário tratamento adicional, além da excisão cirúrgica do tumor, existem diversos parâmetros microscópicos e moleculares que podem ser avaliados com o objetivo de fornecer um prognóstico mais preciso e ajudar nas escolhas terapêuticas (Kiupel, 2016).

6.1. Fatores epidemiológicos

Os *Boxers* apresentam mastocitomas em idades mais jovens quando comparados com outras raças (Baker-Gabb et al., 2003), e geralmente desenvolvem mastocitomas de grau histológico baixo ou intermédio com um prognóstico mais favorável (Bostock, 1973; Bostock, 1986). Apesar dos *Shar Peis* também desenvolverem mastocitomas numa idade mais jovem (4 anos de idade em média), estes são frequentemente tumores agressivos (Miller, 1995).

Apenas um estudo reportou diferenças associadas ao sexo no prognóstico de mastocitomas caninos, tendo as fêmeas melhores resultados do que os machos após tratamento com quimioterapia (Gerritsen et al., 1998).

O estudo de Kiupel et al., (2005) reportou que cães mais velhos ou os *Boxers* tinham maior risco de recidiva em localizações distantes, e que cães machos mais velhos tinham significativamente menores tempos de sobrevivência.

6.2. Localização

Os tumores no leito ungueal (Govier, 2003), cavidade oral (Iwata et al., 2000; Govier, 2003; Elliott et al., 2016), músculo (Gieger et al., 2003) ou nas regiões inguinal, prepucial, perineal (O'Keefe, 1990; Govier, 2003; Misdorp, 2004) estão frequentemente correlacionados com um pior prognóstico do que a localização noutras partes do corpo, apesar deste facto não ser suportado por outros estudos (Cahalane et al., 2004; Sfiligoi et al., 2005). O pior prognóstico de tumores nas junções mucocutâneas e na região inguinal, pode dever-se à dificuldade da extirpação completa nestas localizações (Blackwood et al., 2012). Além disso, os tumores que envolvem as vísceras ou a medula óssea geralmente têm um mau prognóstico (O'Keefe, 1990; Iwata et al., 2000; Takahashi et al., 2000; Ozaki et al., 2002; Marconato et al., 2008). A sobrevivência de cães com mastocitomas incompletamente extirpados e tratados com radioterapia, foi melhor para tumores localizados nas extremidades do que para aqueles localizados no tronco (O'Keefe, 1990; Welle et al., 2008).

6.3. Apresentação clínica

A ulceração, eritema ou prurido local, do tumor foram associados a um pior prognóstico (Thamm et al., 1999; Mullins et al., 2006) .

Os sinais sistêmicos paraneoplásicos, como anorexia, vômitos, melena, eritema disseminado, edema ou ulceração gastrointestinal, estão associados frequentemente a formas viscerais de mastocitoma e a um pior prognóstico (O'Keefe, 1990; Govier, 2003; Mullins et al., 2006; Thamm & Vail, 2007).

Os sinais clínicos sugestivos de comportamento agressivo de um mastocitoma incluem crescimento rápido, inflamação/irritação local, infiltração local/pouca demarcação em relação aos tecidos adjacentes, ulceração, nódulos satélite, linfonodos regionais aumentados e sintomatologia paraneoplásica (Bostock, 1973; Mullins et al., 2006; Thamm & Vail, 2007).

A recidiva de mastocitomas, após excisão cirúrgica, foi associada a um pior prognóstico (Thamm et al., 1999; Smith et al., 2015). Assim sendo, a realização de uma terapêutica agressiva apropriada, no momento da primeira apresentação, em vez de no momento da recidiva, pode melhorar o prognóstico de pacientes com mastocitoma (Thamm & Vail, 2007).

Em relação aos mastocitomas subcutâneos, 90% ou mais são benignos e controlados apenas com excisão cirúrgica (Thompson, Pearl, et al., 2011). No entanto, aproximadamente 10% dos cães com mastocitoma subcutâneo irá morrer com problemas relacionados com o mastocitoma, 11% desenvolverá um mastocitoma subcutâneo secundário numa localização distante à do primário, 8% recidivará e 4% metastizará (Thompson, Pearl, et al., 2011). Não existem critérios para identificar esta pequena percentagem de mastocitomas subcutâneos agressivos, todavia os marcadores de proliferação celular, o padrão de expressão do KIT e as características histológicas podem auxiliar (Thompson, Pearl, et al., 2011; Thompson, Yager, et al., 2011)

6.4. Ritmo de crescimento e tamanho tumoral

O ritmo de crescimento dos mastocitomas (volume tumoral dividido pelo tempo de presença do tumor) é um fator prognóstico importante (Bostock, 1973). Os mastocitomas que permanecem localizados e estão presentes por longos períodos de tempo (meses ou anos) sem alterações significativas são normalmente benignos, e aqueles presentes por mais de 7 meses apresentam um prognóstico mais favorável (Bostock, 1973). Além disso, tumores de grandes dimensões podem estar associados a pior prognóstico (Mullins et al., 2006).

6.5. Estadio clínico e metastização

O mastocitomas com estadio clínico I têm melhor prognóstico do que mastocitomas com estadio clínico II (Murphy et al., 2006), e a presença de metástases no momento do diagnóstico encurta significativamente a sobrevivência (Sfiligoi et al., 2005).

O estadiamento de mastocitomas cutâneos caninos com estadio I ou II é clinicamente importante, uma vez que a diferença nos tempos de sobrevivência de animais com estes estadios foi reportada como 2,6 e 0,9 anos, respetivamente (Hayes, Adams, Smith,

Maglennon, & Murphy, 2007). O estudo de Weishaar et al., (2014), reportou uma mediana de tempo de sobrevida de 804 dias para cães com linfonodos com metástases evidentes (HN3) ou com metástases iniciais (HN2), enquanto que cães com linfonodos pré metastáticos (HN1) ou livres de metástases (HN0) apresentaram uma mediana de tempo de sobrevida de 1824 dias.

Diversos estudos sugeriram que não existem diferenças no prognóstico entre pacientes com mastocitomas solitários (estadio I) e pacientes com mastocitomas múltiplos (estadio III) do mesmo grau histológico, enquanto que cães com estadio II apresentam pior prognóstico do que cães com estadio III (Murphy et al., 2006; Mullins et al., 2006); assim, o envolvimento do linfonodo regional apresenta pior prognóstico do que a simples detecção de mastocitomas cutâneos múltiplos (Sledge et al., 2016), como já mencionado.

Os mastocitomas são sempre considerados como tumores malignos potenciais, no entanto, o verdadeiro potencial metastático é desconhecido (Thamm & Vail, 2007). Os tumores bem diferenciados têm taxas metastáticas menores do que 10%, e os tumores intermédios são considerados baixos ou moderados quanto ao seu potencial metastático (Séguin et al., 2001; Weisse et al., 2002; Thamm & Vail, 2007). Além da grande infiltração local, os tumores indiferenciados têm uma taxa metastática muito superior, variando entre 55% e 96% (Welle et al., 2008).

6.6. Grau histológico

Vários estudos mostraram diferenças significativas entre os tempos de sobrevivência de mastocitomas bem diferenciados e mal diferenciados (Bostock, 1973; Patnaik et al., 1984). No entanto, o grau histológico é de valor prognóstico limitado para tumores de diferenciação intermédia (mais do que 40% de todos os mastocitomas caninos) devido ao comportamento imprevisível destes tumores que se podem desenvolver de uma forma benigna, apresentar recidivas ou metastizar (Séguin et al., 2001; Weisse et al., 2002; Murphy, Sparkes, Smith, Blunden, & Brearley, 2004).

Os estudos de Bostock e Patnaik encontraram correlações significativas entre o grau histológico e sobrevivência animal (Bostock, 1973; Patnaik et al., 1984). Estes estudos baseiam-se em amostras populacionais relativamente grandes (114 e 83 cães, respetivamente), que incluíam cães submetidos a exérese cirúrgica do tumor e avaliação histológica do mesmo, sem metástases no momento do diagnóstico e que foram seguidos por longos períodos após o diagnóstico inicial (910 dias e 1500, respetivamente). No estudo de Patnaik, quase todos os cães (93%) com mastocitomas bem diferenciados (grau I de Patnaik) sobreviveram durante o período de estudo de 1500 dias. Enquanto que apenas 77% dos cães com mastocitomas bem diferenciados (grau III de Bostock) sobreviveram mais do que 210 dias no estudo de Bostock. Em ambos os estudos, os cães com mastocitomas mal

diferenciados (grau I de Bostock e III de Patnaik) tiveram um mau prognóstico, com apenas 13% e 6% dos cães a sobreviver mais de 210 ou mais de 1500 dias, respetivamente (Bostock, 1973; Patnaik et al., 1984).

As críticas aos estudos de Patnaik e Bostock incluem a falta de medidas prognósticas para além do tempo de sobrevida total e a falta de análise multivariada da sobrevivência. Nenhum dos estudos reportou o intervalo livre de doença, o tempo até progressão ou a causa da morte (se complicações relacionadas com o mastocitoma ou outras razões para a mesma). Devido à falta de análise multivariada, os efeitos potenciais de variáveis incluindo, mas não limitado a, idade do animal no momento do diagnóstico, raça e tratamento não foram avaliados.

Com base no estudo que estabeleceu o sistema de dois níveis, aproximadamente 90% dos tumores são de baixo grau. A mediana de tempo de sobrevida é inferior a 4 meses para mastocitomas de alto grau, mas superior a 2 anos para mastocitomas de baixo grau. Um total de 90% dos cães com mastocitomas de alto grau morreu devido a doença associada ao mastocitoma e 70% desenvolveu metástases, enquanto apenas 5% dos cães com mastocitoma de baixo grau morreu devido a doença associada ao mastocitoma, mas 20% desenvolveu mastocitomas adicionais (Kiupel et al., 2011).

O sistema de dois níveis é também superior na identificação dos cães que necessitarão de terapêutica adicional para além da excisão cirúrgica. A maior percentagem de mastocitomas de baixo grau que desenvolvem metástases observada entre estudos é de 15% no momento do diagnóstico (Stefanello et al., 2015). No entanto, 86% desses cães apenas tinha infiltração de mastócitos nos linfonodos locais (Stefanello et al., 2015). Os autores concluem que qualquer sistema de gradação histológica deve ser acompanhado de estadiamento clínico e avaliação prognóstica adicional.

6.7. Margens cirúrgicas

A eficácia da extirpação de um mastocitoma foi sugerida como sendo mais correlacionada com o grau histológico e indicadores de proliferação do que com excisão completa com margens limpas. No geral, as margens cirúrgicas limpas não estão associados a recidivas de mastocitomas de baixo grau (Scarpa et al., 2012). Nos estudos de Séguin et al., (2001), Weisse et al., (2002) e Smith et al., (2015), a taxa de recidiva local variou entre 3-11% após excisão completa de tumores de grau II, segundo a classificação de Patnaik, e o tempo até recidiva destes tumores variou entre 2-24 meses. Comparativamente, a taxa de recidiva local após excisão incompleta de tumores de grau II, segundo a classificação de Patnaik, foi cerca de 6-23% (Murphy et al., 2004; Séguin et al., 2006; Smith et al., 2015). No entanto, a maioria (85-90%) dos mastocitomas de grau I, segundo a classificação de Patnaik, com margens incompletas, não recidivou (Murphy et al., 2004). Os mastocitomas de grau II de Patnaik com baixos indicadores de proliferação, determinados pela pontuação AgNOR e índice Ki-67,

mesmo com margens cirúrgicas incompletas, raramente recidivam; além disso, os tempos de sobrevivência destes mastocitomas não diferem quer haja excisão completa ou incompleta (Séguin et al., 2006; Smith et al., 2015). Cerca de 40 % de mastocitomas de alto grau ou grau III de Patnaik apresentam recidiva local independentemente da excisão com margens amplas (Donnelly et al., 2013). No entanto, a taxa de recidiva em casos com margens incompletas é superior, comparativamente a casos com margens limpas (Murphy et al., 2004).

6.8. Proliferação celular

Vários marcadores de proliferação celular têm sido associados ao tempo de sobrevivência, à ocorrência de metástases e ao intervalo livre de doença, em cães com mastocitoma cutâneo (Bostock et al., 1989; Simoes et al., 1994; Scase et al., 2006; Webster et al., 2007; Maglennon et al., 2008; Vascellari et al., 2012).

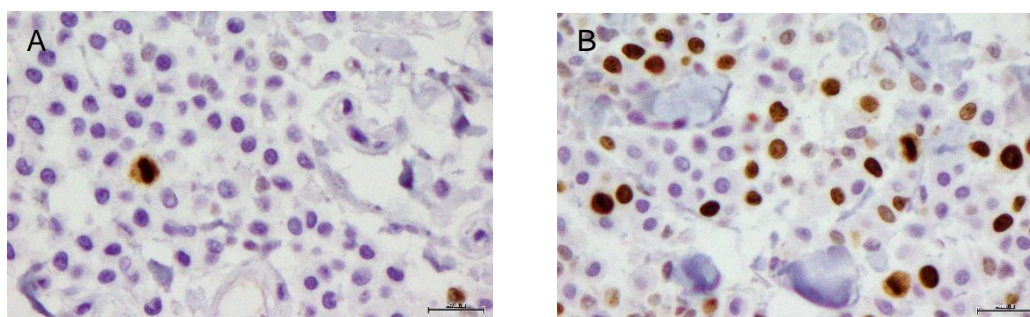
A proliferação celular é o reflexo do número de células em ciclo celular (fração em crescimento) e a taxa a que cada célula progride através do ciclo celular (taxa de proliferação). Nenhum marcador por si só avalia simultaneamente a fração em crescimento e a taxa de proliferação, assim, uma apreciação completa da proliferação celular requer a avaliação de múltiplos indicadores de proliferação celular. Os métodos de avaliação de marcadores de proliferação específicos variam de acordo com os estudos, incluindo diferenças no método de contagem, diferenças no número de campos ou área total do tumor examinada, diferenças na região da lâmina examinada, diferenças no tamanho do campo de observação entre microscópios e diferenças nas técnicas de coloração e imunohistoquímica (Kiupel, 2016; Sledge et al., 2016).

O índice mitótico é o marcador de proliferação celular mais amplamente utilizado e é um critério importante para a gradação histológica, no entanto, não reflete a fração em crescimento total. Sendo um indicador de fase, as mitoses apenas distinguem as células na fase M do ciclo celular (Sledge et al., 2016). O índice mitótico representa o número de mitoses por 10 campos de alta ampliação, determinado por histopatologia (Blackwood et al., 2012). A avaliação independente do índice mitótico pode levar à sobrestimação ou subestimação da fração em crescimento total. Apesar de não refletir a fração em crescimento total, o índice mitótico é de valor inquestionável no que toca ao prognóstico, especialmente por não necessitar de nenhuma metodologia adicional para ser avaliado além do exame das lâminas coradas com hematoxilina e eosina. Os limites (cut-offs) prognósticos para a contagem mitótica variam entre estudos, no entanto, um índice mitótico elevado tem sido consistentemente sugerido como um indicador de mau prognóstico (Romansik, Reilly, Kass, Moore, & London, 2007; Elston, Sueiro, Cavalcanti, & Metze, 2009; Kiupel et al., 2011). No estudo de Romansik et al, (2007), a mediana de sobrevida para cães com um tumor com índice mitótico igual ou inferior a 5 foi de 70 meses, comparada com os 2 meses quando o

índice mitótico era superior a 5, independentemente do grau histológico. Um estudo diferente (Elston et al., 2009) adotou um cut-off de 7 para o índice mitótico, e observou que a mediana de sobrevivência para cães com um tumor com índice mitótico igual ou inferior a 7 era de 18 meses, comparada com 3 meses quando o índice mitótico era superior a 7, chegando à mesma conclusão de que índices mitóticos elevados têm menores tempos de sobrevivência. O cut-off de índice mitótico superior a 7 foi posteriormente adotado pelo sistema de gradação histológica de dois níveis (Kiupel et al., 2011).

Em oposição ao indicador de fase, um indicador da fração em crescimento, como o Ki-67, identifica células em todas as fases do ciclo celular, no entanto, não sugere a taxa a que cada célula progride através do ciclo celular (Sledge et al., 2016). O Ki-67 é uma proteína expressa durante todas as fases do ciclo celular que pode ser detectada por imunohistoquímica (figura 4) (Blackwood et al., 2012).

Figura 4 – Diferentes índices de Ki-67. A) Índice Ki-67 baixo; B) Índice Ki-67 alto. Escala 25 µm. Original da autora.



Os mastocitomas de baixo grau com um índice Ki-67 baixo raramente recidivam independentemente das margens cirúrgicas, enquanto que mastocitomas com um índice Ki-67 alto apresentam menores tempos de sobrevivência, aumento de recidiva local e metástases, independentemente do grau histológico (Webster et al., 2007; Scase et al., 2006; Maglennon et al., 2008; Sledge et al., 2016). Um estudo mais recente (Vascellari et al., 2012), comparou o índice Ki-67 em mastocitomas cutâneos classificados por ambos os sistemas de gradação histológica de três e dois níveis. De acordo com o sistema de Patnaik, o valor mediano do índice Ki-67 foi 2.5, 6.0 e 20.6 para os mastocitomas de grau I, grau II e grau III, respectivamente. De acordo com o sistema de dois níveis, o índice Ki-67 foi significativamente menor em mastocitomas de baixo grau do que em mastocitomas de alto grau, existindo neste sistema uma maior associação entre o índice Ki-67 e o grau histológico. Um índice Ki-67 alto foi significativamente associado a uma alta incidência de mortalidade relacionada com o mastocitoma (Vascellari et al., 2012).

Um indicador da taxa de proliferação, como a pontuação AgNOR, reflete a taxa relativa a que cada célula está a progredir através do ciclo celular (Sledge et al., 2016). As regiões organizadoras nucleolares (NORs) são segmentos de ADN seletivamente marcados pela

prata (Ag) e, por este motivo, denominadas AgNORs. O número médio de AgNOR por núcleo é correlacionado com a velocidade de proliferação celular (Blackwood et al., 2012).

Os mastocitomas com um número baixo de AgNOR, por núcleo, têm um comportamento biológico menos agressivo, enquanto que valores elevados de AgNOR por núcleo estão associados a um pior prognóstico, com aumento da mortalidade, recidiva local e metástases (Bostock et al., 1989; Simoes et al., 1994; Scase et al., 2006; Webster et al., 2007; Sledge et al., 2016). No entanto, a pontuação AgNOR não é independente do grau histológico, e, como tal, não oferece informação adicional significativa (Scase et al., 2006).

A avaliação simultânea do indicador da fração em crescimento e do indicador da taxa de proliferação, realizada pela avaliação do produto do índice Ki-67 e da pontuação AgNOR (pontuação AgNOR x Ki-67), oferece a melhor análise da proliferação celular total de um tumor (Sledge et al., 2016). A pontuação AgNOR x Ki-67 representa o marcador de proliferação celular com melhor associação ao prognóstico, devido à sua combinação de medição da fração em crescimento e da taxa de proliferação (Webster et al., 2007; Smith et al., 2015). Uma pontuação AgNOR x Ki-67 superior a 54 foi associada a um risco superior de mortalidade relacionada com o mastocitoma e desenvolvimento de metástases (Webster et al., 2007). Os mastocitomas de baixo grau com um índice de proliferação baixo, determinado por um indicador Ki-67 baixo e uma pontuação AgNOR baixa, raramente recidivam, mesmo com margens cirúrgicas incompletas (Séguin et al., 2006; Smith et al., 2015). Assim sendo, a pontuação AgNOR x Ki-67 deveria ser avaliada por rotina em mastocitomas cutâneos de baixo grau para identificar aqueles com mais probabilidade de exibir um comportamento biológico mais agressivo do que a gradação histológica isolada sugeriria e é especialmente importante para a avaliação de mastocitomas de baixo grau com margens cirúrgicas incompletas (Sledge et al., 2016).

O antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA), é uma proteína auxiliar das polimerases de ADN, envolvida também em funções de reparação, mas utilizada como marcador de proliferação, detetado imunohistoquimicamente (Blackwood et al., 2012). Tal como o índice mitótico, o PCNA é um indicador de fase (Kiupel, 2016). A expressão do PCNA está significativamente aumentada em tumores recorrentes comparando com os não recorrentes e em tumores metastáticos comparando com tumores não metastáticos (Simoes et al., 1994; Blackwood et al., 2012). No entanto, não é independente do grau histológico e não tem valor de predição no tempo de sobrevivência (Simoes et al., 1994; Scase et al., 2006).

Apenas o índice Ki-67, a pontuação AgNOR x Ki-67 e o índice mitótico são avaliados rotineiramente para a avaliação prognóstica de mastocitomas cutâneos e subcutâneos (Webster et al., 2007; Thompson, Yager, et al., 2011; Smith et al., 2015)

6.9. Mutações do *c-kit* e padrão de expressão do KIT

O proto-oncogene *c-kit* codifica o recetor tirosina quinase KIT, que desempenha um papel central na sobrevivência, proliferação, diferenciação e migração do mastócito. As mutações no *c-kit* e alterações da expressão do KIT são conhecidas como indicadores de prognóstico negativo em mastocitomas cutâneos caninos (Zemke et al., 2002; Webster, Yuzbasiyan-Gurkan et al, 2006; Takeuchi et al., 2013). Além disso, os mastocitomas com mutações no *c-kit* ou padrões de expressão anormais do KIT são potenciais candidatos à terapêutica alvo com inibidores dos recetores tirosina quinase (IRTQ) (Kiupel, 2016). Estas mutações podem ser identificadas através de Polymerase Chain Reaction (PCR) e auxiliarão na previsão de recidivas e de ocorrência de metástases (Zemke et al., 2002; Webster, Yuzbasiyan-Gurkan et al, 2006).

As duplicações internas em *tandem* no exão 11 são as mutações mais comuns do *c-kit* e ocorrem em 10% a 46 % dos mastocitomas cutâneos caninos (London et al., 1999; Zemke et al., 2002; Downing et al., 2002; Webster, Yuzbasiyan-Gurkan et al, 2006; Letard et al., 2008). Estas mutações são mais frequentemente observadas em mastocitomas de alto grau e estão associadas à diminuição dos tempos de sobrevivência e do intervalo livre de doença e ao risco acrescido de recidiva local, metástases e mortalidade relacionada com o mastocitoma (Downing et al., 2002; Zemke et al., 2002; Webster, Yuzbasiyan-Gurkan et al, 2006; Takeuchi et al., 2013). No entanto, num estudo recente (Kiupel, 2016), apenas 34% dos mastocitomas cutâneos caninos com duplicações internas em *tandem* no exão 11 eram tumores de alto grau.

Estão, também, descritas duplicações internas em *tandem* nos exões 8 e 9 do *c-kit* em menos de 5% dos mastocitomas cutâneos (Letard et al., 2008). No estudo de Kiupel, (2016), apenas 9% dos mastocitomas cutâneos caninos com duplicações internas em *tandem* no exão 8 eram tumores de alto grau.

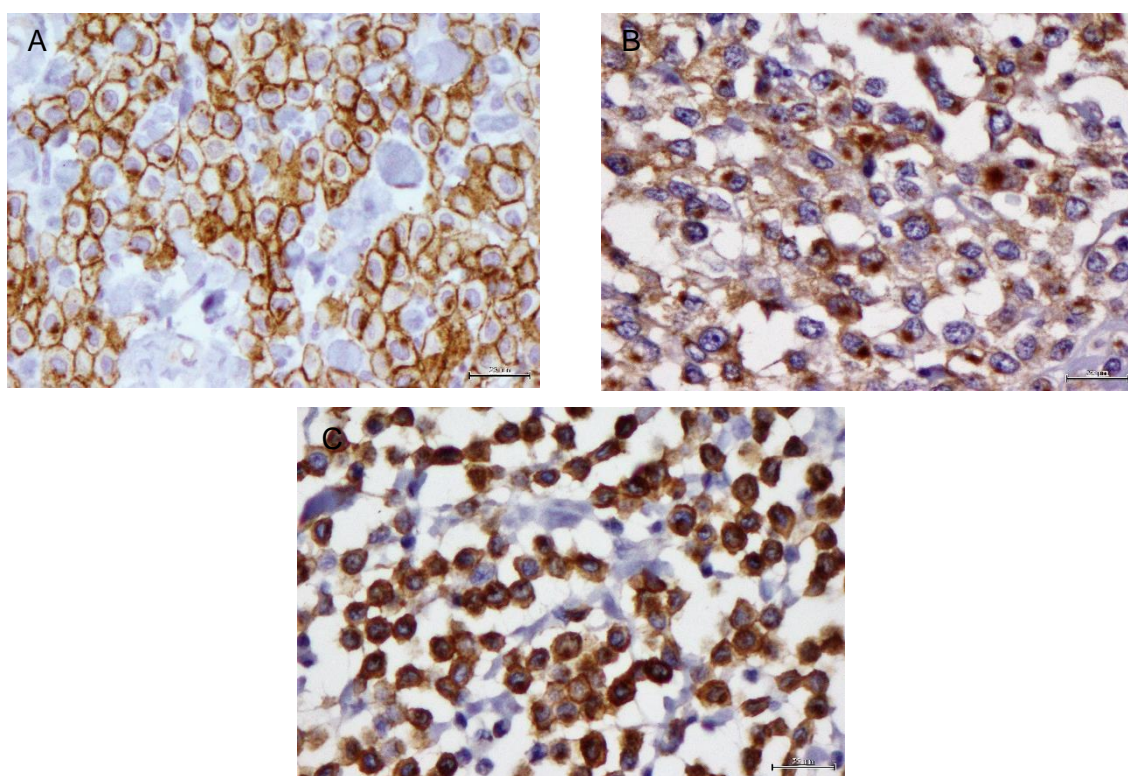
Ainda no estudo de Kiupel, (2016), cerca de 39% dos cães com mastocitomas cutâneos e duplicações internas em *tandem* no exão 11 morreram em menos de 1 ano devido a doença associada ao mastocitoma. Por outro lado, apenas 13% dos cães com mastocitomas cutâneos e duplicações internas em *tandem* no exão 8, morreram menos de 1 ano devido a doença associada ao mastocitoma.

Os cães com mastocitomas, com duplicações internas em *tandem* no exão 11 do *c-kit*, respondem ao tratamento com IRTQ, como o toceranib e masitinib (London et al., 2009). Os cães com mastocitomas com qualquer outra mutação no *c-kit* provavelmente responderão à terapêutica com IRTQ (Sledge et al., 2016).

Os padrões aberrantes de expressão do KIT foram, igualmente, associados a um prognóstico negativo (Kiupel et al., 2004; Da Costa et al., 2007; Webster et al., 2007). Os três padrões de expressão imunohistoquimicamente distintos (figura 5) em mastocitomas cutâneos caninos,

descritos são: 1) o padrão 1 consiste na marcação peri-membranosa em mais de 90% das células neoplásicas; o padrão 2 é definido por marcação citoplasmática em pontilhado ou perinuclear focal, com perda da marcação membranar, em mais de 10% das células neoplásicas; por fim, o padrão 3 é definido por marcação citoplasmática difusa em mais de 10% das células neoplásicas (Kiupel et al., 2004). Os mastocitomas com padrões 2 e 3 de expressão do KIT, que representam localizações anormais da proteína KIT, estão associados à diminuição do tempo de sobrevivência e aumento da incidência de recidivas locais em comparação com os mastocitomas com padrão 1 de expressão (Kiupel et al., 2004).

Figura 5 – Diferentes padrões de expressão do KIT. A) Padrão de expressão 1 membranar; B) Padrão de expressão 2 citoplasmático focal ou pontilhado; 3) Padrão de expressão 3 citoplasmático difuso. Escala 25 µm. Original da autora.



Nos mastocitomas, as mutações no *c-kit* estão relacionadas com localizações anormais da proteína KIT; no entanto, nem todos os mastocitomas com localizações anormais do KIT têm mutações ativas no *c-kit* (Webster, Yuzbasiyan-Gurkan et al, 2006), implicando outros meios na ativação do recetor KIT (Weishaar et al., 2018). Assim sendo, é possível que o padrão de expressão do KIT forneça informações mais precisas sobre o estado de ativação do recetor, e, conseqüentemente, sobre a sensibilidade do tratamento com IRTQ, do que apenas o PCR para a mutação do *c-kit* (Weishaar et al., 2018).

No estudo de Da Costa et al., (2007), o aumento de marcação citoplasmática, em vez de membranar, do KIT foi relacionado com mastocitomas de alto grau, no entanto, não foram encontradas diferenças em mastocitomas com marcação local ou difusa.

A maioria dos mastocitomas subcutâneos não apresentam duplicações internas em *tandem* no exão 11; porém os padrões de expressão do KIT foram associados à recidiva local e metástases nestes mastocitomas. Os cães com mastocitomas subcutâneos e padrões 2 ou 3 de expressão têm um risco superior de recidiva local (88%) e de desenvolvimento de metástases (92%) (Thompson, Yager, et al., 2011).

6.10. Ploidia, oncogenes e genes supressores

6.10.1. Ploidia do ADN

O termo ploidia refere-se à quantidade de ADN presente numa célula. As quantidades anormais de ADN (aneuploidia), devido a erros de duplicação durante a mitose, estão relacionadas com pior prognóstico em tumores caninos e felinos (Strefezzi et al., 2009). No estudo de Ayl et al., (1992), a maioria dos mastocitomas avaliados eram diploides. Neste estudo, não foram encontradas diferenças significativas entre o tempo de sobrevivência de animais com tumores aneuploides ou diploides; porém foi detetada uma tendência para menores tempos de sobrevivência no primeiro ano, em animais com mastocitomas aneuploides (Ayl et al., 1992).

6.10.2. Oncogene Mdm2

Os oncogenes, genes envolvidos na transformação neoplásica, são derivados de proto-oncogenes, que regulam o crescimento e diferenciação celular normal. Vários produtos de oncogenes, as oncoproteínas, entre elas o KIT e a Mdm2, são ativadas ou sobreexpressadas nos mastocitomas (Strefezzi et al., 2009).

A proteína Mdm2 regula negativamente a ação da p53, catalisando a sua degradação e exclusão do núcleo. Isto permite uma diminuição da atividade da p53, mesmo na ausência de mutação genética da mesma (Nasir, Rutteman, Reid, Schulze, & Argyle, 2001; Strefezzi et al., 2009). Num estudo realizado em mastocitomas caninos, a proteína Mdm2 não foi detetada em mastócitos normais e a sua expressão foi comum nos mastocitomas, aumentando o número de células positivas com o grau histológico, no entanto, nem todos os tumores de grau III de Patnaik apresentaram esta alteração (Wu, Hayashi, & Inoue, 2006).

6.10.3. Gene supressor tumoral p53

Entre os genes supressores tumorais, responsáveis pela inibição do crescimento e diferenciação celular, o gene p53 é o mais frequentemente investigado. O produto deste gene, o fator de transcrição nuclear p53, tem como função garantir a fidelidade genómica através da reparação do ADN danificado ou da indução de apoptose quando estes danos são irreparáveis (Ginn et al., 2000; Jaffe et al., 2000; Nasir et al., 2001). As mutações no gene p53

foram consideradas as alterações mais comuns nas neoplasias do Homem, conduzindo à diminuição do seu produto (Ginn et al., 2000; Jaffe et al., 2000; Nasir et al., 2001). A correlação entre a expressão de p53 e o grau histológico, a taxa de recidiva e o tempo de sobrevivência nos mastocitomas caninos foram analisadas, no entanto, apesar do seu grande valor nas neoplasias do Homem, os resultados não foram similares nos cães (Ginn et al., 2000; Jaffe et al., 2000; Wu et al., 2006). Todavia, a função da p53 pode estar comprometida devido a vários mecanismos não-mutacionais como a exclusão do núcleo, a formação de complexos com proteínas virais e a superexpressão do proto-oncogene Mdm2, discutido anteriormente (Nasir et al., 2001; Strefezzi et al., 2009).

7. Tratamento

As opções de tratamento para o mastocitoma canino dependem das características clínicas, do estadiamento clínico e do grau histológico. No processo de escolha da melhor abordagem terapêutica deve ter-se em consideração se é possível a excisão cirúrgica do tumor e se a terapêutica local é suficiente ou se é necessária terapêutica farmacológica sistêmica (Blackwood et al., 2012). As opções de tratamento para mastocitomas incluem cirurgia, radioterapia, quimioterapia ou uma combinação destas modalidades (O'Keefe, 1990; Gieger et al., 2005).

7.1. Cirurgia

O tratamento de escolha para mastocitomas caninos localizados e não metastáticos, é a cirurgia (Macy, 1985; Weisse et al., 2002; Govier, 2003; Thamm & Vail, 2007). A primeira tentativa cirúrgica é a que apresenta os melhores resultados (Morris & Dobson, 2008). A administração perioperatória de antagonistas dos recetores H1 e H2 é recomendada com o intuito de diminuir o risco de efeitos locais e sistêmicos decorrentes da desgranulação dos mastócitos em resposta à manipulação cirúrgica do tumor (Thamm & Vail, 2007). O comprimento das margens cirúrgicas foi discutido anteriormente a propósito da sua avaliação histológica.

Em geral, cães com mastocitomas tratados com cirurgia têm excelentes resultados. Num estudo, 55 cães com mastocitomas de grau II de Patnaik tratados somente com cirurgia, com cerca de 90% dos tumores com margens cirúrgicas completas, foram acompanhados durante 540 dias e apenas 5% dos cães apresentou recidiva local, 5% desenvolveu metástases, 11% desenvolveram mastocitomas cutâneos adicionais e apenas 3 cães morreram com doença associada ao mastocitoma (Séguin et al., 2001).

A localização tumoral pode influenciar a viabilidade de uma excisão local ampla, tendo os membros, a face e as áreas com pouca pele menor viabilidade e, por vezes, necessidade de cirurgia reconstrutiva após excisão (O'Keefe, 1990; Al-sarraf, Mauldin, Patnaik, & Meleo, 1996;

Blackwood et al., 2012). Com o objetivo de reduzir o tamanho tumoral e torná-lo mais apto para a ressecção cirúrgica pode ser utilizada a quimioterapia neoadjuvante (Dobson et al., 2004; Stanclift & Gilson, 2008; Kiupel, 2016). Quando a excisão cirúrgica completa do tumor é impossível, é preferível realizar uma ressecção conservativa seguida de radioterapia adjuvante, do que um procedimento cirúrgico radical (Al-sarraf et al., 1996; LaDue, Price, Dodge, Page, & Thrall, 1998; Dobson et al., 2004; Poirier et al., 2006; Thamm & Vail, 2007; Welle et al., 2008). Se possível, deve ser considerada a opção de uma segunda cirurgia com margens mais largas no local da cicatriz cirúrgica, o que pode resultar numa excisão completa (Gieger et al., 2005; Thamm & Vail, 2007; Blackwood et al., 2012). A quimioterapia foi, igualmente, sugerida como uma alternativa à radioterapia para mastocitomas cutâneos caninos incompletamente excisados (Thamm et al., 1999; Thamm et al., 2006). Nos casos de mastocitomas múltiplos, todos os tumores passíveis de ressecção cirúrgica devem ser excisados. (Blackwood et al., 2012).

7.1. Radioterapia

A radioterapia é mais frequentemente utilizada como terapia adjuvante pós-cirúrgica após excisão incompleta de um mastocitoma (Dobson & Scase, 2007; Blackwood et al., 2012). No entanto, também pode ser utilizada no tratamento de metástases em linfonodos locais ou regionais (O'Keefe, 1990; Blackwood et al., 2012; Kiupel, 2016).

A radioterapia adjuvante pós-cirúrgica resultou em intervalos livres de doença de 1 ano em 81-94% dos casos e de 2 anos em 67-86% dos casos de mastocitomas de grau intermédio (Al-sarraf et al., 1996; Poirier et al., 2006). Foram, igualmente, reportados intervalos livres de doença de 40 meses em cães com mastocitomas com metástases no linfonodo regional tratados com cirurgia, radioterapia e prednisona (Chaffin & Thrall, 2002). No estudo de Dobson et al., (2004), cães com mastocitomas não extirpáveis tratados apenas com prednisolona e radioterapia, tiveram uma taxa de resposta de 89% e intervalos livres de doença de 1 e 2 anos em 60 e 52% dos casos, respetivamente.

Com o intuito de reduzir a gravidade da desgranulação mastocitária induzida pela radioterapia e os seus efeitos adversos, é frequentemente prescrita uma terapêutica com prednisolona antes, durante e várias semanas após o tratamento de radioterapia. Os antagonistas dos recetores H1 e H2 são igualmente administrados para minimizar os efeitos sistémicos da desgranulação dos mastócitos (Gieger et al., 2005; Dobson & Scase, 2007; Blackwood et al., 2012).

7.2. Quimioterapia

A quimioterapia pode ser utilizada em cães em várias circunstâncias: primeiro, no tratamento e na prevenção da disseminação de metástases em tumores de alto grau; segundo, como

terapêutica neoadjuvante antes da realização de cirurgia ou radioterapia, para reduzir o volume do tumor e aumentar a possibilidade de excisão completa ou para tornar a radioterapia mais fácil e segura; por último, para o tratamento de doença residual quando não é possível a realização de cirurgia adicional ou a radioterapia não está disponível (Blackwood et al., 2012; Kiupel, 2016).

O tratamento sistêmico com fármacos antineoplásicos é mais apropriado em tumores de alto risco de desenvolvimento de metástases, como tumores de grau III (Patnaik) e tumores de grau II (Patnaik) com fatores de risco associados a menores tempos de sobrevivência e desenvolvimento de metástases, como, por exemplo, índices de proliferação celular elevados (Gieger et al., 2005; Dobson & Scase, 2007; Blackwood et al., 2012).

7.2.1. Protocolos clássicos

O tratamento quimioterápico de primeira linha consiste, normalmente, na administração de vimblastina e prednisolona, tendo uma taxa de resposta de cerca de 47% (Thamm et al., 1999; Thamm et al., 2006), e o de segunda linha, na administração de lomustina, com taxa de resposta de cerca de 42% (Rassnick et al., 1999). No entanto, são também utilizados protocolos nos quais se administra alternadamente vimblastina e lomustina sem prednisolona, com taxa de resposta de cerca de 57% (Cooper, Tsai, & Bennett, 2009) ou com prednisolona, com taxa de resposta de cerca de 65 % (Rassnick, Bailey, et al., 2010; Blackwood et al., 2012; Kiupel, 2016).

No estudo de Thamm et al., (2006), 61 cães com tumores de grau II ou III (Patnaik) com risco elevado de desenvolvimento de metástases foram tratados com prednisona e vimblastina, após excisão cirúrgica. Cerca de 65% dos pacientes estavam vivos 3 anos depois, com um intervalo livre de doença de 1305 dias (Thamm et al., 2006). Já, noutros estudos, dos pacientes com tumores de grau III (Patnaik) tratados apenas com cirurgia, apenas 6, 13 e 36% sobreviveram por períodos de 4 anos, 7 meses e 2 anos, respetivamente (Bostock, 1973; Patnaik et al., 1984; Murphy et al., 2004).

Em relação ao uso de outros compostos quimioterápicos no tratamento de mastocitoma canino, foi reportada uma taxa de resposta de 64%, após administração da associação vimblastina, ciclofosfamida e prednisolona, resultando numa mediana de duração de resposta de 141 dias e toxicidade baixa (Camps-Palau et al., 2007). A administração de clorambucil associado a prednisolona resultou numa resposta mensurável em 38% dos casos (Taylor, Gear, Hoather, & Dobson, 2009). A administração unicamente de hidroxiureia resultou numa resposta mensurável em 28% dos casos, com uma mediana de sobrevida de 67 dias (Rassnick, Al-Sarraf, et al., 2010). A prednisolona é ativa contra mastocitomas caninos, no entanto, quando administrada individualmente tem uma baixa taxa de resposta (20%) (Mccaw et al., 1994).

Apesar da eficácia reportada, a resposta dos mastocitomas à quimioterapia é variável, com uma mediana de tempo até progressão da doença de 77 dias, no caso da lomustina (Rassnick et al., 1999), e de 489 dias, no caso da associação de vimblastina, lomustina e prednisolona (Rassnick, Bailey, et al., 2010). Assim, tornou-se necessário o desenvolvimento de novos compostos anti-tumorais, para um melhor controlo de mastocitomas não extirpáveis, recorrentes e metastáticos (Grant, North, & Lanore, 2016).

Além de ter em atenção a taxa e duração da resposta dos mastocitomas à quimioterapia, a escolha do fármaco quimioterápico a utilizar deve ter em conta o seu potencial de toxicidade (Blackwood et al., 2012) (Kiupel, 2016).

7.2.2. Inibidores dos recetores tirosina quinase

Os inibidores da tirosina quinase são capazes de bloquear a atividade dos recetores através da inibição competitiva da ligação de ATP e consequente fosforilação, das quais depende a ativação do recetor (Liao et al., 2002; Blackwood et al., 2012).

A Agência Europeia de Medicamentos (EMA) aprovou, com indicação terapêutica para os mastocitomas caninos, dois IRTQ (o fosfato de toceranib (Palladia®) e o masitinib (Masivet®)), ambos desenvolvidos tendo como alvo o KIT (Pryer et al., 2003; Dubreuil et al., 2009). Nas características do produto, na página da web da EMA, o Palladia® está indicado no tratamento de mastocitomas cutâneos caninos de grau II ou III de Patnaik não extirpáveis e recorrentes (EMA, 2017), e o Masivet® está indicado no tratamento de mastocitomas de grau II ou III de Patnaik não extirpáveis, com mutação confirmada no *c-kit* (EMA, 2013).

Ambos os fármacos demonstraram eficácia como compostos únicos em ensaios clínicos (London et al., 2009; Hahn et al., 2008; Hahn et al., 2010).

A eficácia do toceranib foi demonstrada em cães com mastocitomas cutâneos de grau II ou III (Patnaik) recorrentes, com ou sem envolvimento do linfonodo. O tratamento com toceranib melhorou significativamente a taxa de resposta objetiva, comparado com o placebo. A presença de mutação no *c-kit* e a ausência de metástases no linfonodo regional, mas não o grau histológico, foram significativamente associados a uma resposta objetiva superior. Os cães com tumores de grau II (Patnaik) e cães sem metástases nos linfonodos regionais tiveram um tempo para progressão tumoral superior, não sendo o estado mutacional do *c-kit* associado ao tempo para progressão tumoral. A taxa de resposta foi de 43%, incluindo respostas completas e parciais (London et al., 2009).

A eficácia do masitinib foi estudada em cães com mastocitomas de grau II não extirpáveis ou recorrentes ou mastocitomas de grau III (Patnaik) sem metástases nodais ou viscerais, tratados previamente ou não. O tratamento com masitinib comparado com o placebo prolongou significativamente o tempo para progressão tumoral (mediana de 118 dias) em todos os cães, independentemente da presença de mutação no *c-kit*, sendo este efeito mais

pronunciado em cães a receber masitinib como primeira linha de tratamento. Na avaliação aos 6 meses não existiram diferenças significativas no tempo de sobrevivência entre o masitinib e o placebo (Hahn et al., 2008). Num estudo adicional, Hahn et al., (2010) demonstraram que a utilização de masitinib no tratamento de mastocitomas não extirpáveis aumentou as taxas de sobrevivência aos 12 e 24 meses, em comparação com o placebo, independentemente do estado de mutação do *c-kit*. Noutro estudo (Smrkovski, Essick, Rohrbach, & Legendre, 2013) foi reportada uma taxa de resposta de 50%, uma mediana de tempo até progressão de 453 dias e uma mediana de tempo de sobrevivência de 630 dias em cães com mastocitomas não extirpáveis e metastáticos tratados com masitinib (os tempos indicados são relativos aos animais que responderam ao tratamento). Neste estudo, o padrão de expressão do KIT ou a presença de mutação no *c-kit* não foram avaliados (Smrkovski et al., 2013). Um estudo retrospectivo mais recente (Grant et al., 2016) reportou uma taxa de resposta de 82%, uma mediana de tempo até progressão de 88 dias e uma mediana de tempo de sobrevivência de 155 dias, em cães com mastocitoma tratados com masitinib (os tempos indicados são relativos aos animais que responderam ao tratamento). Neste estudo, o padrão de expressão do KIT ou a presença de mutação no *c-kit*, também, não foram avaliados (Grant et al., 2016).

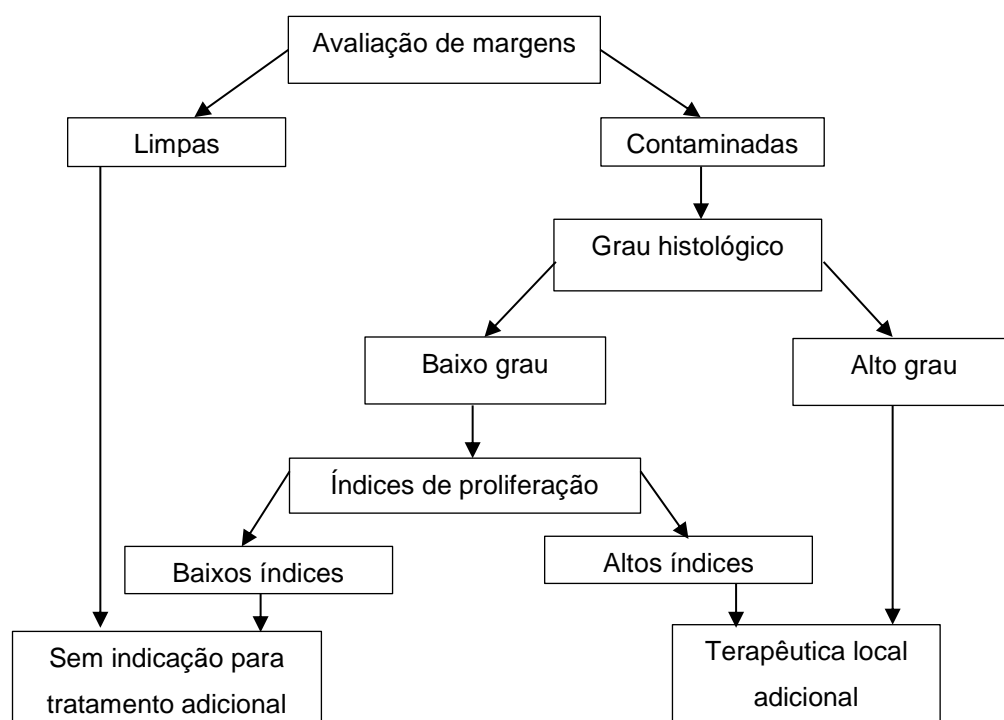
A apresentação para administração oral destes fármacos torna a sua administração mais fácil, no entanto, os pacientes em tratamento com IRTQ devem ser monitorizados regularmente, como em qualquer terapêutica citotóxica, pois ambos os medicamentos apresentam efeitos secundários, descritos no resumo das características dos medicamentos.

Estudos recentes e investigações em progresso estão a avaliar a combinação de fosfato de toceranib com quimioterapia convencional (Robat et al., 2011) e a comparar a eficácia de tratamento com outros quimioterápicos e fosfato de toceranib (Weishaar et al., 2018). Em cães com mastocitoma tratados com a combinação de fosfato de toceranib com vimblastina, a taxa de resposta objetiva foi de 71% (Robat et al., 2011). Em cães com mastocitoma macroscópico não foram encontradas diferenças significativas no intervalo livre de progressão, tempo de sobrevivência, resposta completa, taxa de resposta objetiva ou benefício clínico entre o tratamento com vimblastina e o tratamento com toceranib (Weishaar et al., 2018). No entanto, os cães do grupo de tratamento com toceranib apresentaram maior número de reações adversas (Weishaar et al., 2018). Neste estudo concluiu-se, ainda, que a utilização individual do perfil do padrão de expressão do KIT e do estado de mutação no *c-kit* não é suficiente para tomar decisões de tratamento entre vimblastina e toceranib; no entanto, a utilização destes testes é preditiva da resposta ao tratamento em cães com mastocitoma tratados com toceranib (Weishaar et al., 2018).

7.3. Tratamento com base nos fatores de prognóstico

As considerações para a inclusão de terapêutica local adicional no local de excisão de um mastocitoma cutâneo devem ser feitas com base na avaliação das margens cirúrgicas, na gradação histológica utilizando o sistema de dois níveis e na avaliação dos índices de proliferação, incluindo o índice Ki-67, pontuação AgNOR e pontuação AgNOR x Ki-67 (figura 6). Se as margens cirúrgicas do mastocitoma extirpado estiverem livres de células neoplásicas (limpas), não há indicação para terapêutica local adicional independentemente de outros resultados. Também, não existe indicação para terapêutica local adicional se as células neoplásicas infiltrarem as margens cirúrgicas (contaminadas) e o mastocitoma for de baixo grau histológico e apresentar baixos índices de proliferação celular, pois apenas é notada uma diferença mínima na taxa de recidiva entre tumores com margens cirúrgicas limpas ou contaminadas. Uma terapêutica local adicional, como a cirurgia secundária ou a radioterapia, deve ser considerada se as margens cirúrgicas estiverem contaminadas e o mastocitoma for de alto grau histológico, ou for de baixo grau mas apresentar altos índices de proliferação celular (Sledge et al., 2016).

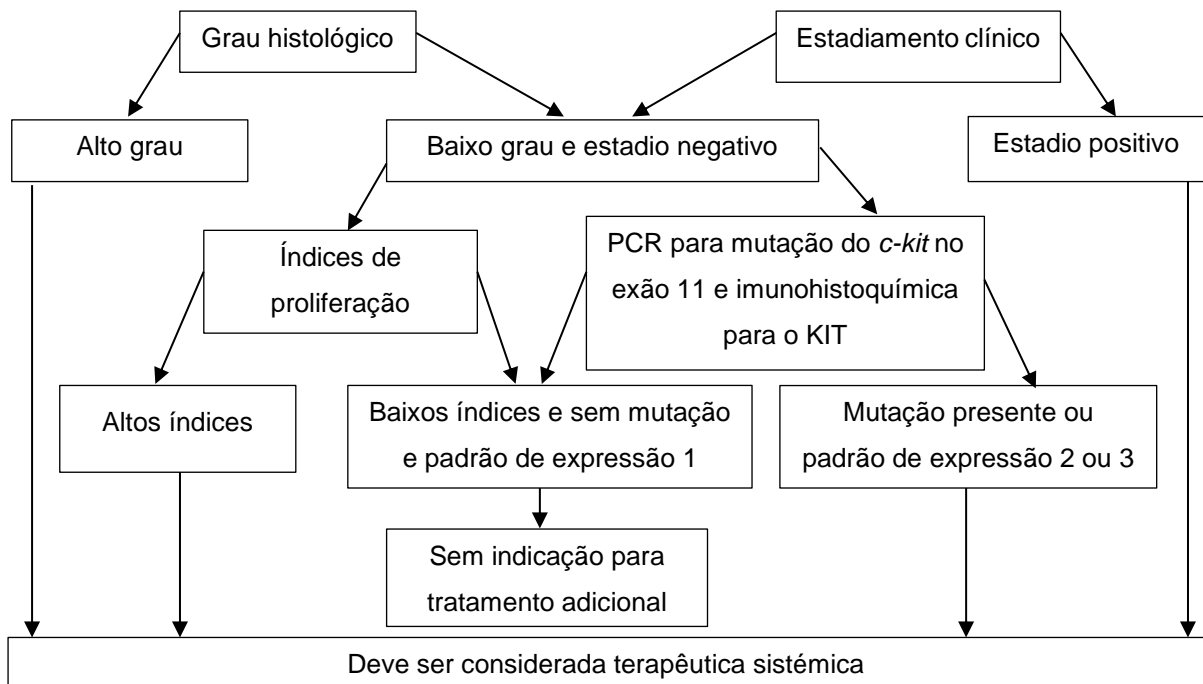
Figura 6 – Considerações para tratamento local adicional de cães com mastocitomas cutâneos excisados. Adaptado de Sledge et al, 2016.



As considerações para a inclusão de terapêutica sistêmica no tratamento de mastocitomas cutâneos caninos devem ser feitas com base no estadiamento clínico, na gradação histológica utilizando o sistema de dois níveis, na avaliação dos padrões de expressão do KIT através de imunohistoquímica, no PCR para mutações ativas do *c-kit* e na avaliação dos índices de

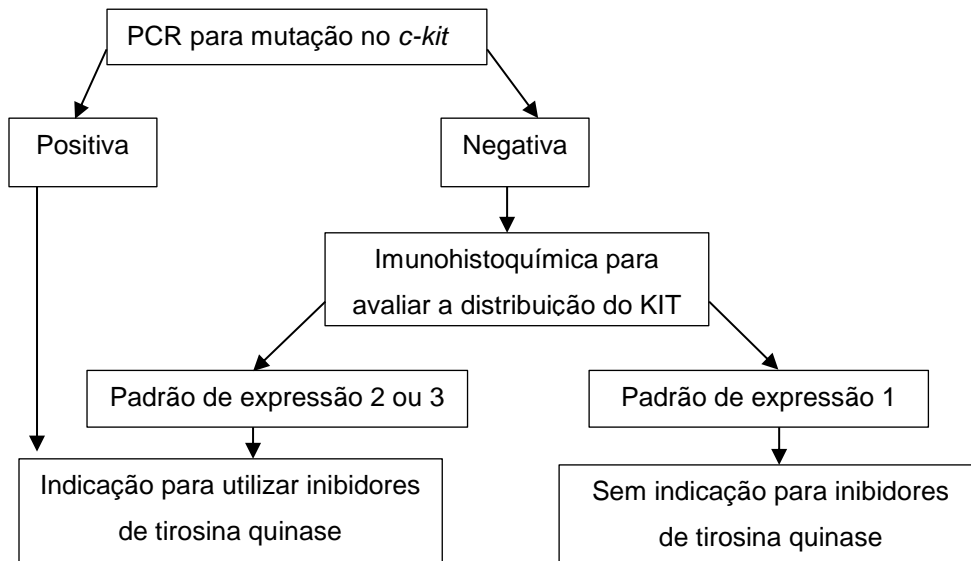
proliferação (figura 7). A terapêutica sistêmica deve ser considerada para cães com evidência de metástases no estadiamento clínico, ou com mastocitomas de alto grau histológico, ou com mastocitomas de baixo grau histológico que apresentem altos índices de proliferação celular, mutação ativa no exão 11 do *c-kit* ou padrões de expressão do KIT 2 ou 3. Não existe indicação para tratamento suplementar em cães sem evidência de metástases no estadiamento clínico e com mastocitomas de baixo grau histológico com baixos índices de proliferação, ausência de mutação ativa no exão 11 do *c-kit* e padrão de expressão do KIT 1 (Sledge et al., 2016).

Figura 7 - Considerações para a inclusão de terapêutica sistêmica no tratamento de mastocitomas cutâneos caninos. Adaptado de Sledge et al, 2016.



As considerações para a inclusão de IRTQ no tratamento de mastocitomas cutâneos caninos, quando é necessária terapêutica sistêmica, devem ser feitas com base nos resultados do PCR para mutações ativas no exão 11 do *c-kit* e avaliação dos padrões de expressão do KIT através de imunohistoquímica (figura 8). Se as células neoplásicas de um mastocitoma cutâneo ou subcutâneo primário ou um foco metastático forem positivas para mutação ativa no exão 11 do *c-kit* ou apresentarem um padrão de expressão do KIT 2 ou 3, pode ser benéfico a inclusão de IRTQ no tratamento. Se as células neoplásicas forem negativas para mutações no *c-kit* e apresentarem um padrão de expressão do KIT 1 não existe indicação para a inclusão de IRTQ no tratamento (Sledge et al., 2016).

Figura 8 - Considerações na inclusão de inibidores de tirosina quinase no tratamento de mastocitomas cutâneos caninos. Adaptado de Sledge et al, 2016.



CAPÍTULO 3 - PADRÃO DE EXPRESSÃO DO RECETOR KIT NO MASTOCITOMA CANINO: SELEÇÃO DOS INIBIDORES DOS RECETORES TIROSINA QUINASE

1. Objetivos

Devido à prevalência e comportamento biológico variável dos mastocitomas caninos, ao custo da terapêutica e ao potencial stress emocional para os tutores, é importante realizar um prognóstico preciso e selecionar corretamente a abordagem terapêutica mais apropriada (Kiupel, 2016). Assim, o principal objetivo deste estudo foi comparar os tempos de sobrevivência de animais com mastocitoma e diferentes padrões de expressão do KIT submetidos a terapêutica com fosfato de toceranib (Palladia®) e/ou masitinib (Masivet®), com o intuito de selecionar o melhor IRTQ para cada padrão de expressão do KIT. Adicionalmente, e com o propósito de caracterizar os tumores, foi objetivo suplementar deste estudo investigar a distribuição dos casos por sexo, idade e raça, e qualificar os mastocitomas em termos de localização, tipo de lesão, grau histológico e padrão de expressão do KIT. Foi, ainda, objetivo desta dissertação a identificação e avaliação de fatores influenciadores de prognóstico.

2. Material e métodos

2.1. Amostra utilizada

Neste estudo retrospectivo, foram critérios de inclusão serem animais de espécie canina, com diagnóstico histopatológico de mastocitoma e análise imunohistoquímica para o KIT.

Este estudo foi realizado em duas fases. Inicialmente, fez-se o levantamento dos casos de mastocitomas dos arquivos do laboratório de Anatomia Patológica da FMV-ULisboa, no período compreendido entre janeiro de 2013 e Fevereiro de 2018. Refira-se que nem todos os casos eram pacientes do HE-FMV, pois, em alguns deles, apenas foi realizada a análise imunohistoquímica no respetivo serviço do Laboratório de Anatomia Patológica da FMV. Assim as amostras biológicas eram provenientes do HE-FMV, da VetOeiras – Hospital Veterinário Central da Linha de Cascais, da Clínica Veterinária Dra. Elsa Pereira, do Centro Veterinário do Jamor e da Clínica Veterinária João XXI.

Na segunda fase do estudo foram consultadas as fichas clínicas dos animais selecionados, atendidos nos vários CAMV, com o objetivo de recolher as informações necessárias e relevantes ao estudo. De modo a complementar informações em falta foram inquiridos alguns Médicos Veterinários assistentes dos animais em estudo.

Os critérios de exclusão deste estudo foram ausência de diagnóstico histopatológico de mastocitoma, ausência de análise imunohistoquímica do KIT, ausência de informações sobre o acompanhamento do animal ou história clínica demasiado incompleta, presença de outro tipo de neoplasia concomitante e instituição de tratamento para essas neoplasias.

2.2. Parâmetros a avaliar

A partir dos relatórios de histopatologia e das fichas clínicas dos animais, foram recolhidos dados respeitantes à identificação do animal, raça, idade no momento do diagnóstico e sexo. A localização do tumor, o tipo de lesão (única ou múltipla), o grau histológico e o padrão de expressão do KIT foram também objeto de análise, bem como o tratamento com quimioterapia clássica e com IRTQ. A resposta ao tratamento foi avaliada através dos tempos de sobrevivência. Na Tabela 4 estão enumeradas as variáveis analisadas no estudo com as respetivas categorias e unidades.

2.3. Análise estatística

Os dados recolhidos foram organizados de forma a criar uma base de dados utilizando o programa *Microsoft Office Excel 2016®* e posteriormente analisados estatisticamente através do *software R 3.5.1 for Windows (64-bit) 2018* e da extensão *R Commander*.

Como análise descritiva das variáveis contínuas, foram utilizadas a média, a mediana, o desvio-padrão, o valor mínimo e o valor máximo. Os resultados foram expressos na forma de média \pm desvio-padrão. Como análise descritiva das variáveis categóricas, foram utilizadas as frequências absolutas (número) e relativas (percentagem).

A relação entre as variáveis categóricas foi avaliada pelo método de qui quadrado (X^2) e o teste exato de Fisher. As associações foram consideradas significativas para valores de $p < 0,05$. Foi, também, empregue o *odds ratio*, que corresponde à razão entre a possibilidade de um evento ocorrer num determinado grupo em detrimento de outro.

A análise de sobrevivência foi realizada com recurso ao método *Kaplan-Meier*, cuja variável dependente foi o tempo de sobrevivência, definido como o período desde a primeira consulta relacionada com mastocitoma até à morte do animal. Os animais vivos no momento do estudo ou mortos por causas não relacionadas com o mastocitoma foram assinalados como censurados. O tempo correspondente dos animais vivos foi definido como o período desde a primeira consulta relacionada com mastocitoma até à última consulta registada. Foram realizadas curvas de Kaplan-Meier para a totalidade da amostra e para grupos consoante as variáveis categóricas. Para além disso, para avaliar se a diferença entre curvas de sobrevivência era estatisticamente significativa foi utilizado o teste *Logrank*, sendo que apenas foram considerados estatisticamente significativos valores de $p < 0,05$.

Tabela 4 – Variáveis utilizadas na análise estatística.

	Variável	Categoria
Variáveis epidemiológicas	Raça	Boxer Golden Retriever Retriever do Labrador Sem raça definida Outra
	Idade	Anos
	Sexo	Macho Fêmea
Variáveis clínicas	Localização	Cabeça/Pescoço Tronco Membros Abdômen Flanco Região escrotal/ prepucial/ perineal/ inguinal
	Tipo de lesão	Única Múltipla
Variáveis histológicas	Grau histológico (de acordo com os sistemas de classificação de Kiupel et al, (2011) e Patnaik et al. (1984))	Baixo grau Alto grau
Variáveis imunohistoquímicas	Padrão de expressão do KIT	1 2 3
Outras variáveis utilizadas no estudo de fatores influenciadores de prognóstico e/ou na análise de sobrevivência	Quimioterapia	Vimblastina Prednisolona Ambos Nenhum
	IRTQ	Palladia Masivet Ambos Nenhum
	Tempo de sobrevivência	Dias
	Morte relacionada com mastocitoma	Sim Não

3. Resultados

O estudo retrospectivo compreendeu uma amostra de 42 cães, com diagnóstico de mastocitoma, com uma média de tempo de seguimento de $361,6 \pm 249,8$ dias e mediana de 293,5 dias.

3.1. Raça

No presente estudo, a raça *Retriever do Labrador* foi aquela que apresentou maior casuística com 9 (21,4%) casos, seguida pelos *Golden Retriever* com 7 (16,7%) e *Boxer* com 6 (14,3%). Os animais sem raça definida corresponderam a 5 (11,9%) casos. Na tabela 5 apresenta-se a distribuição dos mastocitomas por raça.

Tabela 5 - Distribuição dos mastocitomas por raça

Raça	Freq.absoluta (n)	Freq.relativa (%)
<i>Retriever do Labrador</i>	9	21,4%
<i>Golden Retriever</i>	7	16,7%
<i>Boxer</i>	6	14,3%
Sem raça definida	5	11,9%
<i>Terrier</i>	4	9,5%
<i>Bouledogue francês</i>	3	7,1%
<i>Caniche</i>	2	4,8%
<i>Shar Pei</i>	2	4,8%
<i>Pequinês</i>	1	2,4%
<i>Braco de Weimar</i>	1	2,4%
<i>Baixote</i>	1	2,4%
<i>Chihuahua</i>	1	2,4%

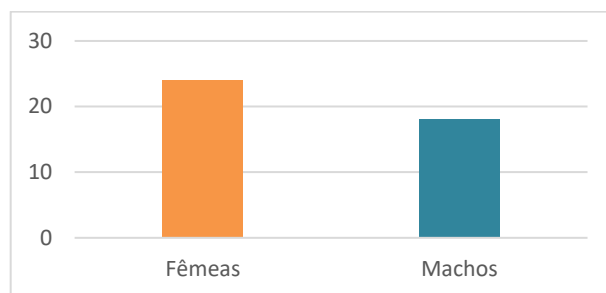
3.2. Idade

A idade dos animais afetados variou entre os 9 meses e os 16 anos com média de $8,2 \pm 3,3$ anos e mediana de 9 anos. Com o intuito de prosseguir com a análise de sobrevivência e associações estatísticas, a variável idade foi dividida em dois grupos: animais com idade igual ou inferior a 8 anos e animais com idade superior a 8 anos, resultando em 19 (45,2%) casos de idade inferior ou igual a 8 anos e 23 (54,8%) casos de idade superior a 8 anos.

3.3. Sexo

Dos animais portadores dos tumores em estudo, 24 (57,1%) eram fêmeas e 18 (42,9%) eram machos (gráfico 2).

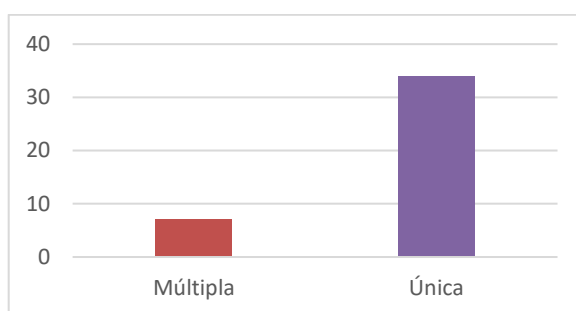
Gráfico 2 - Distribuição dos mastocitomas por sexo.



3.4. Tipo de lesão

Dos animais incluídos neste estudo, identificaram-se 34 (82,9%) animais com nódulos solitários e 7 (17,1%) com nódulos múltiplos (gráfico 3). Não foi possível recolher informação acerca da localização e multiplicidade dos tumores num dos casos.

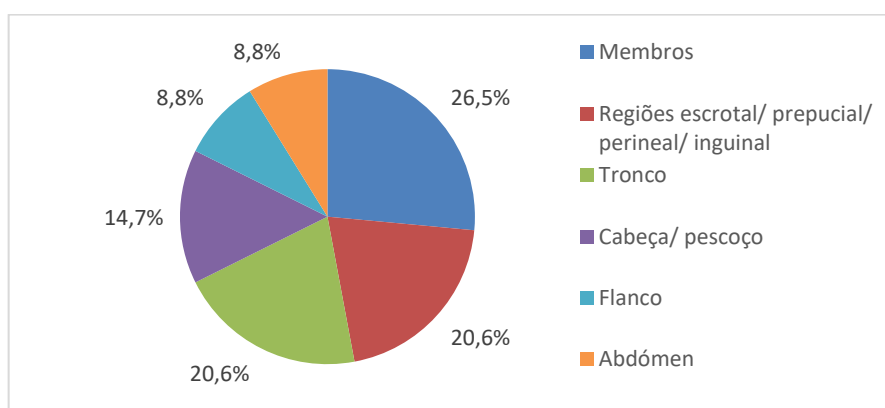
Gráfico 3 - Distribuição dos mastocitomas por tipo de lesão.



3.5. Localização

Os 34 tumores solitários tinham a localização apresentada no gráfico 4. Assim, 9 (26,5%) tumores localizaram-se nos membros, sem preferência para o membro torácico ou pélvico, 7 (20,6%) nas regiões escrotal/ prepucial/perineal/ inguinal, 7 (20,6%) no tronco, 5 (14,7%) na cabeça ou pescoço, 3 (8,8%) no flanco e 3 (8,8%) no abdómen.

Gráfico 4 – Frequência relativa da distribuição dos mastocitomas por localização.



3.6. Grau histológico

A classificação em graus foi feita de acordo com os critérios de Kiupel et al. (2011) para a maioria dos tumores, apenas para um dos casos foram utilizados os critérios de Patnaik et al. (1984). Assim, 18 (42,9%) tumores foram classificados com baixo grau, 23 (54,8%) com alto grau (kiupel et al. 2011) e 1 (2,4%) com grau II de Patnaik.

3.7. Padrão de expressão do KIT

Neste estudo, foram identificados doze (28,6%) tumores com padrão de expressão 1, nove (21,4%) com padrão de expressão 2 e vinte e um (50%) com padrão de expressão 3 (tabela 6). Com o intuito de prosseguir com a análise de sobrevivência e associações estatísticas, a variável padrão de expressão do KIT foi dividida em dois grupos: tumores com localização típica do KIT (padrão de expressão 1) e tumores com localização atípica do KIT (padrão de expressão 2 e 3), resultando em doze (28,6%) casos com localização típica e trinta (71,4%) com localização atípica.

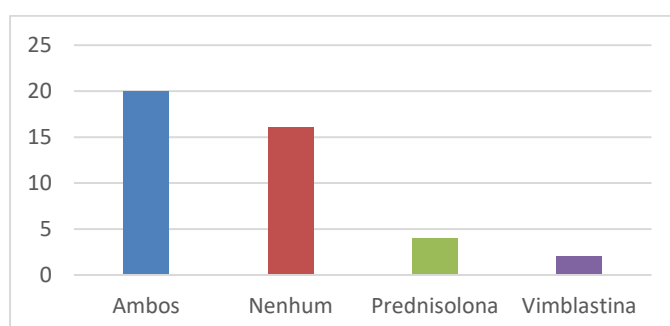
Tabela 6 - Distribuição dos mastocitomas por padrão de expressão do KIT.

KIT	Número	%
Padrão de expressão 1	12	28,6%
Padrão de expressão 2	9	21,4%
Padrão de expressão 3	21	50%

3.8. Tratamento

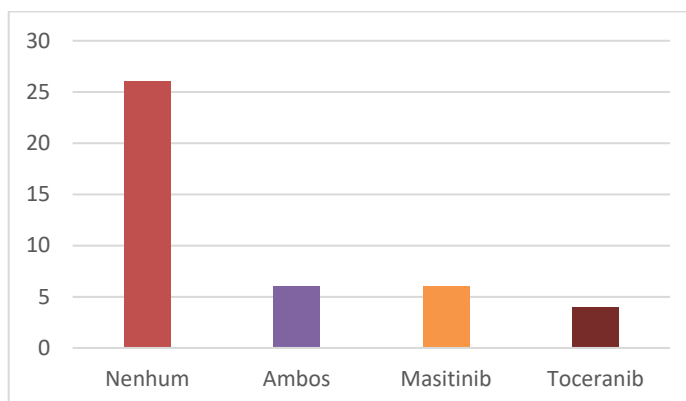
Os protocolos quimioterápicos encontrados variaram entre a administração de vimblastina, em protocolo único, em 4,8% (2/42) dos casos, a administração de prednisolona, em protocolo único, em 9,5% (4/42) dos casos e a administração da associação de vimblastina com prednisolona em 47,6% (20/42) dos casos. Em 38,1% (16/42) dos animais não foi feita a administração de qualquer quimioterapia. A distribuição dos casos por protocolo quimioterápico está apresentada no gráfico 5.

Gráfico 5 - Distribuição dos casos por protocolo quimioterápico.



Em relação à quimioterapia com os IRTQ, 14,3% (6/42) dos animais foram tratados com ambos os IRTQ, 14,3% (6/42) com masitinib (Masivet®) e 9,5% (4/42) com toceranib (Palladia®). Não foram utilizados IRTQ em 61,9% (26/42) dos casos. A distribuição dos casos segundo a utilização de IRTQ está apresentada no gráfico 6.

Gráfico 6 - Distribuição dos casos segundo a utilização de IRTQ.



Dos dez animais tratados com toceranib (Palladia®), cinco (50%) apresentaram reações adversas relacionadas com a administração do medicamento. Assim, quatro (40%) animais desenvolveram gastroenterite e um (10%) animal desenvolveu pancreatite.

Dos doze animais tratados com masitinib (Masivet®), apenas três (25%) apresentaram reações adversas relacionadas com a administração do medicamento. Em dois (16,7%) casos registaram-se um aumento nas enzimas hepáticas e um (8,3%) animal desenvolveu anemia, neutropenia e aumento das enzimas hepáticas.

3.9. Associações estatísticas

3.9.1. Associações entre as variáveis epidemiológicas e clínicas

Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas na associação entre as variáveis epidemiológicas e clínicas. No entanto, na tabela 7, é possível observar que 83,3% dos animais de raça *Boxer* tinham idade inferior ou igual a 8.

Tabela 7 - Associação entre a raça e a idade dos animais em estudo.

Raça	Idade		p-value
	≤8	>8	
Boxer	83,3% (5)	16,7% (1)	0,3568
Golden Retriever	42,9% (3)	57,1% (4)	
S.R.D.	25% (1)	75% (3)	
Retriever do Labrador	33,3% (3)	66,7% (6)	
Outra	43,8% (7)	56,2% (9)	

3.9.2. Associações entre as variáveis epidemiológicas e clínicas e as variáveis histológicas

Os animais com idade superior a 8 anos apresentaram uma maior percentagem de tumores de alto grau histológico. Pelo contrário, os animais com idade inferior ou igual a 8 anos apresentaram uma maior percentagem de tumores de baixo grau histológico ($p=0,0495$). O risco de desenvolvimento de tumores de alto grau foi 3,47 vezes superior nos animais com idades superiores a 8 anos comparado com o risco para animais com idades iguais ou inferiores a 8 anos (tabela 8).

Os animais de raça *Boxer* apresentaram maioritariamente tumores de baixo grau histológico, enquanto que os animais sem raça definida apresentaram apenas tumores de alto grau histológico, no entanto, as diferenças observadas para o grau histológico entre as várias raças não foram estatisticamente significativas (tabela 8).

O género, localização tumoral e multiplicidade tumoral não apresentaram qualquer relação com o grau histológico.

Tabela 8 - Associações entre a raça e idade e o grau histológico.

Raça	Grau histológico		p-value	Odds ratio
	Baixo grau	Alto grau		
<i>Boxer</i>	83,3% (5)	16,7% (1)	0,09687	
<i>Golden Retriever</i>	57,1% (4)	42,9% (3)		
S.R.D.	0% (0)	100% (4)		
<i>Retriever do Labrador</i>	44,4% (4)	55,6% (5)		
Outra	33,3% (5)	66,7% (10)		
Idade	Baixo grau	Alto grau	0,0495	3,47
≤8	61,1% (11)	38,9% (7)		
>8	30,4% (7)	69,6% (16)		

3.9.3. Associações estatísticas entre as variáveis epidemiológicas, clínicas e histológicas e as variáveis imunohistoquímicas

A maior percentagem de tumores com padrão de expressão do KIT atípico (2 e 3) localizava-se no abdómen, membros e tronco. Já os tumores com padrão de expressão do KIT típico (1) encontravam-se localizados em maior percentagem noutros locais (tabela 9).

As restantes variáveis não apresentaram associação estatisticamente significativa com o padrão de expressão do KIT (tabela 9).

O risco de desenvolvimento de tumores com padrões do KIT atípicos foi 2,06 vezes superior nos animais com idade superior a 8 anos do que nos animais com idade igual ou inferior a 8 anos (tabela 9).

O risco de desenvolvimento de tumores com padrões do KIT atípicos foi 2,80 vezes superior nos animais com lesões múltiplas do que nos animais com lesões únicas (tabela 9).

O risco de desenvolvimento de tumores com padrões do KIT atípicos foi 2,93 vezes superior nos animais com tumores de alto grau histológico do que nos animais com tumores de baixo grau histológico (tabela 9).

Tabela 9 - Associações entre as variáveis epidemiológicas, clínicas e histológicas e o KIT.

	KIT		p-value	Odds ratio
Raça	Típico	Atípico	0,5865	
<i>Boxer</i>	16,7% (1)	83,3% (5)		
<i>Golden Retriever</i>	42,9% (3)	57,1% (4)		
<i>S.R.D.</i>	0% (0)	100% (4)		
<i>Retriever do Labrador</i>	22,2% (2)	77,8% (7)		
<i>Outra</i>	37,5% (6)	62,5% (10)		
Idade	Típico	Atípico	0,2809	2,06
≤8	36,8% (7)	63,2% (12)		
>8	21,7% (5)	78,3% (18)		
Sexo	Típico	Atípico	0,5541	1,48
Macho	33,3% (6)	66,7% (12)		
Fêmea	25% (6)	75% (18)		
Localização	Típico	Atípico	0,0271	
Abdómen	0% (0)	100% (3)		
Cabeça	60% (3)	40% (2)		
Flanco	66,7% (2)	33,3% (1)		
Membros	0% (0)	100% (9)		
Regiões	57,1% (4)	42,9% (3)		
Tronco	28,6% (2)	71,4% (5)		
Lesão	Típico	Atípico	0,6514	2,80
Única	32,4% (11)	67,6% (23)		
Múltipla	14,3% (1)	85,7% (6)		
Grau histológico	Típico	Atípico	0,1645	2,93
Baixo grau	38,9% (7)	61,1% (11)		
Alto grau	17,4% (4)	82,6% (19)		

3.10. Estudo de fatores influenciadores de prognóstico

Nesta secção, serão focadas as associações estatísticas entre as diferentes variáveis estudadas (epidemiológicas e clínicas, histopatológicas e imunohistoquímicas) e a morte devida ao tumor.

De entre os 42 animais incluídos neste estudo, não foi possível determinar o estado de sobrevivência de 4. Dos restantes 38 animais, 22 (57,9%) encontravam-se vivos ou morreram

de causas não relacionadas com o mastocitoma e 16 (42,1%) encontravam-se mortos devido ao mastocitoma.

Os animais com idade superior a 8 anos apresentaram maior percentagem de mortalidade relacionada com o mastocitoma ($p=0,01$), bem como os animais com tumores de alto grau histológico ($p=0,002$) (tabela 10).

As restantes variáveis não apresentaram associação estatisticamente significativa com a morte devida ao tumor. No entanto, é possível observar que 100% dos animais de raça *Boxer* não morreu devido ao mastocitoma, bem como 71,4% dos animais com tumores com localização nas regiões escrotal/ prepucial/ inguinal/ perineal (tabela 10).

Tabela 10 - Associações entre as variáveis epidemiológicas, clínicas, histológicas e imunohistoquímicas e a morte devida ao tumor.

Raça	Morte Mastocitoma		P-value	Odds ratio
	Não	Sim		
<i>Boxer</i>	100% (5)	0% (0)	0,2141	
<i>Golden Retriever</i>	60% (3)	40% (2)		
S.R.D.	50% (2)	50% (2)		
<i>Retriever do Labrador</i>	66,7% (6)	33,3% (3)		
Outra	40% (6)	60% (9)		
Idade	Não	Sim	0,01289	5,94
≤8	81,2% (13)	18,8% (3)		
>8	40,9% (9)	59,1% (13)		
Sexo	Não	Sim	0,9169	1,06
Macho	58,8% (10)	41,2% (7)		
Fêmea	57,1% (12)	42,9% (9)		
Localização	Não	Sim	0,8458	
Abdómen	66,7% (2)	33,3% (1)		
Cabeça/pescoço	40% (2)	60% (3)		
Flanco	33,3% (1)	66,7% (2)		
Membros	50% (3)	50% (3)		
Regiões escrotal/ prepucial/ inguinal/ perineal	71,4% (5)	28,6% (2)		
Tronco	57,1% (4)	42,9% (3)		
Lesão	Não	Sim	0,6796	1,62
Múltipla	66,7% (4)	33,3% (2)		
Única	54,8% (17)	45,2% (14)		
Grau histológico	Não	Sim	0,00249	11,37
Baixo grau	87,5% (14)	12,5% (2)		
Alto grau	36,4% (8)	63,6% (14)		
KIT	Não	Sim	0,296	2,41
Típico	72,7% (8)	27,3% (3)		
Atípico	51,9% (14)	48,1% (13)		

O risco de morte relacionada com o mastocitoma foi 5,94 vezes superior nos animais com idade superior a 8 anos do que nos animais com idade igual ou inferior a 8 anos (tabela 10). O risco de morte relacionada com o mastocitoma foi 11,37 vezes superior nos animais com tumores de alto grau histológico do que nos animais com tumores de baixo grau histológico (tabela 10).

O risco de morte relacionada com o mastocitoma foi 2,41 vezes superior nos animais com tumores com padrões do KIT atípicos do que nos animais com tumores com padrão do KIT típico (tabela 10).

3.11. Análise de sobrevivência

De modo a facilitar a exposição dos dados, far-se-á uma análise sumária das curvas de sobrevivência, estando depois as mesmas representadas.

Na figura 9 está representada a curva de Kaplan-Meier para o tempo de sobrevivência da amostra. A mediana de tempo de sobrevivência dos animais em estudo foi de 606 dias, com um mínimo de 56 dias e um máximo de 862 dias.

Na análise de sobrevivência de acordo com a raça, a mediana de tempo de sobrevivência nos *Boxers* e nos *Golden Retrievers* não foi alcançada. A mediana de tempo de sobrevivência foi de 862 dias para os *Retrievers* do *Labrador*, 467 dias para os canídeos sem raça definida e 421 dias para as outras raças. Aos 300 dias a probabilidade de sobrevivência foi a seguinte: 100% para *Boxer* e *Retriever* do *Labrador*, 75% para os canídeos sem raça definida, 53,3% para os *Golden Retrievers* e 51,4% para as outras raças. As diferenças observadas não foram estatisticamente significativas ($p= 0.4$) (figura 10).

Figura 9 - Curva Kaplan-Meier de sobrevivência para o total da amostra.

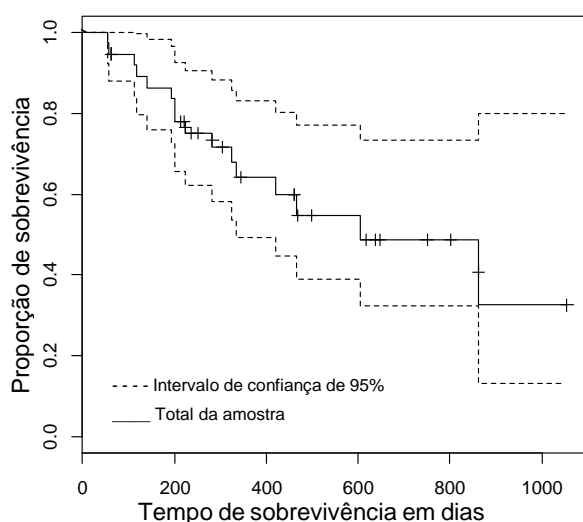
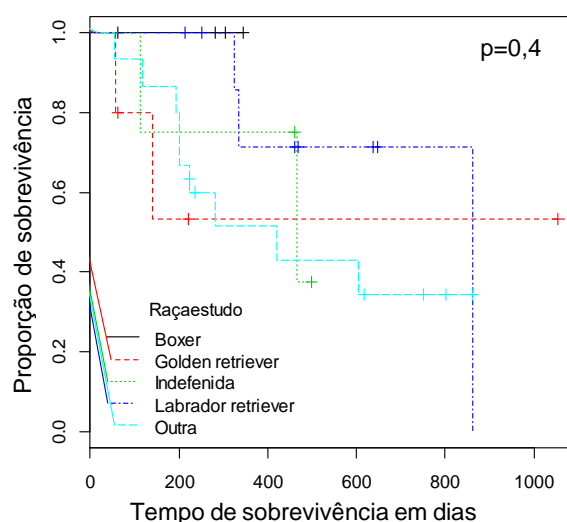


Figura 10 - Curvas Kaplan-Meier de sobrevivência de acordo com a raça.



Na análise de sobrevivência de acordo com a idade, a mediana de tempo de sobrevivência foi de 862 dias para os canídeos com idade inferior ou igual a 8 anos no momento do

diagnóstico e de 334 dias para os canídeos com idade superior a 8 anos no momento do diagnóstico. As diferenças observadas foram estatisticamente significativas ($p= 0.01$) (figura 11).

Na análise de sobrevivência de acordo com o gênero, a mediana de tempo de sobrevivência foi de 862 dias para as fêmeas e de 467 dias para os machos. As diferenças observadas não foram estatisticamente significativas ($p= 0.5$) (figura 12).

Figura 11 - Curvas Kaplan-Meier de sobrevivência de acordo com a idade no momento do diagnóstico.

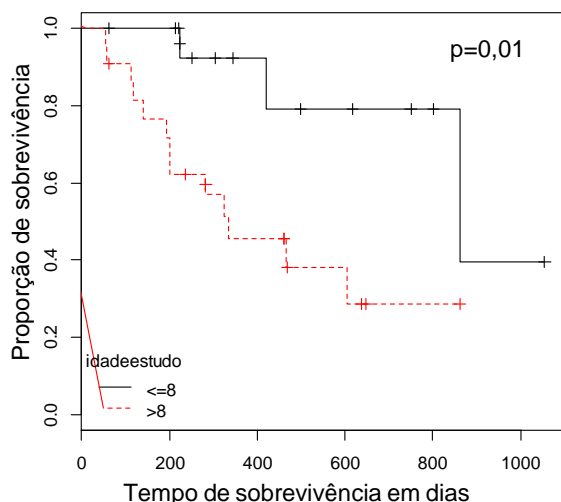
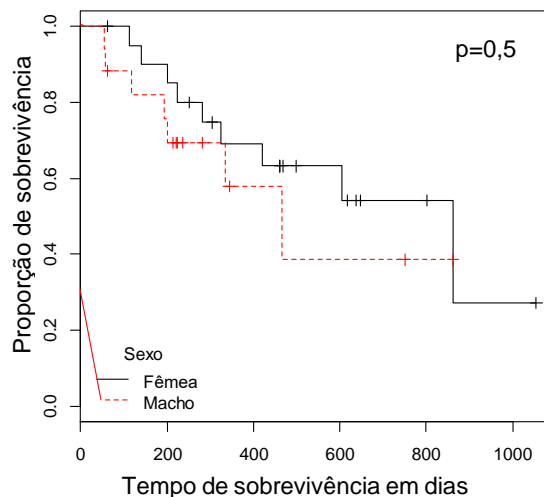


Figura 12 - Curvas Kaplan-Meier de sobrevivência de acordo com o gênero.



Na análise de sobrevivência de acordo com a localização tumoral, a mediana de tempo de sobrevivência nos canídeos com mastocitomas localizados no abdômen e nas regiões escrotal, perineal, inguinal e prepucial não foi alcançada. A mediana de tempo de sobrevivência foi de 862 dias para os canídeos com mastocitoma localizado nos membros, 536,5 dias para os canídeos com mastocitoma localizado na cabeça ou pescoço, 421 dias para os canídeos com mastocitoma localizado no flanco e 324 dias para os canídeos com mastocitoma localizado no tronco. Aos 300 dias a probabilidade de sobrevivência foi a seguinte: 75% para a localização cabeça ou pescoço, 71,4% para a localização tronco, 68,6% para a localização regiões escrotal, perineal, inguinal e prepucial e 66,7% para as localizações membros, flanco e abdômen. As diferenças observadas não foram estatisticamente significativas ($p= 1$) (figura 13).

Na análise de sobrevivência de acordo com a multiplicidade do tumor, a mediana de tempo de sobrevivência nos canídeos com lesão múltipla não foi alcançada. A mediana de tempo de sobrevivência foi de 606 dias para os canídeos com lesão única. Aos 365 dias a probabilidade de sobrevivência foi a seguinte: 66,7% para os canídeos com lesão múltipla e 64% para os canídeos com lesão única. As diferenças observadas não foram estatisticamente significativas ($p= 0.6$) (figura 14).

Figura 13 – Curvas Kaplan-Meier de sobrevivência de acordo com a localização tumoral.

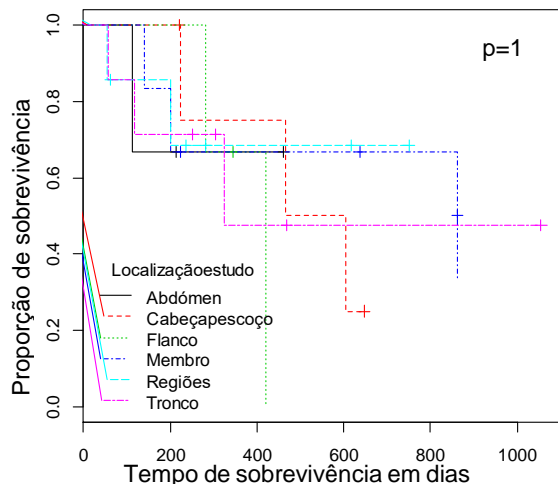
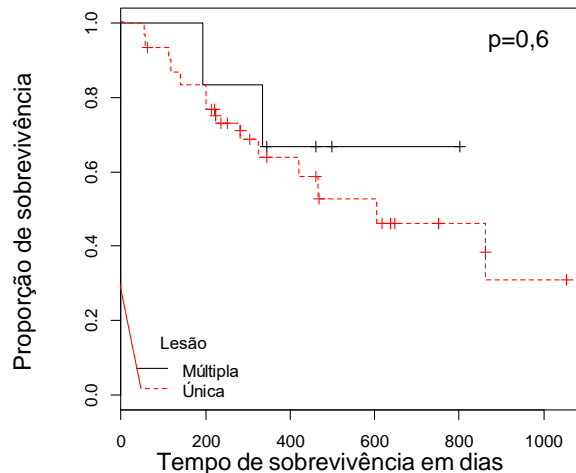


Figura 14 – Curvas Kaplan-Meier de sobrevivência de acordo com a multiplicidade do tumor.



Na análise de sobrevivência de acordo com o grau histológico, a mediana de tempo de sobrevivência nos canídeos com mastocitomas de baixo grau histológico não foi alcançada. A mediana de tempo de sobrevivência foi de 421 dias para os canídeos com mastocitomas de alto grau histológico. Aos 365 dias a probabilidade de sobrevivência foi a seguinte: 85,7% para os canídeos com mastocitomas de baixo grau histológico e 52,8% para os canídeos com mastocitomas de alto grau histológico. As diferenças observadas foram estatisticamente significativas ($p= 0,03$) (figura 15).

Na análise de sobrevivência de acordo com o padrão de expressão do KIT, a mediana de tempo de sobrevivência nos canídeos com mastocitoma com padrão 1 não foi alcançada. A mediana de tempo de sobrevivência foi de 334 dias para os canídeos com mastocitoma com padrão 2 e 467 dias para os canídeos com mastocitomas com padrão 3. Aos 300 dias a probabilidade de sobrevivência foi a seguinte: 90% para os canídeos com mastocitomas com padrão 1, 71,4% para os canídeos com mastocitomas com padrão 2 e 62,7% para os canídeos com mastocitomas com padrão 3. As diferenças observadas não foram estatisticamente significativas ($p= 0,5$) (figura 16).

Figura 15 - Curvas Kaplan-Meier de sobrevivência de acordo com o grau histológico.

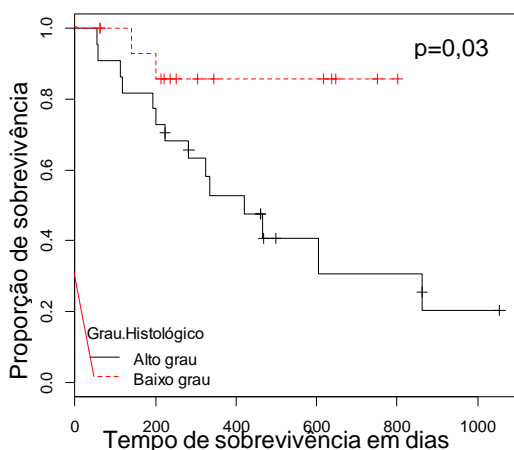
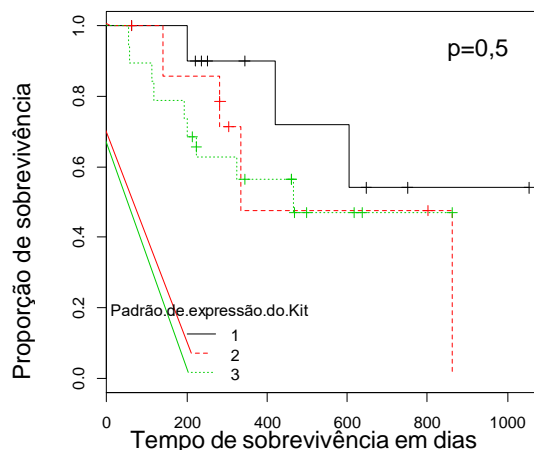


Figura 16 - Curvas Kaplan-Meier de sobrevivência de acordo com o padrão de expressão do KIT.



Na análise de sobrevivência de acordo com o tratamento quimioterápico, a mediana de tempo de sobrevivência nos canídeos com tratamento com vimblastina e sem tratamento quimioterápico não foi alcançada. A mediana de tempo de sobrevivência foi de 421 dias para os canídeos com tratamento com ambos (vimblastina e prednisolona) e 334 dias para os canídeos com tratamento com prednisolona. Aos 365 dias a probabilidade de sobrevivência foi a seguinte: 100% para os canídeos com tratamento com vimblastina, 92,9% para canídeos sem tratamento quimioterápico, 51,3% para os canídeos com tratamento com ambos e 33,3% para os canídeos com tratamento com prednisolona. As diferenças observadas foram estatisticamente significativas ($p= 0.02$) (figura 17). Na tabela 11, está representada a associação entre o grau histológico e o tratamento quimioterápico, com o objetivo explicativo da maior probabilidade de sobrevivência dos animais sem tratamento quimioterápico.

Tabela 11 - Associação entre o grau histológico e a quimioterapia.

Grau histológico	Quimioterapia		p-value	Odds ratio
	Não	Sim		
Baixo grau	66,7%	33,3%	0,003051	8,88
Alto grau	17,4%	82,6%		

Na análise de sobrevivência de acordo com o tratamento quimioterápico com IRTQ, a mediana de tempo de sobrevivência nos canídeos com tratamento com masitinib (Masivet®) e sem tratamento com IRTQ não foi alcançada. A mediana de tempo de sobrevivência foi de 513,5 dias para os canídeos com tratamento com ambos os IRTQ e 263 dias para os canídeos com tratamento com toceranib (Palladia®). Aos 365 dias a probabilidade de sobrevivência foi a seguinte: 71,4% para os canídeos sem tratamento com IRTQ, 66,7% para canídeos com tratamento com masitinib (Masivet®) e com tratamento com ambos os IRTQ, e 25% para os canídeos com tratamento com toceranib (Palladia®). As diferenças observadas foram estatisticamente significativas ($p= 0.04$) (figura 18). Na tabela 12, está representada a associação entre o grau histológico e padrão de expressão do KIT e o tratamento com IRTQ, com o objetivo explicativo da maior probabilidade de sobrevivência dos animais sem tratamento com IRTQ.

Tabela 12 - Associação entre grau histológico e padrão de expressão do KIT e o tratamento com IRTQ.

Grau histológico	IRTQ		p-value	Odds ratio
	Não	Sim		
Baixo grau	83,3%	16,7%	0,02539	5,23
Alto grau	47,8%	52,2%		
KIT	Não	Sim	0,3163	2,25
Típico	75%	25%		
Atípico	56,7%	43,3%		

Figura 17 - Curvas Kaplan-Meier de sobrevivência de acordo com o tratamento quimioterápico.

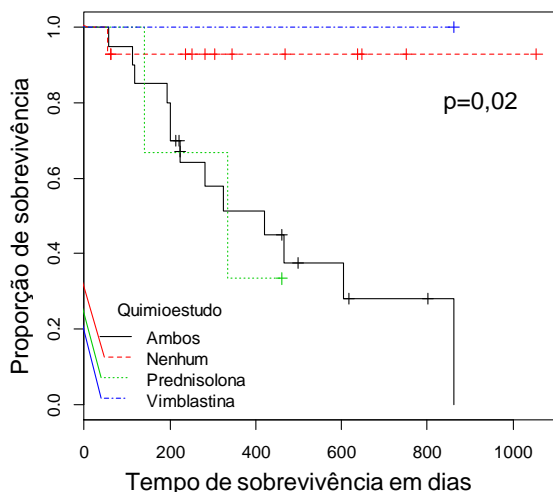
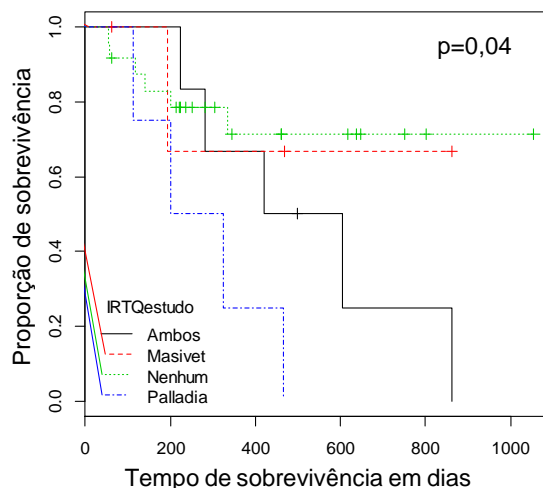


Figura 18 - Curvas Kaplan-Meier de sobrevivência de acordo com o tratamento com IRTQ.



Na análise de sobrevivência de acordo com o tratamento quimioterápico com IRTQ, para os diferentes padrões de expressão do KIT, foram obtidas as curvas de sobrevivência observadas nas figuras 19, 20 e 21.

No grupo dos animais com padrão de expressão do KIT 1, apenas registamos animais tratados com ambos os IRTQ ou com nenhum dos dois. A mediana de tempo de sobrevivência nos canídeos sem tratamento com IRTQ não foi alcançada. A mediana de tempo de sobrevivência foi de 513,5 dias para os canídeos com tratamento com ambos os IRTQ. Aos 365 dias a probabilidade de sobrevivência foi a seguinte: 100% para os canídeos com tratamento com ambos os IRTQ e 87,5% para canídeos sem tratamento com IRTQ. As diferenças observadas não foram estatisticamente significativas ($p= 0.1$) (figura 20).

No grupo dos animais com padrão de expressão do KIT 2, apenas registamos animais tratados com ambos os IRTQ, com masitinib (Masivet®) ou com nenhum IRTQ. A mediana de tempo de sobrevivência nos canídeos com tratamento com masitinib (Masivet®) não foi alcançada. A mediana de tempo de sobrevivência foi de 572,5 dias para os canídeos com tratamento com ambos os IRTQ e 334 dias para os canídeos sem tratamento com IRTQ. Aos 365 dias a probabilidade de sobrevivência foi a seguinte: 50% para canídeos com tratamento com ambos os IRTQ e 40% para os canídeos sem tratamento com IRTQ, este valor não foi alcançado para canídeos com tratamento com masitinib (Masivet®). As diferenças observadas não foram estatisticamente significativas ($p= 1$) (figura 21).

No grupo dos animais com padrão de expressão do KIT 3, registamos animais tratados com ambos os IRTQ, com masitinib (Masivet®), com toceranib (Palladia®) ou com nenhum IRTQ. A mediana de tempo de sobrevivência nos canídeos com tratamento com masitinib (Masivet®) e sem tratamento com IRTQ não foi alcançada. A mediana de tempo de sobrevivência foi de 360,5 dias para os canídeos com tratamento com ambos os IRTQ e 263 dias para os canídeos com tratamento com toceranib (Palladia®). Aos 365 dias a probabilidade de sobrevivência foi a seguinte: 70% para os canídeos sem tratamento com IRTQ, 66,7% para canídeos com

tratamento com masitinib (Masivet®), 50% para os canídeos com tratamento com ambos os IRTQ e 25% para os canídeos com tratamento com toceranib (Palladia®). As diferenças observadas não foram estatisticamente significativas ($p= 0,3$) (figura 22).

Figura 19 - Curvas Kaplan-Meier de sobrevivência de acordo com o tratamento com IRTQ, em cães com padrão de expressão do KIT 1.

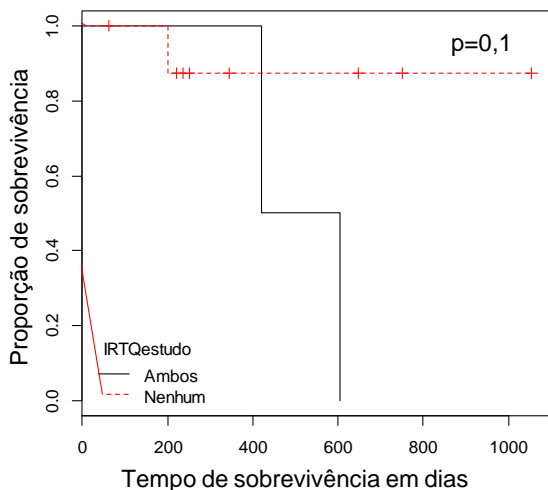


Figura 20 - Curvas Kaplan-Meier de sobrevivência de acordo com o tratamento com IRTQ, em cães com padrão de expressão do KIT 2.

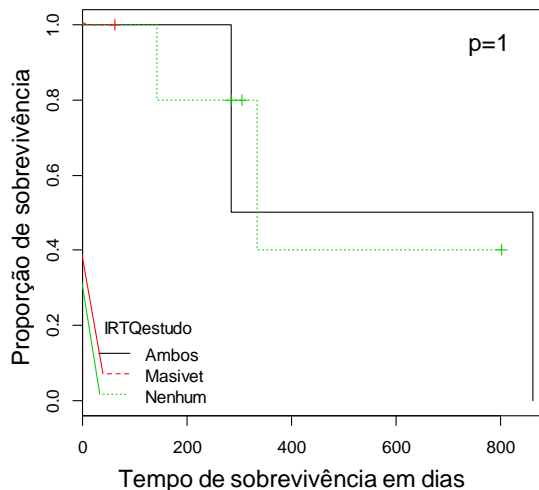
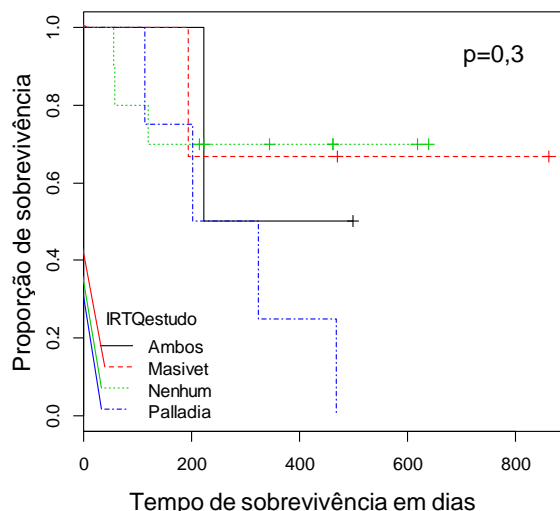


Figura 21 - Curvas Kaplan-Meier de sobrevivência de acordo com o tratamento com IRTQ, em cães com padrão de expressão do KIT 3.



4. Discussão

No estudo agora apresentado, foram incluídos 42 animais portadores de mastocitomas cutâneos. Os casos clínicos foram provenientes de vários CAMVs da região de Lisboa e do HEV-FMV.

A distribuição dos mastocitomas por raça foi bastante alargada, no entanto, foi encontrada uma maior frequência de tumores nas raças *Retriever do Labrador*, *Golden Retriever* e *Boxer*, como descrito em estudos anteriores (Bostock, 1973; Rothwell et al., 1987; Simoes et al.,

1994; Miller, 1995; Kiupel et al., 2011; Shoop et al., 2015), seguindo-se os animais de raça indeterminada. As restantes raças foram por ordem decrescente de frequência de ocorrência de mastocitoma, os *Terriers*, o *Bouledogue Francês*, o *Caniche*, o *Shar Pei*, o *Pequinês*, o *Braco de Weimar*, o *Baixote* e o *Chihuahua*. Devemos ter presente que a prevalência de mastocitomas em algumas raças pode estar relacionada com a popularidade das mesmas em determinadas regiões geográficas.

Os animais de raça *Boxer* apresentaram, por norma, mastocitomas em idades mais jovens quando comparados com as outras raças, e desenvolveram maioritariamente mastocitomas de grau histológico baixo; apesar destas diferenças não serem estatisticamente significativas, vão de encontro ao reportado (Bostock, 1973; Bostock, 1986; Baker-Gabb et al., 2003). Os animais sem raça definida desenvolveram, por norma, mastocitomas de grau histológico alto, apesar dos resultados obtidos não serem estatisticamente significativos.

A idade dos animais afetados variou entre os 9 meses e os 16 anos com média de 8,2 anos, resultado concordante com os estudos de Hottendorf & Nielsen, (1967) que reportaram um intervalo de idades entre os 7 meses e os 18 anos e média de 8,2 anos; de Rothwell et al., (1987), no qual o intervalo de idades reportado foi entre os 2 e os 16 anos, com uma média de 8,7 anos; de Simoes et al., (1994), que reportaram um intervalo de idades entre o 1 mês e os 17 anos e média de 8 anos; e de Shoop et al.,(2015), no qual a média de idades foi 8,2 anos. A idade do animal mostrou associação significativa com o grau histológico ($p=0,0495$). Os animais com idade superior a 8 anos apresentam predominantemente tumores de alto grau histológico e o risco de desenvolvimento de tumores de alto grau foi 3,47 vezes superior nos animais com idades superiores a 8 anos comparado com o risco para animais com idades iguais ou inferiores a 8 anos.

Nos casos estudados, não houve predisposição sexual, com 57,1% dos casos em fêmeas e 42,9% em machos, o que está em linha com o reportado por outros autores (Hottendorf & Nielsen, 1967; Rothwell et al., 1987).

Neste trabalho, as localizações mais frequentes do mastocitoma foram os membros (26,5%), seguindo-se as regiões escrotal/ prepucial/ perineal/ inguinal (20,6%) e o tronco (20,6%). Os restantes tumores distribuíram-se pela cabeça/ pescoço (14,7%), flanco (8,8%) e abdómen (8,8%). A maioria dos estudos agrupa os tumores do tronco, flanco e abdómen na mesma categoria (tronco), o que neste caso perfazia 38,2% das localizações (número utilizado para efeito de comparação). Assim, a frequência de tumores nas várias localizações registaram valores similares aos de outros estudos (Hottendorf & Nielsen, 1967; Sfiligoi et al., 2005).

Dos animais incluídos neste estudo, identificaram-se 17,1% com múltiplos nódulos, percentagem dentro dos limites descritos noutros estudos (Hottendorf & Nielsen, 1967; Sfiligoi et al., 2005; Murphy et al., 2006).

Com base no estudo que estabeleceu o sistema de dois níveis para o grau histológico, aproximadamente 90% dos tumores são de baixo grau (Kiupel et al., 2011). Neste trabalho,

42,9% dos tumores foram classificados com baixo grau e 54,8% com alto grau. A maior percentagem de tumores de alto grau neste estudo comparado com o estudo de Kiupel et al. 2011 poderá estar relacionada com o facto de os tumores de alto grau histológico e com piores resultados após cirurgia e quimioterapia, serem os mais frequentemente submetidos a análise de imunohistoquímica do KIT, com o intuito de complementar o tratamento com IRTQ. Um dos critérios de inclusão utilizados neste estudo foi precisamente a existência de análise imunohistoquímica do KIT, o que poderá explicar a maior percentagem de tumores de alto grau.

Neste estudo, 28,6% dos tumores foram identificados com padrão de expressão 1, 21,4% com padrão de expressão 2 e 50% com padrão de expressão 3. Noutros estudos (Kiupel et al., 2004; Da Costa et al., 2007; Webster, Yuzbasiyan-Gurkan, Thamm, Hamilton, & Kiupel, 2008), os tumores distribuíram-se em média da seguinte forma: 32,5% com padrão de expressão 1, 53,3% com padrão de expressão 2 e 14,1% com padrão de expressão 3. Pode assim concluir-se que no nosso estudo os resultados são um pouco diferentes, uma vez que o padrão de expressão 3 é o predominante.

Quando dividimos o padrão de expressão do KIT em localização típica e atípica obtivemos resultados similares a um estudo recente (Weishaar et al., 2018), pois 28,6% dos casos têm localização típica e 71,4% têm localização atípica.

Na associação do padrão de expressão do KIT com as variáveis epidemiológicas e clínicas, verificou-se que as localizações abdómen, membros e tronco apresentaram maior percentagem de tumores com padrão de expressão do KIT atípico (2 e 3), enquanto que as restantes localizações apresentaram maior percentagem de tumores com padrão de expressão do KIT típico (1) ($p=0,0271$). Foi, ainda, constatado que animais com idade superior a 8 anos apresentam predominantemente tumores com padrões de expressão do KIT atípicos e que o risco de desenvolvimento de tumores com padrões do KIT atípico foi 2,06 vezes superior nestes animais comparativamente ao risco para animais com idade igual ou inferior a 8 anos. Verificou-se, também, que o risco de desenvolvimento de tumores com padrões do KIT atípicos foi 2,80 vezes superior nos animais com lesões múltiplas em relação ao risco para animais com lesões únicas.

Dos animais com tumores de alto grau histológico, verificou-se que 82,6% apresentaram tumores com padrões de expressão do KIT atípicos e que o risco de desenvolvimento de tumores com padrões do KIT atípicos foi 2,93 vezes superior nos animais com tumores de alto grau histológico comparado com o risco para animais com tumores de baixo grau histológico. Estes resultados estão em concordância com os reportados no estudo de Da Costa et al.(2007), no qual o aumento de marcação citoplasmática em vez de membranar do KIT foi relacionado com mastocitomas de alto grau. Estes resultados sugerem a possibilidade de existir um mecanismo patológico comum entre estes fatores no mastocitoma canino.

No presente estudo foram avaliados fatores influenciadores de prognóstico no mastocitoma cutâneo canino, através da associação das várias variáveis com a morte relacionada com o mastocitoma. Surgiram, assim, como bons indicadores influenciadores de prognóstico a idade no momento do diagnóstico e o grau histológico do tumor. Os animais com idade superior a 8 anos apresentaram maior percentagem de mortalidade relacionada com o mastocitoma ($p=0,01$), bem como os animais com tumores de alto grau histológico ($p=0,002$).

A maior percentagem de mortalidade relacionada com o mastocitoma nos animais mais velhos está de acordo com os resultados do estudo de Kiupel et al. (2005), que reportaram que cães mais velhos tinham maior risco de morte relacionada com o mastocitoma.

Com base no estudo que estabeleceu o sistema de dois níveis do grau histológico, um total de 90% dos cães com mastocitomas de alto grau morreu devido a doença associada ao mastocitoma, enquanto apenas 5% dos cães com mastocitoma de baixo grau morreu devido a doença associada ao mastocitoma (Kiupel et al., 2011). No nosso estudo os resultados obtidos são semelhantes uma vez que 63,6% dos cães com mastocitomas de alto grau morreu devido a doença associada ao mastocitoma e apenas 12,5% dos cães com mastocitoma de baixo grau morreu devido a doença associada ao mastocitoma.

Nos estudos prévios de Bostock (1973 e 1986), os *Boxers* apresentaram mastocitomas com um prognóstico mais favorável. O que também aconteceu no nosso estudo, no qual todos (100%) os animais de raça *Boxer* se encontravam vivos ou mortos por causas não relacionadas com o mastocitoma.

Os tumores nas regiões inguinal, prepucial e perineal (O'Keefe, 1990; Govier, 2003; Misdorp, 2004) estão frequentemente correlacionados com um pior prognóstico do que outras partes do corpo, apesar deste facto não ser suportado por todos os estudos (Cahalane et al., 2004; Sfiligoi et al., 2005). No presente estudo 71,4% dos animais com tumores com localização nas regiões escrotal/ prepucial/ inguinal/ perineal não morreu devido ao mastocitoma, no entanto, as diferenças observadas não foram estatisticamente significativas.

O risco de morte relacionada com o mastocitoma foi 2,41 vezes superior nos animais com tumores com padrões do KIT atípicos comparado com o risco para animais com tumores com padrão do KIT típico. Este resultado está de acordo com o anteriormente descrito por outros autores (Kiupel et al., 2004; Da Costa et al., 2007; Webster et al., 2007) que reportaram um prognóstico negativo associado a padrões de expressão aberrantes do KIT.

Na análise de sobrevivência efetuada foi utilizado, como medida temporal, o tempo de sobrevivência, descrito anteriormente. As variáveis que apresentaram impacto significativo no tempo de sobrevivência foram a idade no momento do diagnóstico, o grau histológico do tumor, o tratamento quimioterápico e o tratamento com IRTQ.

Na análise de sobrevivência de acordo com a idade, a mediana de tempo de sobrevivência foi de 862 dias para os cães com idade inferior ou igual a 8 no momento do diagnóstico e de 334 dias para os cães com idade superior a 8 no momento do diagnóstico ($p= 0.01$). Estes

resultados estão de acordo com os resultados do estudo de Kiupel et al. (2005), que reportaram que cães mais velhos tinham significativamente menores tempos de sobrevivência.

Na análise de sobrevivência de acordo com o grau histológico, a mediana de tempo de sobrevivência nos cães com mastocitomas de baixo grau histológico não foi alcançada. A mediana de tempo de sobrevivência foi de 421 dias (14 meses) para os cães com mastocitomas de alto grau histológico. Aos 365 dias a probabilidade de sobrevivência foi de 85,7% para os cães com mastocitomas de baixo grau histológico e 52,8% para os cães com mastocitomas de alto grau histológico ($p= 0.03$). Com base no estudo que estabeleceu o sistema de dois níveis para o grau histológico, a mediana de tempo de sobrevida é inferior a 4 meses para mastocitomas de alto grau, mas superior a 2 anos para mastocitomas de baixo grau (Kiupel et al., 2011). No presente estudo, foi obtida uma mediana de tempo de sobrevivência mais longa para mastocitomas de alto grau comparado com o estudo de Kiupel et al.(2011), o que se pode dever ao facto dos animais incluídos no seu estudo terem sido submetidos apenas a excisão cirúrgica como tratamento, contrariamente ao observado no presente estudo, onde 61,9 % dos animais foram submetidos a tratamento quimioterápico e 38,1% dos animais foram submetidos a tratamento com IRTQ. Contudo, a probabilidade de sobrevivência foi significativamente superior nos mastocitomas de baixo grau histológico, reafirmando o melhor prognóstico encontrado nestes tumores comparado com os tumores de alto grau histológico.

Na análise de sobrevivência de acordo com o tratamento quimioterápico, aos 365 dias a probabilidade de sobrevivência foi a seguinte: 100% para os canídeos com tratamento com vimblastina, 92,9% para canídeos sem tratamento quimioterápico, 51,3% para os canídeos com tratamento com ambos e 33,3% para os canídeos com tratamento com prednisolona. ($p= 0.02$).

O tratamento sistémico com fármacos antineoplásicos é mais apropriado para tumores de alto risco de desenvolvimento de metástases, como tumores de alto grau histológico com fatores de risco associados a menores tempos de sobrevivência como por exemplo altos índices de proliferação celular (Gieger et al., 2005; Dobson & Scase, 2007; Blackwood et al., 2012). Posto isto, a maior probabilidade de sobrevivência dos cães sem tratamento quimioterápico encontrada neste estudo poderá ser devida à associação estatisticamente significativa ($p=0,003$) entre o grau histológico e a quimioterapia, onde a probabilidade de realização de quimioterapia é 8,88 vezes superior nos animais com tumores de alto grau comparado com animais com tumores de baixo grau. Assim, a maioria dos animais sem tratamento quimioterápico têm mastocitomas de baixo grau histológico, e, conseqüentemente, melhores probabilidades de sobrevivência.

A comparação das restantes probabilidades de sobrevivência entre o tratamento com vimblastina, prednisolona ou ambos deverá ser feita com precaução, pois, sendo este um

estudo retrospectivo, os protocolos utilizados e o tipo de quimioterapia (adjuvante, neoadjuvante ou ambos) não foram os mesmos, além do número de animais por grupo ser muito heterogêneo.

Na análise de sobrevivência de acordo com o tratamento quimioterápico com IRTQ, aos 365 dias a probabilidade de sobrevivência foi de 71,4% para os cães sem tratamento com IRTQ, de 66,7% para os cães com tratamento com masitinib (Masivet®) e com tratamento com ambos os IRTQ, e de 25% para os cães com tratamento com toceranib (Palladia®) ($p=0.04$). Se as células neoplásicas de um mastocitoma cutâneo forem positivas para mutação ativa no exão 11 do *c-kit* ou apresentarem um padrão de expressão do KIT 2 ou 3 pode ser benéfica a inclusão de IRTQ no tratamento (Sledge et al., 2016). Assim, a maior probabilidade de sobrevivência dos canídeos sem tratamento com IRTQ encontrada neste estudo poderá ser devida à associação estatisticamente significativa ($p=0,025$) entre o grau histológico e o tratamento com IRTQ, onde a probabilidade de realização de tratamento com IRTQ é 5,22 vezes superior nos animais com tumores de alto grau comparado com animais com tumores de baixo grau. Além disso, a probabilidade de realização de tratamento com IRTQ é 2,25 vezes superior nos animais com tumores com padrões de expressão do KIT atípicos (2 e 3) comparado com animais com tumores com padrão de expressão do KIT típico (1). Logo, a maioria dos animais sem tratamento com IRTQ têm mastocitomas de baixo grau histológico e com padrão de expressão do KIT típico, e, conseqüentemente, melhores probabilidades de sobrevivência.

Neste estudo, foram obtidas melhores probabilidades de sobrevivência nos animais tratados com masitinib (Masivet®) ou com ambos os IRTQ em relação aos animais tratados com toceranib (Palladia®). Não foram encontrados estudos que comparem o tempo de sobrevivência entre animais com tratamento com diferentes IRTQ.

Foram reportadas diferenças associadas ao sexo no prognóstico de mastocitomas caninos, tendo as fêmeas melhores resultados do que os machos após tratamento com quimioterapia (Gerritsen et al., 1998) e os cães machos menores tempos de sobrevivência (Kiupel et al., 2005). Apesar das diferenças não serem estatisticamente significativas no presente estudo, foram igualmente encontradas melhores probabilidades de sobrevivência nas fêmeas do que nos machos, sendo a mediana de tempo de sobrevivência para as fêmeas 862 dias e para os machos 467 dias. Em mastocitomas caninos foram encontrados recetores de estrogênio e progesterona, o que pode explicar a diferença observada no tempo de sobrevivência entre fêmeas e machos, no entanto, não foi ainda possível esclarecer o papel exato dos recetores hormonais nos mastocitomas caninos (Kiupel et al., 2005).

Neste estudo, a multiplicidade do tumor não teve impacto significativo no tempo de sobrevivência, o que é um resultado comum a vários estudos (Murphy et al., 2006; Mullins et al., 2006), que reportaram não existirem diferenças na sobrevivência entre pacientes com mastocitomas solitários e aqueles com mastocitomas múltiplos do mesmo grau histológico.

Os mastocitomas com padrões de expressão do KIT 2 e 3, que representam localizações anormais da proteína KIT, estão associados à diminuição do tempo de sobrevivência em comparação com os mastocitomas com padrão de expressão 1 (Kiupel et al., 2004). Apesar das diferenças não serem estatisticamente significativas, foram igualmente encontradas no presente estudo melhores probabilidades de sobrevivência nos mastocitomas com padrão de expressão 1 do que nos mastocitomas com padrões de expressão 2 e 3, sendo que aos 300 dias a probabilidade de sobrevivência foi de 90% para os canídeos com mastocitomas com padrão 1, 71,4% para os canídeos com mastocitomas com padrão 2 e 62,7% para os canídeos com mastocitomas com padrão 3.

O principal objetivo deste estudo foi comparar os tempos de sobrevivência de animais com mastocitoma e diferentes padrões de expressão do KIT submetidos a tratamento com toceranib e/ou masitinib, com o intuito de selecionar o melhor IRTQ para cada padrão de expressão do KIT. Contudo, não foi possível obter resultados significativos e completamente comparativos devido à pequena amostra de animais submetidos a tratamento com IRTQ, na qual apenas 14,3% dos animais foram tratados com ambos os IRTQ, 14,3% com masitinib (Masivet®) e 9,5% com toceranib (Palladia®). Consequentemente quando os animais foram divididos pelos 3 grupos de padrões de expressão do KIT (1, 2 e 3) não foram obtidos dados suficientes para comparar os tempos de sobrevivência entre os 4 tratamentos possíveis: masitinib (Masivet®), toceranib (Palladia®), ambos ou nenhum; e nenhuma das diferenças encontradas foi estatisticamente significativa.

No grupo dos animais com padrão de expressão do KIT 3, onde foi possível realizar a comparação entre os 4 tratamentos instituídos, aos 365 dias a probabilidade de sobrevivência foi a seguinte: 70% para os canídeos sem tratamento com IRTQ, 66,7% para canídeos com tratamento com masitinib (Masivet®), 50% para os canídeos com tratamento com ambos os IRTQ e 25% para os canídeos com tratamento com toceranib (Palladia®). Mais uma vez, foram obtidas melhores probabilidades de sobrevivência nos animais tratados com masitinib (Masivet®) ou com ambos os IRTQ em relação aos animais tratados com toceranib (Palladia®). Necessariamente, a maioria dos animais sem tratamento com IRTQ têm mastocitomas de baixo grau histológico e com padrão de expressão do KIT típico, e consequentemente, melhores probabilidades de sobrevivência.

Não foram encontrados estudos que comparem o tempo de sobrevivência entre animais com tratamento com diferentes IRTQ e diferentes padrões de expressão do KIT.

5. Limitações do estudo

Uma das maiores limitações deste estudo foi o tamanho mais reduzido da amostra, o que se deveu principalmente à baixa frequência da realização da análise imunohistoquímica do KIT e, consequentemente, à baixa frequência de instituição de terapêutica com IRTQ. Os IRTQ

são fármacos bastante dispendiosos e, muitas vezes, sugeridos após várias tentativas de tratamento com cirurgia e quimioterapia, o que diminui a adesão à terapêutica por parte dos tutores. Além disso, os IRTQ apenas se utilizam quando existe doença ativa.

Outra das limitações deste estudo foi a falta de análise multivariada na avaliação dos fatores influenciadores do prognóstico e na análise de sobrevivência, como, por exemplo, a inclusão do grau histológico na avaliação da influência do padrão de expressão do KIT no prognóstico do mastocitoma canino.

É de notar o desequilíbrio observado entre o número de animais pertencentes aos diferentes grupos de cada variável, o que pode ter influenciado negativamente as associações estatísticas e a análise de sobrevivência.

No que toca à avaliação da resposta ao tratamento, os protocolos utilizados e o tipo de quimioterapia (adjuvante, neoadjuvante ou ambos) não foram os mesmos, além do número de animais por grupo ser muito heterogéneo.

Sendo um estudo retrospectivo, foi impossível mitigar a heterogeneidade da amostra no que toca às associações estatísticas e análise de sobrevivência, devendo estes resultados ser interpretados com olhar crítico e adaptá-los à realidade de cada caso clínico.

Após recolha e análise dos dados, foram descartadas várias variáveis por falta de informação e adequação desta informação aos critérios da revisão bibliográfica.

Neste estudo, não foi possível incluir o estadiamento clínico como variável devido à falta de análises citológicas ou histopatológicas para confirmação de metástases.

Com o objetivo de determinar e avaliar a resposta à terapêutica com os IRTQ, foi, inicialmente, considerada a avaliação dos seguintes critérios: remissão total, remissão parcial, doença estável, doença progressiva e intervalo livre de progressão. No entanto, não foi possível interpretar a informação das fichas clínicas de modo a caracterizar cada tipo de resposta de acordo com os critérios criados por Eisenhauer et al. (2008), sendo necessárias medições frequentes do(s) tumor(es) e análises histopatológicas de possíveis recidivas ou tumores *de novo*.

6. Conclusão e perspetivas futuras

Os mastocitomas são as neoplasias cutâneas mais comuns em cães representando cerca de 11 a 27% de todas as neoplasias cutâneas malignas (Macy, 1985). Devido à prevalência e comportamento biológico variável dos mastocitomas caninos, ao custo da terapêutica e ao potencial stress emocional para os tutores, é importante realizar um prognóstico preciso dos mastocitomas cutâneos e selecionar corretamente a abordagem terapêutica mais apropriada (Kiupel, 2016).

No presente estudo, a idade dos animais afetados variou entre os 9 meses e os 16 anos com média de 8,2 anos, não houve predisposição sexual e a distribuição dos mastocitomas por

raça foi bastante ampla, no entanto, foi encontrada uma maior frequência de tumores nas raças *Retriever do Labrador*, *Golden Retriever* e *Boxer*. As localizações mais frequentes do mastocitoma foram os membros (26,5%), seguindo-se as regiões escrotal/ prepucial/ perineal/ inguinal (20,6%) e o tronco (20,6%) e identificaram-se 17,1% de animais com múltiplos nódulos. De acordo com o sistema de gradação histológica de Kiupel et al. (2011), 42,9% dos tumores foram classificados com baixo grau e 54,8% com alto grau. Em relação ao padrão de expressão do KIT, 28,6% dos tumores foram identificados com padrão 1, 21,4% com padrão 2 e 50% com padrão 3

Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre as variáveis epidemiológicas e clínicas.

Na associação entre as variáveis epidemiológicas e clínicas e as variáveis histológicas, apenas a idade do animal mostrou associação significativa com o grau histológico ($p=0,0495$). Na associação do padrão de expressão do KIT com as restantes variáveis, a localização tumoral mostrou associação significativa com o padrão de expressão do KIT ($p=0,0271$). Além disso, o risco de desenvolvimento de tumores com padrões do KIT atípicos foi superior nos animais com idades superiores a 8 anos, nos animais com lesões múltiplas e nos animais com tumores de alto grau histológico.

Surgiram como bons indicadores influenciadores de prognóstico a idade no momento do diagnóstico ($p=0,01$) e o grau histológico do tumor ($p=0,002$). Os *Boxers* apresentaram mastocitomas com um prognóstico mais favorável e o risco de morte relacionada com o mastocitoma foi superior nos animais com tumores com padrões do KIT atípicos.

As variáveis que apresentaram impacto significativo no tempo de sobrevivência foram a idade no momento do diagnóstico, o grau histológico do tumor, o tratamento quimioterápico e o tratamento com IRTQ. Nesta última, os animais tratados com masitinib (Masivet®) ou com ambos os IRTQ tiveram melhores probabilidades de sobrevivência do que os tratados com toceranib (Palladia®). Foram, ainda, obtidas melhores probabilidades de sobrevivência nas fêmeas e nos mastocitomas com padrão de expressão 1, apesar das diferenças observadas não serem estatisticamente significativas.

Apesar dos resultados obtidos, o estudo teve algumas limitações, anteriormente referidas, nomeadamente no que diz respeito à dimensão da amostra. Assim sendo, seria interessante a realização de um estudo prospetivo, no sentido de reforçar as conclusões obtidas. Idealmente, o número de elementos constituintes da amostra deveria ser superior e equilibrado entre os diferentes grupos criados. Todos os animais deveriam apresentar as mesmas condições com o intuito de uniformizar a amostra.

No futuro, o estudo do melhor IRTQ para cada padrão de expressão do KIT deverá ser alvo de mais investigação por forma a auxiliar na tomada de decisões e orientação terapêutica.

BIBLIOGRAFIA

- Al-sarraf, R., Mauldin, G. N., Patnaik, A. K., & Meleo, K. A. (1996). A prospective study of Radiation Therapy for the treatment of grade 2 Mast Cell Tumours in 32 Dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 10(6), 376–378.
- Ayl, R. D., Couto, C. G., Hammer, A. S., Weisbrode, S., Ericson, J. G., & Mathes, L. (1992). Correlation of DNA Ploidy to Tumor Histologic Grade, Clinical Variables, and Survival in Dogs with Mast Cell Tumors. *Veterinary Pathology*, 29(5), 386–390.
- Bahrami, A. M., Khaki, F., Zehtabian, S., Cheraghi, J., Rashnavadi, M., Ahmadi, M. R. H., Naderafif, M., Javaherypour, S., Mohsenzadeh, S., Hosseini, E., Masoudi, H., Pourzaer, M. (2014). Uterine mast cell tumor: A clinical and cytohistopathological study. *Journal of Ovarian Research*, 7(1), 1–6.
- Baker-Gabb, M., Hunt, G. B., & France, M. P. (2003). Soft tissue sarcomas and mast cell tumours in dogs; clinical behaviour and response to surgery. *Australian Veterinary Journal*, 81(12), 732–738.
- Barsotti, G., Marchetti, V., & Abramo, F. (2007). Primary conjunctival mast cell tumor in a Labrador Retriever. *Veterinary Ophthalmology*, 10(1), 60–64.
- Beaumont, P. R., O'Brien, J. B., Allen, H. L., & Tucker, J. a. (1979). Mast cell sarcoma of the larynx in a dog: a case report. *The Journal of Small Animal Practice*, 20(1), 19–25.
- Beaven, M. A. (2009). Our perception of the mast cell from Paul Ehrlich to now. *European Journal of Immunology*, 39(1), 11–25.
- Blackwood, L., Murphy, S., Buracco, P., De Vos, J. P., De Fornel-Thibaud, P., Hirschberger, J., Kessler, M., Pastor, J., Ponce, F., Savary-Bataille, K., Argyle, D. J. (2012). European consensus document on mast cell tumours in dogs and cats. *Veterinary and Comparative Oncology*, 10(3), 1–29.
- Book, A. P., Fidel, J., Wills, T., Bryan, J., Sellon, R., & Mattoon, J. (2011). Correlation of ultrasound findings, liver and spleen cytology, and prognosis in the clinical staging of high metastatic risk canine mast cell tumors. *Veterinary Radiology and Ultrasound*, 52(5), 548–554.
- Bostock, D. E. (1973). The prognosis following surgical removal of mastocytomas in dogs. *The Journal of Small Animal Practice*, 14(1), 27–41.
- Bostock, D. E. (1986). Neoplasms of the skin and subcutaneous tissues in dogs and cats. *British Veterinary Journal*, 142(1), 1–19.
- Bostock, D. E., Crocker, J., Harris, K., & Smith, P. (1989). Nucleolar organiser regions as indicators of post-surgical prognosis in canine spontaneous mast cell tumours. *British Journal of Cancer*, 59(6), 915–918.
- Bowles, C. A., Kerber, W. T., Rangan, S. R. S., Kwapien, R., Woods, W., & Jensen, E. M. (1972). Characterization of a Transplantable, Canine, Immature Mast Cell Tumor. *Cancer Research*, 32(July), 1434–1441.
- Bradding, P., & Holgate, S. T. (1999). Immunopathology and human mast cell cytokines. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 31(2), 119–133.

- Cahalane, A. K., Payne, S., Barber, L. G., Duda, L. E., Henry, C. J., Mauldin, G. E., Frimberger, A. E., Cotter, S. M., Moore, A. S. (2004). Prognostic factors for survival of dogs with inguinal and perineal mast cell tumors treated surgically with or without adjunctive treatment: 68 cases (1994-2002). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 225(3), 401–408.
- Camps-Palau, M. A., Leibman, N. F., Elmslie, R., Lana, S. E., Plaza, S., McKnight, J. A., Risbon, R., Bergman, P. J. (2007). Treatment of canine mast cell tumours with vinblastine, cyclophosphamide and prednisone: 35 cases (1997-2004). *Veterinary and Comparative Oncology*, 5(3), 156–167.
- Camus, M. S., Priest, H. L., Koehler, J. W., Driskell, E. A., Rakich, P. M., Ilha, M. R., & Krimer, P. M. (2016). Cytologic Criteria for Mast Cell Tumor Grading in Dogs With Evaluation of Clinical Outcome. *Veterinary Pathology*, 53(6), 1117–1123.
- Caughey, G. H., Lazarus, S. C., Viro, N. F., Gold, W. M., & Nadal, J. A. (1988). Tryptase and chymase: comparison of extraction and release in two dog mastocytoma lines. *Immunology*, 63, 339–344.
- Chaffin, K., & Thrall, D. E. (2002). Results of radiation therapy in 19 dogs with cutaneous mast cell tumor and regional lymph node metastasis. *Veterinary Radiology and Ultrasound*, 43(4), 392–395.
- Cohen, D., Reif, J. S., Brodey, R. S., & Keiser, H. (1974). Epidemiological Analysis of the Most Prevalent Sites and Types of Canine Neoplasia Observed in a Veterinary Hospital. *Cancer Research*, 34(11), 2859–2868.
- Cooper, M., Tsai, X. R., & Bennett, P. (2009). Combination CCNU and vinblastine chemotherapy for canine mast cell tumours: 57 cases. *Veterinary and Comparative Oncology*, 7(3), 196–206.
- Da Costa, R. M. G., Matos, E., Rema, A., Lopes, C., Pires, M. A., & Gärtner, F. (2007). CD117 immunoexpression in canine mast cell tumours: Correlations with pathological variables and proliferation markers. *BMC Veterinary Research*, 3(19).
- de Paulis, A., Minopoli, G., Arbustini, E., de Crescenzo, G., Dal Piaz, F., Pucci, P., Russo, T., Marone, G. (1999). Stem cell factor is localized in, released from, and cleaved by human mast cells. *Journal of Immunology*, 163(5), 2799–2808.
- Dobson, J., Cohen, S., & Gould, S. (2004). Treatment of canine mast cell tumours with prednisolone and radiotherapy. *Veterinary and Comparative Oncology*, 2(3), 132–141.
- Dobson, J. M., & Scase, T. J. (2007). Advances in the diagnosis and management of cutaneous mast cell tumours in dogs. *Journal of Small Animal Practice*, 48(8), 424–431.
- Donnelly, L., Mullin, C., Balko, J., Goldschmidt, M., Krick, E., Hume, C., Brown, D. C., Sorenmo, K. (2013). Evaluation of histological grade and histologically tumour-free margins as predictors of local recurrence in completely excised canine mast cell tumours. *Veterinary and Comparative Oncology*, 13(1), 70–76.
- Downing, S., Chien, M. B., Kass, P. H., Moore, P. F., & London, C. A. (2002). Prevalence and importance of internal tandem duplications in exons 11 and 12 of *c-kit* in mast cell tumors of dogs. *American Journal of Veterinary Research*, 63(12), 1718–1723.

- Dubreuil, P., Letard, S., Ciufolini, M., Gros, L., Humbert, M., Castéran, N., Borge, L., Hajem, B., Lermet, A., Sippl, W., Voisset, E., Arock, M., Auclair, C., Leventhal, P. S., Mansfield, C. D., Moussy, A., Hermine, O. (2009). Masitinib (AB1010), a potent and selective tyrosine kinase inhibitor targeting KIT. *PLoS ONE*, 4(9), 1–12.
- Eisenhauer, E. A., Therasse, P., Bogaerts, J., Schwartz, L. H., Sargent, D., Ford, R., Dancey, J., Arbuck, S., Gwyther, S., Mooney, M., Rubinstein, L., Shankar, L., Dodd, L. (2008). New response evaluation criteria in solid tumours : Revised RECIST guideline (version 1.1). *European Journal of Cancer*, 45(2), 228–247.
- Elliott, J. W., Cripps, P., Blackwood, L., Berlato, D., Murphy, S., & Grant, I. A. (2016). Canine oral mucosal mast cell tumours. *Veterinary and Comparative Oncology*, 14(1), 101–111.
- Elston, L. B., Sueiro, F. A. R., Cavalcanti, J. N., & Metze, K. (2009). The Importance of the Mitotic Index as a Prognostic Factor for Survival of Canine Cutaneous Mast Cell Tumors: A Validation Study. *Veterinary Pathology*, 46, 362–365.
- Endicott, M. M., Charney, S. C., McKnight, J. A., Loar, A. S., Barger, A. M., & Bergman, P. J. (2007). Clinicopathological findings and results of bone marrow aspiration in dogs with cutaneous mast cell tumours : 157 cases (1999 – 2002). *Veterinary and Comparative Oncology*, 5(1), 31–37.
- European Medicines Agency (2013). *Product information of masivet*. Acedido em Julho 5, 2018. Disponível em http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_information/veterinary/000128/WC500064717.pdf
- European Medicines Agency (2017). *Product information of palladia*. Acedido em Julho 5, 2018. Disponível em http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_information/veterinary/000150/WC500060745.pdf
- Fife, M., Blocker, T., Fife, T., Dubielzig, R. R., & Dunn, K. (2011). Canine conjunctival mast cell tumors: A retrospective study. *Veterinary Ophthalmology*, 14(3), 153–160.
- Finnie, j w, & Bostock, d e. (1979). skin neoplasia in dogs. *Australian Veterinary Journal*, 55, 602–604.
- Fox, L. E., Rosenthal, R. C., Twedt, D. C., Dubielzig, R. R., MacEwen, E. G., & Grauer, G. F. (1990). Plasma Histamine and Gastrin Concentrations in 17 Dogs With Mast Cell Tumors. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 4(5), 242–246.
- Fulcher, R. P., Ludwig, L. L., Bergman, P. J., Newman, S. J., Simpson, A. M., & Patnaik, A. K. (2006). Evaluation of a two-centimeter lateral surgical margin for excision of grade I and grade II cutaneous mast cell tumors in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 228(2), 210–215.
- Galli, S. J., Kalesnikoff, J., Grimbaldston, M. A., Piliponsky, A. M., Williams, C. M. M., & Tsai, M. (2005). Mast cells as “tunable” effector and immunoregulatory cells: Recent Advances. *Annual Review of Immunology*, 23(1), 749–786.
- Garrett, L. D. (2014). Canine mast cell tumors : diagnosis , treatment , and prognosis. *Veterinary Medicine: Research and Reports*, 5, 49–58.
- Gerritsen, R. J., Teske, E., Kraus, J. S., & Rutteman, G. R. (1998). Multi-agent chemotherapy for mast cell tumours in the dog. *Veterinary Quarterly*, 20(1), 28–31.

- Gieger, T. L., Théon, A. P., Werner, J. A., McEntee, M. C., Rassnick, K. M., & DeCock, H. E. V. (2003). Biologic behavior and prognostic factors for mast cell tumors of the canine muzzle: 24 Cases (1990-2001). *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 17(5), 687–692.
- Gieger, T., Northrup, N., & Wall, M. (2005). Clinical management of Mast Cell Tumors in dogs. *Compendium*, 27(1), 56–69.
- Gilfillan, A. M., Austin, S. J., & Metcalfe, D. D. (2011). Mast Cell Biology: Introduction and overview. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 716, 2–12.
- Ginn, P. E., Fox, L. E., Brower, J. C., Gaskin, A., Kurzman, I. D., & Kubilis, P. S. (2000). Immunohistochemical Detection of p53 Tumor-Suppressor Protein is a Poor Indicator of Prognosis for Canine Cutaneous Mast Cell Tumors. *Veterinary Pathology*, 37(1), 33–39.
- Ginn, P. E., Mansell, J. E., & Rakich, P. M. (2007). Mast cell tumours. In *Pathology of Domestic Animals* (pp. 771–773).
- Govier, S. M. (2003). Principles of treatment for mast cell tumors. *Clinical Techniques in Small Animal Practice*, 18(2), 103–106.
- Grant, J., North, S., & Lanore, D. (2016). Clinical response of masitinib mesylate in the treatment of canine macroscopic mast cell tumours. *Journal of Small Animal Practice*, 57(6), 283–290.
- Hahn, K. A., Legendre, A. M., Shaw, N. G., Phillips, B., Ogilvie, G. K., Prescott, D. M., Atwater, S. W., Carreras, J. K., Lana, S. E., Ladue, T., Rusk, A., Kinet, J. P., Dubreuil, P., Moussy, A., Hermine, O. (2010). Evaluation of 12- and 24-month survival rates after treatment with masitinib in dogs with nonresectable mast cell tumors. *American Journal of Veterinary Research*, 71(11), 1354–1361.
- Hahn, K. a, Ogilvie, G., Oglivie, G., Rusk, T., Devauchelle, P., Leblanc, A., Legendre, A., Powers, B., Leventhal, P. S., Kinet, J. P., Palmerini, F., Dubreuil, P., Moussy, A., Hermine, O. (2008). Masitinib is safe and effective for the treatment of canine mast cell tumors. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 22(6), 1301–1309.
- Hayes, A., Adams, V., Smith, K., Maglennon, G., & Murphy, S. (2007). Vinblastine and prednisolone chemotherapy for surgically excised grade III canine cutaneous mast cell tumours. *Veterinary and Comparative Oncology*, 5(3), 168–176.
- Helander, H., & Bloom, G. (1974). Quantitative analysis of mast cell structure. *Journal of Microscopy*, 100(3), 315–321.
- Hill, P. B., & Martin, R. J. (1998). A review of mast cell biology. *Veterinary Dermatology*, 9, 145–166.
- Hillman, L. a, Garrett, L. D., de Lorimier, L.-P., Charney, S. C., Borst, L. B., & Fan, T. M. (2010). Biological behavior of oral and perioral mast cell tumors in dogs: 44 cases (1996-2006). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 237(8), 936–942.
- Horny, H. P., Greschniok, A., Jordan, J. H., Menke, D. M., & Valent, P. (2003). Chymase expressing bone marrow mast cells in mastocytosis and myelodysplastic syndromes: An immunohistochemical and morphometric study. *Journal of Clinical Pathology*, 56(2), 103–106.

- Hottendorf, G. H., & Nielsen, S. W. (1967). Pathologic Survey of 300 Extirpated Canine Mastocytomas. *Zentralbl Veterinarmed a*, 14(3), 272–281.
- Howard, E. B., Sawa, T. R., Nielsen, S., & Kenyon, A. J. (1969). Mastocytoma and Gastroduodenal Ulceration. Gastric and duodenal ulcers in Dogs with mastocytoma. *Veterinary Pathology*, 6, 146–158.
- Ishiguro, T., Kadosawa, T., Takagi, S., Kim, G., Ohsaki, T., Bosnakovski, D., Okumura, M., Fujinaga, T. (2003). Relationship of Disease Progression and Plasma Histamine Concentrations in 11 Dogs with Mast Cell Tumors. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 17(2), 194–198.
- Iwata, N., Ochiai, K., Kadosawa, T., Takiguchi, M., & Umemura, T. (2000). Canine extracutaneous mast-cell tumours consisting of connective tissue mast cells. *Journal of Comparative Pathology*, 123(4), 306–310.
- Jaffe, M. H., Hosgood, G., Taylor, H. W., Kerwin, S. C., Hedlund, C. S., Lopez, M. K., Davidson, J. R., Miller, D. M., Paranjpe, M. (2000). Immunohistochemical and clinical evaluation of p53 in canine cutaneous mast cell tumors. *Veterinary Pathology*, 37(1), 40–46.
- Kirshenbaum, a S., Goff, J. P., Semere, T., Foster, B., Scott, L. M., & Metcalfe, D. D. (1999). Demonstration that human mast cells arise from a progenitor cell population that is CD34(+), *c-kit*(+), and expresses aminopeptidase N (CD13). *Blood*, 94(7), 2333–2342.
- Kitayama, H., Tsujimura, T., Matsumura, I., Oritani, K., Ikeda, H., Ishikawa, J., Okabe, M., Susuki, M., Yamamura, K., Matsuzawa, Y., Kitamura, Y., Kanakura, Y. (1996). Neoplastic transformation of normal hematopoietic cells by constitutively activating mutations of *c-kit* receptor tyrosine kinase. *Blood*, 88(3), 995–1004.
- Kiupel, M., Webster, J. D., Kaneene, J. B., Miller, R., & Yuzbasiyan-Gurkan, V. (2004). The use of KIT and tryptase expression patterns as prognostic tools for canine cutaneous mast cell tumors. *Veterinary Pathology*, 41(4), 371–377.
- Kiupel, M., Webster, J. D., Miller, R. A., & Kaneene, J. B. (2005). Impact of tumour depth, tumour location and multiple synchronous masses on the prognosis of canine cutaneous mast cell tumours. *Journal of Veterinary Medicine Series A: Physiology Pathology Clinical Medicine*, 52(6), 280–286.
- Kiupel, M., Webster, J. D., Bailey, K. L., Best, S., DeLay, J., Detrisac, C. J., Detrisac, C. J., Fitzgerald, S. D., Gamble, D., Ginn, P. E., Goldschmidt, M. H., Hendrick, M. J., Howerth, E. W., Janovitz, E. B., Langohr, I., Lenz, S. D., Lipscomb, T. P., Miller, M. A., Misdorp, W., Moroff, S., Mullaney, T. P., Neyens, I., O'Toole, D., Ramos-Vara, J., Scase, T. J., Schulman, F. Y., Sledge, D., Smedley, R. C., Smith, K., Snyder, P. W., Southorn, E., Stedman, N. L., Steficek, B. A., Stromberg, P. C., Valli, V. E., Weisbrode, S. E., Yager, J., Heller, J. Miller, R. (2011). Proposal of a 2-tier histologic grading system for canine cutaneous mast cell tumors to more accurately predict biological behavior. *Veterinary Pathology*, 48(1), 147–155.
- Kiupel, M. (2016). Mast cell tumors. In *Tumors in domestic animals* (pp. 176–202).
- Kleinschmidt, S., Meneses, F., Nolte, I., & Hewicker-Trautwein, M. (2008). Distribution of mast cell subtypes and immune cell populations in canine intestines: Evidence for age-related decline in T cells and macrophages and increase of IgA-positive plasma cells. *Research in Veterinary Science*, 84(1), 41–48.

- Krick, E. L., Billings, A. P., Shofer, F. S., Watanabe, S., & Sorenmo, K. U. (2009). Cytological lymph node evaluation in dogs with mast cell tumours: Association with grade and survival. *Veterinary and Comparative Oncology*, 7(2), 130–138.
- Krystel-Whittemore, M., Dileepan, K. N., & Wood, J. G. (2016). Mast cell: A multi-functional master cell. *Frontiers in Immunology*, 6, 1–12.
- Kube, P., Audigé, L., Küther, K., & Welle, M. (1998). Distribution, density and heterogeneity of canine mast cells and influence of fixation techniques. *Histochemistry and Cell Biology*, 110(2), 129–135.
- LaDue, T., Price, G. S., Dodge, R., Page, R. L., & Thrall, D. E. (1998). Radiation Therapy for Incompletely Resected Canine Mast Cell Tumors. *Veterinary Radiology and Ultrasound*, 39(1), 57–62.
- Lejeune, A., Skorupski, K., Frazier, S., Vanhaezebrouck, I., Rebhun, R. B., Reilly, C. M., & Rodriguez Jr, C. O. (2015). Aggressive local therapy combined with systemic chemotherapy provides long-term control in grade II stage 2 canine mast cell tumour: 21 cases (1999–2012). *Veterinary and Comparative Oncology*, 13(3), 267–280.
- Lennartsson, J., Jelacic, T., Linnekin, D., & Shivakrupa, R. (2005). Normal and Oncogenic Forms of the Receptor Tyrosine Kinase KIT. *Stem Cells*, 23(1), 16–43.
- Letard, S., Yang, Y., Hanssens, K., Palmerini, F., Leventhal, P. S., Guery, S., Moussy, A., Kinet, J. P., Hermine, O., Dubreuil, P. (2008). Gain-of-Function Mutations in the Extracellular Domain of KIT Are Common in Canine Mast Cell Tumors. *Molecular Cancer Research*, 6(7), 1137–1145.
- Liao, A. T., Chien, M. B., Shenoy, N., Mendel, D. B., McMahon, G., Cherrington, J. M., & London, C. A. (2002). Inhibition of constitutively active forms of mutant KIT by multitargeted indolinone tyrosine kinase inhibitors. *Blood*, 100(2), 585–593.
- Lombard, L. S., Moloney, J. B., & Rickard, C. G. (1963). Transmissible Canine Mastocytoma. *Annals New York Academy of Sciences*, 108, 1086–1105.
- London, C. A., Kisseberth, W. C., Galli, S. J., Geissler, E. N., & Helfand, S. C. (1996). Expression of stem cell factor receptor (*c-kit*) by the malignant mast cells from spontaneous canine mast cell tumours. *Journal of Comparative Pathology*, 115(4), 399–414.
- London, C. A., Galli, S. J., Yuuki, T., Hu, Z. Q., Helfand, S. C., & Geissler, E. N. (1999). Spontaneous canine mast cell tumors express tandem duplications in the proto-oncogene *c-kit*. *Experimental Hematology*, 27(4), 689–697.
- London, C. A. (2008). Management of Canine Mast Cell Tumors. In *Proceeding of the SEVC Southern European Veterinary Conference* (pp. 1–10).
- London, C. A., Malpas, P. B., Wood-Follis, S. L., Boucher, J. F., Rusk, A. W., Rosenberg, M. P., Henry, Carolyn J., Mitchener, K. L., Klein, M. K., Hintermeister, J. G., Bergman, P. J., Couto, G. C., Mauldin, G. N., Michels, G. M. (2009). Multi-center, placebo-controlled, double-blind, randomized study of oral toceranib phosphate (SU11654), a receptor tyrosine kinase inhibitor, for the treatment of dogs with recurrent (either local or distant) mast cell tumor following surgical excision. *Clinical Cancer Research*, 15(11), 3856–3865.
- Longley, J., Duffy, T. P., & Kohn, S. (1995). The mast cell and mast cell disease. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 32(4), 545–561.

- Ma, Y., Longley, B. J., Wang, X., Blount, J. L., Langley, K., & Caughey, G. H. (1999). Clustering of activating mutations in *c-kit*'s juxtamembrane coding region in canine mast cell neoplasms. *Journal of Investigative Dermatology*, 112(2), 165–170.
- Macy, D. W. (1985). Canine mast cell tumors. *The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice*, 15(4), 783–803.
- Maglennon, G. A., Murphy, S., Adams, V., Miller, J., Smith, K., Blunden, A., & Scase, T. J. (2008). Association of Ki67 index with prognosis for intermediate-grade canine cutaneous mast cell tumours. *Veterinary and Comparative Oncology*, 6(4), 268–274.
- Maltby, S., Khazaie, K., & McNagny, K. M. (2010). Mast Cells in Tumor Growth: Angiogenesis, Tissue Remodeling and Immune-modulation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1796(1), 19–26.
- Marconato, L., Bettini, G., Giacoboni, C., Romanelli, G., Cesari, A., Zatelli, A., & Zini, E. (2008). Clinicopathological features and outcome for dogs with mast cell tumors and bone marrow involvement. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 22, 1001–1007.
- Mccaw, D. L., Miller, M. A., Ogilvie, G. K., Withrow, S. J., Brewer Jr, W. G., Klein, M. K., Bell, F. W., Anderson, S. K. (1994). Response of Canine Mast Cell Tumors to Treatment With Oral Prednisone. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 8(6), 406–408.
- McManus, P. M. (1999). Frequency and severity of mastocytemia in dogs with and without mast cell tumours: 120 cases (1995-1997). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 215(3), 355-357. Acedido em Julho 5, 2018. Disponível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10434973>
- Miller, D. M. (1995). The occurrence of mast cell tumors in young Shar-Peis. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 7(3), 360–363.
- Misdorp, W. (2004). Mast cells and canine mast cell tumours. A review. *Veterinary Quarterly*, 26(4), 156–169.
- Moore, T. W., Bentley, R. T., Moore, S. A., Provencher, M., Warry, E. E., Kohnken, R., & Heng, H. G. (2016). Spinal Mast Cell Tumors in Dogs: Imaging Features and Clinical Outcome of Four Cases. *Veterinary Radiology and Ultrasound*, 58(1), 44–52.
- Morini, M., Bettini, G., Preziosi, R., & Mandrioli, L. (2004). *C-KIT* gene product (CD117) immunoreactivity in canine and feline paraffin sections. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 52(5), 705–708.
- Morris, J., & Dobson, J. (2008). *Small Animal Oncology. Small Animal Oncology*.
- Mullins, M. N., Dernell, W. S., Withrow, S. J., Ehrhart, E. J., Thamm, D. H., & Lana, S. E. (2006). Evaluation of prognostic factors associated with outcome in dogs with multiple cutaneous mast cell tumors treated with surgery with and without adjuvant treatment: 54 cases (1998-2004). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 228(1), 91–95.
- Murphy, S., Sparkes, A. H., Smith, K. C., Blunden, A. S., & Brearley, M. J. (2004). Relationships between the histological grade of cutaneous mast cell tumours in dogs, their survival and the efficacy of surgical resection. *Veterinary Record*, 154(24), 743–746.

- Murphy, S., Sparkes, A. H., Blunden, A. S., Brearley, M. J., & Smith, K. C. (2006). Effects of stage and number of tumours on prognosis of dogs with cutaneous mast cell tumours. *The Veterinary Record*, 158(9), 287–291.
- Naganobu, K., Ogawa, H., Uchida, K., Yamaguchi, R., Ohashi, F., Kubo, K., Aoki, M., Kuwamura, M., Ogawa, Y., Matsuyama, K. (2000). Mast Cell Tumour in the Nasal Cavity of a Dog. *Journal of Veterinary Medical Science*.
- Nasir, L., Rutteman, G. R., Reid, S. W. J., Schulze, C., & Argyle, D. J. (2001). Analysis of p53 mutational events and MDM2 amplification in canine soft-tissue sarcomas. *Cancer Letters*, 174(1), 83–89.
- Newman, S. J., Mrkonjich, L., Walker, K. K., & Rohrbach, B. W. (2007). Canine Subcutaneous Mast Cell Tumour: Diagnosis and Prognosis. *Journal of Comparative Pathology*, 136(4), 231–239.
- Noli, C., & Miolo, A. (2001). The mast cell in wound healing. *Veterinary Dermatology*, 12(6), 303–313.
- Northrup, N. C., Harmon, B. G., Gieger, T. L., Brown, C. A., Carmichael, K. P., Garcia, A., Latimer, K. S., Munday, J. S., Rakich, P. M., Richey, L. J., Stedman, N. L., Cheng, A. L., Howerth, E. W. (2005). Variation among pathologists in histologic grading of canine cutaneous mast cell tumors. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 17(3), 245–248.
- Northrup, N. C., Howerth, E. W., Harmon, B. G., Brown, C. A., Carmicheal, K. P., Garcia, A. P., Latimer, K. S., Munday, J. S., Rakich, P. M., Richey, L. J., Stedman, N. L., Gieger, T. L. (2005). Variation among pathologists in the histologic grading of canine cutaneous mast cell tumors with uniform use of a single grading reference. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 17(6), 561–564.
- Noviana, D., Mamba, K., Makimura, S., & Horii, Y. (2004). Distribution, histochemical and enzyme histochemical characterization of mast cells in dogs. *Journal of Molecular Histology*, 35(2), 123–132.
- O’Keefe, D. A., Couto, C. G., Burke-Schwartz, C., & Jacobs, R. M. (1987). Systemic Mastocytosis in 16 Dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 1(2), 75–80.
- O’Keefe, D. A. (1990). Canine mast cell tumors. *The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice*, 20(4), 1105–1115.
- Ozaki, K., Yamagami, T., Nomura, K., & Narama, I. (2002). Mast Cell Tumors of the Gastrointestinal Tract in 39 Dogs. *Veterinary Pathology*, 39(5), 557–564.
- Owen, L. N., World Health Organization. Veterinary Public Health Unit & WHO Collaborating Center for Comparative Oncology (1980). TMN Classification of Tumors in Domestic Animals/ edited by L. N. Owen. Geneva : World Health Organization.
- Patnaik, A. K., Macewen, E. G., Black, A. P., & Luckow, S. (1982). Extracutaneous Mast-Cell Tumor in the Dog. *Veterinary Pathology*, 19(6), 608–615.
- Patnaik, A. K., Ehler, W. J., & MacEwen, E. G. (1984). Canine Cutaneous Mast Cell Tumor: Morphologic Grading and Survival Time in 83 Dogs. *Veterinary Pathology*, 21(5), 469–474.

- Poirier, V. J., Adams, W. M., Forrest, L. J., Green, E. M., Dubielzig, R. R., & Vail, D. M. (2006). Radiation therapy for incompletely excised grade II canine mast cell tumors. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 42(6), 430–434.
- Pratschke, K. M., Atherton, M. J., Sillito, J. a, & Lamm, C. G. (2013). Evaluation of a modified proportional margins approach for surgical resection of mast cell tumors in dogs: 40 cases (2008–2012). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 243(10), 12–14.
- Pryer, N. K., Lee, L. B., Zadovaskaya, R., Yu, X., Sukbuntherng, J., Cherrington, J. M., & London, C. A. (2003). Proof of Target for SU11654: Inhibition of KIT Phosphorylation in Canine Mast Cell Tumors. *Clinical Cancer Research*, 9(15), 5729–5734.
- Puxeddu, I., Piliponsky, A. M., Bachelet, I., & Levi-Schaffer, F. (2003). Mast cells in allergy and beyond. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 35(12), 1601–1607.
- Rassnick, K. M., Moore, A. S., Williams, L. E., London, C. A., Kintzer, P. P., Engler, S. J., & Cotter, S. M. (1999). Treatment of canine mast cell tumors with CCNU (lomustine). *Journal of Veterinary Internal Medicine / American College of Veterinary Internal Medicine*, 13(6), 601–605.
- Rassnick, K. M., Al-Sarraf, R., Bailey, D. B., Chretien, J. D., Phillips, B., & Zwhalen, C. H. (2010). Phase II open-label study of single-agent hydroxyurea for treatment of mast cell tumours in dogs. *Veterinary and Comparative Oncology*, 8(2), 103–111.
- Rassnick, K. M., Bailey, D. B., Russell, D. S., Flory, A. B., Kiselow, M. A., Intile, J. L., Malone, E. K., Balkman, C. E., Barnard, S. M. (2010). A phase II study to evaluate the toxicity and efficacy of alternating CCNU and high-dose vinblastine and prednisone (CVP) for treatment of dogs with high-grade, metastatic or nonresectable mast cell tumours. *Veterinary and Comparative Oncology*, 8(2), 138–152.
- Ribatti, D., & Crivellato, E. (2012). Mast cells, angiogenesis, and tumour growth. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1822(1), 2–8.
- Riva, F., Brizzola, S., Stefanello, D., Crema, S., & Turin, L. (2005). A study of mutations in the *c-kit* gene of 32 dogs with mastocytoma. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 17(4), 385–388.
- Robat, C., London, C., Bunting, L., McCartan, L., Stingle, N., Selting, K., Kurzman, I., Vail, D. M. (2011). Safety evaluation of combination vinblastine and toceranib phosphate (Palladia®) in dogs: A phase I dose-finding study. *Veterinary and Comparative Oncology*, 10(3), 174–183.
- Rogers, K. S. (1996). Mast cell tumors. Dilemmas of diagnosis and treatment. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*, 26(1), 87–102.
- Romansik, E. M., Reilly, C. M., Kass, P. H., Moore, P. F., & London, C. A. (2007). Mitotic index is predictive for survival for canine cutaneous mast cell tumors. *Veterinary Pathology*, 44(3), 335–341.
- Roskoski, R. (2005). Structure and regulation of KIT protein-tyrosine kinase - The stem cell factor receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 338(3), 1307–1315.
- Rothwell, T. L., Howlett, C. R., Middleton, D. J., Griffiths, D. A., & Duff, B. C. (1987). Skin neoplasms of dogs in Sydney. *Australian Veterinary Journal*, 64(6), 161–164.

- Sabattini, S., Scarpa, F., Berlato, D., & Bettini, G. (2015). Histologic Grading of Canine Mast Cell Tumor: Is 2 Better Than 3? *Veterinary Pathology*, 52(1), 70–73.
- Sato, A. F., & Solano, M. (2004). Ultrasonographic findings in abdominal mast cell disease: A retrospective study of 19 patients. *Veterinary Radiology and Ultrasound*, 45(1), 51–57.
- Scarpa, F., Sabattini, S., Marconato, L., Capitani, O., Morini, M., & Bettini, G. (2012). Use of histologic margin evaluation to predict recurrence of cutaneous malignant tumors in dogs and cats after surgical excision. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 240(10), 1181–1187.
- Scase, T. J., Edwards, D., Miller, J., Henley, W., Smith, K., Blunden, A., & Murphy, S. (2006). Canine mast cell tumors: Correlation of apoptosis and proliferation markers with prognosis. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 20(1), 151–158.
- Schultheiss, P. C., Gardiner, D. W., Rao, S., Olea-Popelka, F., & Tuohy, J. L. (2011). Association of histologic tumor characteristics and size of surgical margins with clinical outcome after surgical removal of cutaneous MCTs in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 238(11), 1464–1469.
- Séguin, B., Leibman, N. F., Bregazzi, V. S., Ogilvie, G. K., Powers, B. E., Dernell, W. S., Fettman, M. J., Withrow, S. J. (2001). Clinical outcome of dogs with grade-II mast cell tumors treated with surgery alone: 55 cases (1996-1999). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 218(7), 1120–1123.
- Séguin, B., Besancon, M. F., McCallan, J. L., Dewe, L. L., Tenwolde, M. C., Wong, E. K., & Kent, M. S. (2006). Recurrence rate, clinical outcome, and cellular proliferation indices as prognostic indicators after incomplete surgical excision of cutaneous grade II mast cell tumors: 28 Dogs (1994-2002). *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 20(4), 933–940.
- Sfiligoi, G., Rassnick, K. M., Scarlett, J. M., Northrup, N. C., & Gieger, T. L. (2005). Outcome of dogs with mast cell tumors in the inguinal or perineal region versus other cutaneous locations: 124 cases (1990-2001). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 226(8), 1368–1374.
- Shelly, S. M. (2003). Cutaneous lesions. *The Veterinary Clinics of Small Animal Practice*, 33(1), 1–46.
- Shoop, S. J., Marlow, S., Church, D. B., English, K., McGreevy, P. D., Stell, A. J., Thomson, P. C., O'Neill, D. G., Brodbelt, D. C. (2015). Prevalence and risk factors for mast cell tumours in dogs in England. *Canine Genetics and Epidemiology*, 2(1), 1–10.
- Simoes, J. P. C., Schoning, P., & Butine, M. (1994). Prognosis of Canine Mast Cell Tumors: A Comparison of Three Methods. *Veterinary Pathology*, 31, 637–647.
- Simpson, A. M., Ludwig, L. L., Newman, S. J., Bergman, P. J., Hottinger, H. a, & Patnaik, A. K. (2004). Evaluation of surgical margins required for complete excision of cutaneous mast cell tumors in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 224(2), 236–240.
- Sledge, D. G., Webster, J., & Kiupel, M. (2016). Canine cutaneous mast cell tumors: A combined clinical and pathologic approach to diagnosis, prognosis, and treatment selection. *The Veterinary Journal*, 215, 43–54.

- Smith, J., Kiupel, M., Farrelly, J., Cohen, R., Olmsted, G., Kirpensteijn, J., Brocks, B., Post, G. (2015). Recurrence rates and clinical outcome for dogs with grade II mast cell tumours with a low AgNOR count and Ki67 index treated with surgery alone. *Veterinary and Comparative Oncology*, 15(1), 36–45.
- Smrkovski, O. A., Essick, L., Rohrbach, B. W., & Legendre, A. M. (2013). Masitinib mesylate for metastatic and non-resectable canine cutaneous mast cell tumours. *Veterinary and Comparative Oncology*, 13(3), 314–321.
- Stanclift, R. M., & Gilson, S. D. (2008). Evaluation of neoadjuvant prednisone administration and surgical excision in treatment of cutaneous mast cell tumors. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 232(1), 53–62.
- Stefanello, D., Valenti, P., Faverzani, S., Bronzo, V., Fiorbianco, V., Pinto da cunha, N., Romussi, S., Cantatore, M., Caniatti, M. (2009). Ultrasound-guided cytology of spleen and liver: A prognostic tool in canine cutaneous mast cell tumor. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 23(5), 1051–1057.
- Stefanello, D., Buracco, P., Sabattini, S., Finotello, R., Giudice, C., Grieco, V., Iussich, S., Tursi, M., Scase, T., Di Palma, S., Bettini, G., Ferrari, R., Martano, M., Gattino, F., Marrington, M., Mazzola, M., Vasconi, M. E., Annoni, M., Marconato, L. (2015). 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). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 246(7), 765–769.
- Steffey, M., Rassnick, K. M., Porter, B., & Njaa, B. L. (2004). Ureteral mast cell tumor in a dog. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 40(1), 82–85.
- Stone, D. M., Jacky, P. B., & Prieur, D. J. (1991). Chromosomal fragile site expression in dogs: II. Expression in boxer dogs with mast cell tumors. *American Journal of Medical Genetics*, 40(2), 223–229.
- Strefezzi, R. D. F., Kleeb, S. R., Xavier, J. G., & Catão-Dias, J. L. (2009). Prognostic indicators for mast cell tumors. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation : Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, 21(2), 821–825.
- Sur, R., Cavender, D., & Malaviya, R. (2007). Different approaches to study mast cell functions. *International Immunopharmacology*, 7(5), 555–567.
- Takahashi, T., Kadosawa, T., Nagase, M., Matsunaga, S., Mochizuki, M., Nishimura, R., & Sasaki, N. (2000). Visceral mast cell tumors in dogs: 10 cases (1982–1997). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 216(2), 222–226.
- Takeuchi, Y., Fujino, Y., Watanabe, M., Nakagawa, T., Ohno, K., Sasaki, N., Sugano, S., Tsujimoto, H. (2010). Aberrant autophosphorylation of *c-kit* receptor in canine mast cell tumor cell lines. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 137(3–4), 208–216.
- Takeuchi, Y., Fujino, Y., Watanabe, M., Takahashi, M., Nakagawa, T., Takeuchi, A., Bonkobara, M., Kobayashi, T., Ohno, K., Uchida, K., Asano, K., Nishimura, R., Nakayama, H., Sugano, S., Ohashi, Y., Tsujimoto, H. (2013). Validation of the prognostic value of histopathological grading or *c-kit* mutation in canine cutaneous mast cell tumours: A retrospective cohort study. *Veterinary Journal*, 196(3), 492–498.

- Taylor, F., Gear, R., Hoather, T., & Dobson, J. (2009). Chlorambucil and prednisolone chemotherapy for dogs with inoperable mast cell tumours: 21 cases. *Journal of Small Animal Practice*, 50(6), 284–289.
- Thamm, D. H., Mauldin, E. A., & Vail, D. M. (1999). Prednisone and vinblastine chemotherapy for canine mast cell tumor--41 cases (1992-1997). *Journal of Veterinary Internal Medicine / American College of Veterinary Internal Medicine*, 13(5), 491–497.
- Thamm, D. H., Turek, M. M., & Vail, D. M. (2006). Outcome and prognostic factors following adjuvant prednisone/vinblastine chemotherapy for high-risk canine mast cell tumour: 61 cases. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 68, 581–587.
- Thamm, D. H., & Vail, D. M. (2007). Mast cell tumors. In *Small Animal Clinical Oncology* (pp. 402–424).
- Tharp, M. (1998). Mastocytosis. *Current Problems in Dermatology*, (October), 177–210.
- Theoharides, T. C., & Cochrane, D. E. (2004). Critical role of mast cells in inflammatory diseases and the effect of acute stress. *Journal of Neuroimmunology*, 146(1–2), 1–12.
- Thompson, J. J., Pearl, D. L., Yager, J. A., Best, S. J., Coomber, B. L., & Foster, R. A. (2011). Canine subcutaneous mast cell tumor: Characterization and prognostic indices. *Veterinary Pathology*, 48(1), 156–168.
- Thompson, J. J., Yager, J. A., Best, S. J., Pearl, D. L., Coomber, B. L., Torres, R. N., Kiupel, M., Foster, R. (2011). Canine subcutaneous mast cell tumors: Cellular proliferation and KIT expression as prognostic indices. *Veterinary Pathology*, 48(1), 169–181.
- Vascellari, M., Giantin, M., Capello, K., Carminato, A., Morello, E. M., Vercelli, A., Granato, A., Buracco, P., Dacasto, Mutinelli, F. (2012). Expression of Ki67, BCL-2, and COX-2 in Canine Cutaneous Mast Cell Tumors: Association With Grading and Prognosis. *Veterinary Pathology*, 50(1), 110–121.
- Webster, J. D., Kiupel, M., & Yuzbasiyan-Gurkan, V. (2006). Evaluation of the kinase domain of *c-kit* in canine cutaneous mast cell tumors. *BMC Cancer*, 6(85).
- Webster, J. D., Yuzbasiyan-Gurkan, V., Kaneene, J. B., Miller, R., Resau, J. H., & Kiupel, M. (2006). The Role of *c-kit* in Tumorigenesis: Evaluation in Canine Cutaneous Mast Cell Tumors. *Neoplasia*, 8(2), 104–111.
- Webster, J. D., Yuzbasiyan-Gurkan, V., Miller, R. A., Kaneene, J. B., & Kiupel, M. (2007). Cellular proliferation in canine cutaneous mast cell tumors: Associations with *c-kit* and its role in prognostication. *Veterinary Pathology*, 44(3), 298–308.
- Webster, J. D., Yuzbasiyan-Gurkan, V., Thamm, D. H., Hamilton, E., & Kiupel, M. (2008). Evaluation of prognostic markers for Canine mast cell tumors treated with vinblastine and prednisone. *BMC Veterinary Research*, 4, 1–8.
- Weishaar, K. M., Thamm, D. H., Worley, D. R., & Kamstock, D. A. (2014). Correlation of nodal mast cells with clinical outcome in dogs with mast cell tumour and a proposed classification system for the evaluation of node metastasis. *Journal of Comparative Pathology*, 151(4), 329–338.

- Weishaar, K. M., Ehrhart, E. J., Avery, A. C., Charles, J. B., Elmslie, R. E., Vail, D. M., London, C. A., Clifford, C. A., Eickhoff, J. C., Thamm, D. H. (2018). *c-kit* Mutation and Localization Status as Response Predictors in Mast Cell Tumors in Dogs Treated with Prednisone and Toceranib or Vinblastine. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 32(1), 394–405.
- Weisse, C., Shofer, F. S., & Sorenmo, K. (2002). Recurrence rates and sites for grade II canine cutaneous mast cell tumors following complete surgical excision. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 38(1), 71–73.
- Welle, M. (1997). Development, significance, and heterogeneity of mast cells with particular regard to the mast cell-specific proteases chymase and tryptase. *Journal of Leukocyte Biology*, 61(March), 233–245.
- Welle, M. M., Bley, C. R., Howard, J., & Rüfenacht, S. (2008). Canine mast cell tumours: A review of the pathogenesis, clinical features, pathology and treatment. *Veterinary Dermatology*, 19(6), 321–339.
- White, C. R., Hohenhaus, A. E., Kelsey, J., & Procter-Gray, E. (2011). Cutaneous MCTs: Associations with Spay/Neuter Status, Breed, Body Size, and Phylogenetic Cluster. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 47(3), 210–216.
- Worley, D. R. (2012). Incorporation of sentinel lymph node mapping in dogs with mast cell tumours: 20 consecutive procedures. *Veterinary and Comparative Oncology*, 12(3), 215–226.
- Wu, H., Hayashi, T., & Inoue, M. (2006). Immunohistochemical expression of Mdm2 and p53 in canine cutaneous mast cell tumours. *Journal of Veterinary Medicine*, 53(2), 65–68.
- Yong, L. C. J. (1997). The mast cell: Origin, morphology, distribution, and function. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 49(6), 409–424.
- Zemke, D., Yamini, B., & Yuzbasiyan-Gurkan, V. . (2002). Mutations in the Juxtamembrane Domain of c- KIT Are Associated with Higher Grade Mast Cell Tumors in Dogs. *Veterinary Pathology*, 39, 529–535.

ANEXOS

Anexo I - Casuística discriminada por área cirúrgica

Área	Procedimento	Casos
Cirurgia de tecidos moles	Orquiectomia	15
	Ovariohisterectomia	20
	Mastectomia	7
	Nodulectomia	8
	Cistotomia	1
	Herniorrafia umbilical/ perineal/inguinal	1/1/1
	Hérnia peritoneu-pericárdica	1
	Esofagostomia	4
	Gastropexia	2
	Biópsia cutânea/oral/gástrica	3/2/1
	Pilorotomia	1
	Exérese de papiloma cutâneo	1
	Exérese de melanoma	1
	Shunt extra-hepático	1
	Uretroplastia	1
	Otohematoma	1
Omentalização de quisto prostático	1	
Cirurgia ortopédica	TTA	7
	Osteossíntese fémur	2
	Osteossíntese tibia	2
	Osteossíntese cotovelo	1
	Osteossíntese tarsometatársica	1
	Osteotomia ulna	1
	Osteocondrite dissecante	1
	Biópsia tibial	1
	Luxação da rótula	1
Neurocirurgia	Ventral-slot	1
	Hemilaminectomia	2
Dentisteria e cirurgia maxilofacial	Exodontia	11
	Limpeza cirúrgica de ferida na face	1
	COHAT	10
	Endodontia	1
	Biópsia excisional nódulo na mandíbula	1
	Hiperplasia gengival	1

	Ablação do conduto auditivo externo	2
	Exérese de linfonodo submandibular	1
	Rinopalatoplastia	1
	Osteossíntese mandíbula	1
	Osteotomia ventral da bolha timpânica	1
	Maxilectomia	1
Cirurgia oftálmica	Exérese nódulo palpebral	2
	Eletrodepilação definitiva de distíquios	3
	Facoemulsificação	3
	Colocação de anel de tensão	1
	Recolocação da glândula da membrana nictitante	2
	Enucleação	1
	Coloboma palpebral	1
	Entrópion	1

Anexo 2 – Poster apresentado no XIV congresso do Hospital Veterinário Montenegro



Dilatação endoscópica por balão de estenose esofágica em gatos: a propósito de 2 casos clínicos



Beatriz Rogado Paula, Rita Seixas Dias, Rodolfo Oliveira Leal
Hospital Escolar Veterinário / CIISA - Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa

INTRODUÇÃO

A estenose esofágica consiste num estreitamento anormal do lumen do esófago, o qual pode ser secundário a causas intraluminais (refluxo gastroesofágico, esofagite acrotária à ingestão de cáusticos, antibióticos (doxiciclina e clindamicina), corpos estranhos, cirurgia esofágica ou neoplasia) ou consequência de uma alteração extra-luminal compressiva (neoplasia extra-esofágica, esofágica intra-mural ou anomalias vasculares). A presença de distúrgio e/ou regurgitação são os sinais clínicos mais frequentes. O diagnóstico definitivo é confirmado por esofagoscopia. Entre as técnicas atualmente disponíveis para a sua resolução terapêutica, a dilatação endoscópica por balão é pouco invasiva e consiste na introdução de balões extensíveis de dilatação e alargamento consequente da estenose. Este estudo apresenta dois casos de resolução da estenose esofágica por dilatação em gatos, sensibilizando o clínico de animais de companhia para esta abordagem terapêutica.

CASOS CLÍNICOS

Foram referenciados para o serviço de Medicina Interna do HEV - FMV-Lisboa duas gatas híbridas de raça indeterminada, para realização de esofagoscopia por suspeita de doença esofágica. Ambas apresentavam história de regurgitação evolutiva desde há 10 dias e 3 semanas, respetivamente.

CASO CLÍNICO 1

- ✓ **Identificação:** Gata de 2 anos, híbrida esterilizada.
- ✓ **Motivo:** Referência para esofagoscopia por regurgitação desde há 10 dias.
- ✓ **Anamnese:** História de tratamento recente com doxiciclina e submetida a gastroscopia para remoção de corpo estranho no duodeno. Regurgitação desde há 10 dias.
- ✓ **Esofagoscopia:** Presença de uma dupla estenose esofágica (esofago médio e distal).
- ✓ **Etologia suspeita:** Origem multi-fatorial (doxiciclina versus refluxo gastroesofágico).
- ✓ **Tratamento:** Realização de dilatação endoscópica por balão (utilizando balão de dilatação de 10mm de diâmetro). Foi instituído tratamento médico (antácidos, comida húmida e maropitant).
- ✓ **Evolução clínica:** Apesar de melhoria clínica e resolução da regurgitação, foi realizada nova esofagoscopia 3 dias depois para avaliar a necessidade de segunda dilatação. Macroscopicamente foram apenas visíveis alguns sinais de esofagite pelo que o procedimento não foi repetido. Aquando do último contacto, 5 semanas depois, a gata apresenta-se estável com alimentação húmida.

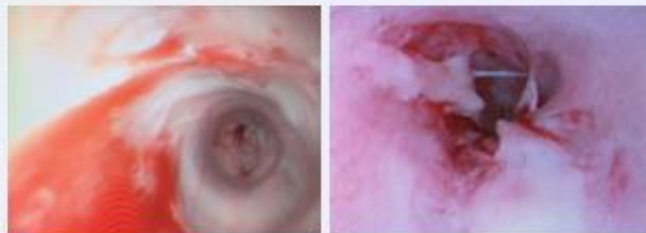


Figura 1: Fotografias de endoscopia mostrando a evolução da estenose na gata em 2 esofagoscopias repetidas no caso clínico 1.

CASO CLÍNICO 2

- ✓ **Identificação:** gata de 12 anos, híbrida esterilizada.
- ✓ **Motivo:** Referência para esofagoscopia por regurgitação desde há 3 semanas.
- ✓ **Anamnese:** Sem antecedentes. Regurgitação desde há 3 semanas. Exploração do veterinário assistente - Radiografia torácica com retenção de líquido limitado a nível do esófago médio.
- ✓ **Esofagoscopia:** Presença de uma estenose concêntrica de bordos regulares, a nível da porção inicial do terço médio do esófago.
- ✓ **Etologia suspeita:** Tanto se conta a existência de fatores de predisposição conhecidas para esta lesão (sem cirurgia recente, contacto com cáusticos ou fármacos) suspeita-se de evolução de uma neoplasia extra-luminal ou refluxo gastro-esofágico crónico.
- ✓ **Tratamento:** Realização de três sessões de dilatação endoscópica por balão com 3 dias de intervalo entre si, e utilização de próteses crescentes (duas dilatações com balão de 10mm diâmetro e uma terceira com um balão de 18mm de diâmetro). Concomitantemente, foi também administrado tratamento médico (antácidos, comida húmida e maropitant).
- ✓ **Evolução clínica:** Apesar da resolução da regurgitação entre dilatações, o aspeto macroscópico da lesão manteve-se semelhante justificando a realização de uma tomografia computadorizada. Esta confirmou a presença de múltiplos nódulos pulmonares e uma massa esofágica intraluminal (45 x 12 x 8mm), não sendo claro se teria origem intraluminal. Apesar do prognóstico reservado, 3 semanas depois, a gata apresentava-se estável com tratamento médico paliativo.

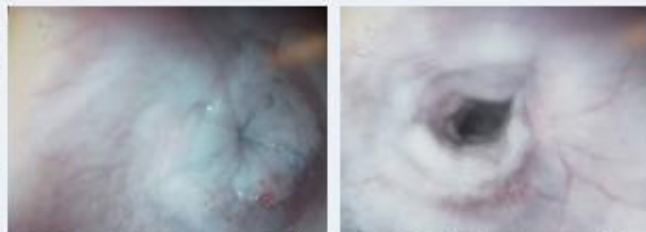


Figura 2: Fotografias de endoscopia mostrando a estenose na gata antes e depois da 1ª dilatação por balão repetidas no caso clínico 2.

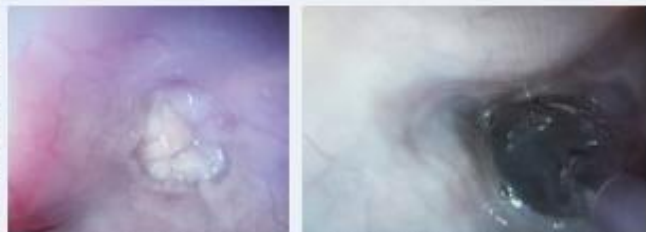


Figura 3: Fotografias de endoscopia mostrando a estenose na gata antes da 2ª dilatação por balão repetidas no caso clínico 2.



Figura 4: Fotografias de endoscopia mostrando a situação de dilatação endoscópica por balão de estenose esofágica.

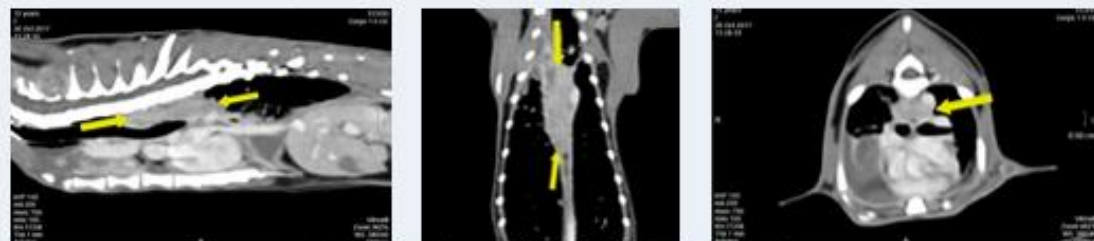


Figura 5: Fotografias de tomografia computadorizada evidenciando a massa esofágica, repetidas no caso clínico 2.

CONCLUSÃO

- ✓ Seja numa perspetiva curativa ou paliativa, a dilatação endoscópica por balão é uma técnica útil na resolução (mesmo que transitória) dos sinais de regurgitação associados a estenose esofágica em gatos.

REFERÊNCIA (S) E AGRADECIMENTO (S)

- ✓ Ettinger, S.J., Cole, E. & Feldman, E.C. (2017). Textbook Of Veterinary Internal Medicine. (8ª edição). Philadelphia: W.B. Saunders Co.
- ✓ Os autores agradecem ao serviço de imagiologia do Hospital Escolar Veterinário-FMV-Lisboa pela partilha das imagens da tomografia computadorizada.

