



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

Proliferação de mastócitos em felinos. Imunomarcação para CD117 e MMP-9

Tiago João Reuter Hirst de Sousa Rafael

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutora Ana Isabel Simões Pereira
Duarte

Doutor Jorge Manuel de Jesus
Correia

ORIENTADORA:

Doutora Maria da Conceição da
Cunha e Vasconcelos Peleteiro

CO-ORIENTADORA:

Doutora Sandra de Oliveira Tavares
de Sousa Jesus

2011

Lisboa



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

Proliferação de mastócitos em felinos. Imunomarcação para CD117 e MMP-9

Tiago João Reuter Hirst de Sousa Rafael

Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutora Ana Isabel Simões Pereira
Duarte

Doutor Jorge Manuel de Jesus
Correia

ORIENTADORA:

Doutora Maria da Conceição da
Cunha e Vasconcelos Peleteiro

CO-ORIENTADORA:

Doutora Sandra de Oliveira Tavares
de Sousa Jesus

2011

Lisboa

Ao meu falecido pai. As recordações são poucas mas o mesmo não se passa com a tua importância. É com pena que completo mais esta etapa sem que me possas acompanhar.

Á minha mãe que, sozinha, desempenhou como soube, o papel de pai e mãe, nunca me faltando com nada.

Obrigado por sempre terem alimentado a paixão que tenho pelos animais.

Agradecimentos

Quem não me conheça bem talvez me veja como um rapaz tímido que apenas quer passar despercebido. No entanto, como a maioria das pessoas, ou pelo menos assim acredito, tenho crescido com grandes sonhos, com a esperança de alcançar grandes objectivos. Desta forma sempre evitei ídolos. Isto porque, na minha opinião, idolatrar alguém é impor limites a nós mesmos e, se há coisa que a História nos tem ensinado, é que estamos sempre a evoluir enquanto espécie e enquanto pessoas. Claro que esta evolução não é possível sem as nossas relações interpessoais. Ninguém pode afirmar ter chegado onde chegou sem a ajuda de outras pessoas.

Assim, desejo começar por agradecer de forma geral a muitas pessoas que, infelizmente, pela falta de espaço não poderei referir, mas não são esquecidas. A vida é uma viagem, cheia de calmarias e tormentas e, mesmo estas são importantes na nossa formação, pelo que devo agradecer o que hoje sou a todas as pessoas que dela fizeram parte.

De uma forma mais pessoal, desejo expressar o meu agradecimento:

Ao Dr. Rui Dias, meu professor de biologia no secundário que logo numa das primeiras avaliações que me fez me deu uma das piores notas que já tive num trabalho. O seu rigor fez com que melhorasse e o seu modo único de dar aulas levou-me a encarar a biologia, não como uma cadeira, mas como um modo de ver a vida.

De seguida, quero agradecer à minha orientadora, a Prof^ª. M^ª Conceição Peleteiro que muito me tem ensinado e cujo profissionalismo, competência e todo o seu percurso académico me têm inspirado. Desde a primeira aula que me deu que me apercebi do quanto se destacava no seu meio e me soube cativar para a sua área, pela qual ganhei um grande interesse, embora continue a ser a clínica a minha paixão.

À minha co-orientadora, a Prof^ª. Sandra Jesus, que tanto me ensinou sobre os exóticos, que foi uma guia e uma amiga ao longo do meu estágio no hospital escolar. Procurei tirar um pouco de cada pessoa que tenho visto a trabalhar e algumas coisas que aprendi consigo e espero poder assimilar no futuro são a sua sensatez, rectidão e sentido prático, sem esquecer, claro, todos os conhecimentos que me passou. Ter estagiado consigo foi, felizmente, não só uma excelente experiência que me formou na área de animais exóticos, como foi também complementada com uma vasta variedade de conhecimentos clínicos gerais.

À Dra. Cristina Almeida e ao Dr. Joel Ferraz, que me iniciaram nesse pequeno mundo, por vezes tão esquecido da clínica de exóticos. À Dra. Teresa Fernandes e Rui Bernardino do Jardim Zoológico de Lisboa por me terem acolhido durante uma das semanas mais marcantes que já tive e que sonho um dia tornar-se uma de muitas.

Ao Dr. Hugo Pissarra. Devo ser um de milhares a agradecer-lhe pois com a sua simpatia e altruísmo tem vindo a ajudar tantos alunos e eu não fui excepção. Devo-lhe não só a nível académico, mas também enquanto amigo que muitas vezes me tem ouvido ao longo de mais de metade do curso.

Ao Prof. Jorge Correia, que com a sua boa disposição conseguia tornar 3 horas passadas em torno de um cadáver em aulas cheias de vida e animação.

A todo o restante pessoal do departamento de anatomia patológica, professores e auxiliares, que me acolheram como uma segunda família e a quem devo tantos favores.

À Carina Santos. Apesar de seres uma aluna do nosso curso, incluo-te junto dos agradecimentos ao “departamento de patológica” porque, para mim, és já da casa. Devo-te bastante, não só pela parte prática deste trabalho, mas também pela ajuda que me deste na redacção do capítulo dos materiais e métodos.

A todos os clínicos que forneceram o material e dados imprescindíveis à realização deste trabalho.

Ao Prof. Luís Madeira de Carvalho, que sempre manteve um contacto tão próximo dos alunos que dissipou completamente a ideia que nos passam no ensino secundário de que o professor universitário é o bicho papão. Fico muito contente de ter podido trabalhar consigo.

À Prof. Isabel Neto, pela sua preciosa ajuda e conselhos na parte do tratamento estatístico dos dados. À Doutora Manuela Oliveira as explicações de última hora.

Ao Prof. António Ferreira, que não tive grande oportunidade de seguir, mas a quem devo a oportunidade de ter estagiado num local tão marcante como é o hospital da nossa faculdade.

Ao Dr. Nuno Félix. Não só um médico de grande competência e com quem muito aprendi, de clínica e outras coisas não tão clínicas, mas também um amigo. O estágio nunca poderia ser o mesmo sem o seu bom humor, as suas conversas inspiradoras e sem as fugas para as suas experiências com os pobres ratos de laboratório.

Ao Dr. António Almeida, que tornou o facto de as horas de estágio em radiologia tão animadas. Vou sentir falta das tuas parvoíces. Também ao Dr. Óscar Gamboa, um importante elemento da equipa de radiologia.

À Prof^a. Manuela Rodeia, à Prof^a. Teresa Villa de Brito, ao Dr. Gonçalo Vicente, ao Dr. Rodolfo Leal, à Dra. Leonor Iglésias, à Dra. Marisa Ferreira, à Dra. Joana Pontes, à Dra. Joana Almeida, à Dra. Joana Gomes, à Doutora. Mafalda Lourenço, à Doutora. Solange, à Dra. Sofia Mouro, à Dra. Carla Monteiro, ao Dr. Ricardo Marques e ao Dr. Ricardo Ferreira, todo o excelente apoio, conhecimentos e simpatia prestados na área de clínica de pequenos animais. Vocês tornaram o hospital numa casa para nós e as horas aí passadas bem mais animadas e inesquecíveis.

Ao Prof. Miguel Carreira que, com o seu modo próprio de ensinar e a sua eficiência e rapidez nas cirurgias, se tornou o meu cirurgião preferido. Ao Dr. Rodrigo Bom, a sua boa disposição nas cirurgias. À Dra. Ivone que ao longo do curso mal tive oportunidade de conhecer mas que se tornou uma agradável surpresa ao longo do estágio, pela sua calma, fora e dentro da sala de cirurgia, simpatia e competência. À Dra. Ana Murta, que tão atenta esteve aos casos que iam surgindo no hospital e que podiam ser importantes para este trabalho. À Prof^a. Esmeralda Delgado, pelas fotos e informações dadas dos casos que lhe diziam respeito.

Ao Prof. Sales Luís, impossível de agrupar com qualquer dos outros pois, com a sua polivalência e com tudo o que aprendi com ele, teria que o mencionar em todas as áreas.

Aos auxiliares do hospital e em especial à Sofia. Os conhecimentos não vêm só de quem tem graus académicos superiores e vocês são prova disso. Obrigado pela ajuda prestada nos momentos mais desesperantes e caóticos. Talvez não tenha sido perceptível na altura, mas eu sempre vos fiquei reconhecido.

À Dra. Marina Coelho, veterinária no hospital do Restelo que, embora não se deva lembrar de mim, eu lembro-me dela e devo-lhe o ter ganho um carinho especial à ecografia que mais se desenvolveu com o Dr. Félix.

A todos os meus colegas estagiários e em especial à Mariana Pereira, minha colega das consultas de exóticos, cuja companhia não se limitou aos cerca de 4 meses e meio que estagiei no hospital, mas também ao período que se seguiu, durante as consultas de exóticos com quem dividia os casos. Contigo, com o Dr. António e a Prof. Sandra as consultas deixaram de ser só consultas e as segundas e terças passaram a ser o meu dia de convívio, o meu escape da redacção da tese e contacto com o mundo exterior.

A tantos outros professores, bem como a alguns funcionários, a quem não posso agradecer de uma forma tão intimista devido ao limite que este espaço deve ter. Ainda aos vários clínicos que enviaram os casos para o serviço de histopatologia da faculdade e que deram informações quanto à evolução dos mesmos, em especial à Dra. Ana Margarida Santos da Clínica veterinária João XXI – Algés que tão gentilmente cedeu algumas das fotos utilizadas. Aos meus colegas de grupo, Diogo Pereira, Rui Seixas e Patrícia Jervis, com quem ultrapassei tantas adversidades. Também a alguns importantes amigos que me ajudaram a não desanimar ao longo desta etapa tão árdua. Entre eles, um especial obrigado ao José Pereira, ao Miguel Nogueira, ao Jorge, à Bá e Tiago, ao André Cardoso, à Lena, ao Miguel Gonçalves, à Dra. Ana Cristina, ao Gonçalo Rodrigues e ao José Carvalho. Tornaram esta viagem bem mais agradável, ainda que nem todos me tenham acompanhado até ao destino.

Resumo

PROLIFERAÇÃO DE MASTÓCITOS EM FELINOS. IMUNOMARCAÇÃO PARA CD117 E MMP-9

Existem, no gato, várias formas de proliferação anormal de mastócitos na pele e noutros tecidos. Embora em alguns casos se trate indubitavelmente de neoplasias, outros há que podem corresponder a reacções de hipersensibilidade. Opostamente ao cão, não há um sistema de classificação nos felinos que permita prever a evolução clínica, embora, normalmente, se tratem de processos benignos.

No presente estudo, procurou-se caracterizar vários casos de mastocitoma cutâneo, extracutâneo, mastocitose cutânea e sistémica, para alguns parâmetros epidemiológicos, clínicos e histopatológicos, comparando estes dados com o que foi observado anteriormente noutros estudos. Recorreu-se a métodos de imunohistoquímica para a proteína de membrana c-kit (CD117) e para a metaloproteinase MMP-9 de modo a definir a sua utilidade como indicadores de prognóstico, à semelhança do que foi feito para o cão.

Verificaram-se poucas diferenças entre esta amostra e estudos recentes e concluiu-se que o padrão de expressão da marcação para c-kit pode realmente ser indicativo do comportamento biológico destes tumores. Quanto à marcação para a MMP-9 não foi possível tirar idênticas conclusões.

Palavras-chave: gato; proliferação anormal de mastócitos; comportamento biológico; imunohistoquímica.

Abstract

FELINE MAST CELL PROLIFERATION. CD117 AND MMP-9 IMMUNOSTAINING

In the cat there are different forms of abnormal mast cell proliferation in the skin and other tissues. Even though some may undoubtedly be viewed as neoplasia, there are others that might as well be considered a mere hypersensitivity reaction. Contrarily to the dog, there is no classification system that helps to predict the outcome of these lesions, even though they are normally benign.

In the present study, some epidemiologic, clinical and histopathologic parameters were characterized for cases of mast cell tumors of the skin, non cutaneous mast cell tumors, systemic mastocytosis and cutaneous mastocytosis, comparing this data to what has been observed in previous studies. Immunohistochemistry methods were also used to identify the membrane protein c-kit and MMP-9 in order to estimate their usefulness as prognostic tools in the same way they are used in dogs.

Few differences were seen between this data and recent studies. It was concluded that the expression pattern of c-kit may indeed be linked to the biologic behavior of these tumors. As for the immunostaining of MMP-9, it was not possible to achieve such conclusions.

Key words: cat; abnormal mast cell proliferation; biologic behavior; immunohistochemistry.

Índice

Índice de figuras	xiii
Índice de tabelas	xiv
Índice de gráficos	xv
Abreviaturas, acrónimos e siglas	xvi
1. ... Introdução.....	1
2. ... Revisão Bibliográfica.....	3
2.1. O Mastócito	3
2.1.1. Morfologia.....	3
2.1.2. Diferenciação.....	4
2.1.3. Heterogeneidade	5
2.1.4. Funções biológicas.....	7
2.1.5. C-kit	10
2.1.6. Metaloproteinase-9	12
2.2. Mastocitose e mastocitomas.....	14
2.2.1. Etiopatogenia.....	15
2.2.2. Mastocitoma cutâneo felino	16
2.2.2.1. Aspectos clínicos e características macroscópicas.....	16
2.2.2.2. Histiopatologia.....	17
a) Mastocitoma bem diferenciado	17
b) Mastocitoma atípico, pouco granulado ou histiocítico	17
c) Mastocitoma pleomórfico.....	18
2.2.3. Mastocitose cutânea felina	19
2.2.3.1. Aspectos clínicos e características macroscópicas.....	20
2.2.3.2. Histiopatologia.....	20
a) Mastocitose cutânea maculopapular (“urticaria pigmentosa”).....	20
b) Mastocitose cutânea difusa.....	21
2.2.4. Mastocitoma extracutâneo	21
2.2.4.1. Mastocitose sistémica.....	21
2.2.4.2. Mastocitoma gastrointestinal	22
2.2.4.3. Sinais clínicos das formas extracutâneas	23
2.2.5. Diagnóstico.....	23
2.2.6. Imunofenotipagem por imunohistoquímica	25
2.2.7. Tratamento	26
2.2.8. Prognóstico.....	27
3. ... Objectivos.....	29
4. ... Material e métodos.....	29
4.1. Recolha de dados para o estudo de casos no período de 2002-2010.....	29
4.2. Amostras	29
4.3. Imunohistoquímica	30
4.4. Análise estatística	31
5. ... Resultados	33
5.1. Mastocitoma cutâneo	33
5.1.1. Avaliação dos dados clínicos e epidemiológicos	33
5.1.2. Avaliação histopatológica	35
5.2. Mastocitose cutânea.....	40
5.2.1. Avaliação dos dados clínicos e epidemiológicos	40
a) Idade.....	40
b) Sexo.....	40
c) Raça.....	40
d) Localização anatómica.....	40

e) Tamanho das lesões.....	41
5.2.2. Avaliação histopatológica	41
5.3. Mastocitoma extracutâneo.....	42
5.3.1. Avaliação dos dados clínicos e epidemiológicos.....	42
a) Idade.....	42
b) Sexo.....	42
c) Raça.....	42
d) Localização Anatômica.....	43
e) Tamanho das lesões.....	43
5.3.2. Avaliação histopatológica	43
5.4. Mastocitose sistêmica.....	44
5.4.1. Avaliação dos dados clínicos e epidemiológicos.....	44
5.4.2. Avaliação histopatológica	44
5.5. Avaliação imunohistoquímica	45
5.5.1. C-Kit.....	45
5.5.2. MMP-9	47
5.6. Evolução clínica.....	50
a) Mastocitoma cutâneo	50
b) Mastocitose cutânea	51
c) Mastocitoma extracutâneo	51
d) Mastocitose sistêmica.....	51
e) Distribuição do padrão de expressão do CD117 e a evolução clínica do mastocitoma cutâneo	51
f) Distribuição da intensidade de marcação do CD117 e a evolução clínica	52
g) Intensidade da marcação para MMP-9 dos casos de mastocitoma cutâneo relativamente à evolução clínica dos mesmos.....	52
6... Discussão	55
7... Conclusão	63
8... Bibliografia.....	65

Índice de figuras

Figura 1 - Mastocitoma cutâneo. A - Mastocitoma da palpebra; B - Lesão ulcerada.	35
Figura 2 - A - Mastocitoma cutâneo bem diferenciado, HE, x 40 (detalhe ampliado, HE, x 100); B - Mastocitoma moderadamente diferenciado, HE, x 400; C - Mastocitoma pouco diferenciado, HE, x 40 (detalhe ampliado, AT, x 100); D - Mastocitoma pleomórfico, HE, x 100 (detalhe ampliado, HE, x 400).	36
Figura 3 - A - Mastocitoma com distribuição compacta, HE, x 40 (detalhe ampliado de pormenor de infiltração linfóide perivascular, HE, x 100); B - Mastocitoma com distribuição difusa, HE, x 40.	37
Figura 4 - Distribuição das células neoplásicas pelas diferentes camadas da pele. A intensidade da cor azul nas barras à direita é proporcional ao número de casos identificados.	39
Figura 5 - Casos de mastocitose cutânea. A - Placa prurítica eritomatosa na região peitoral em felino de raça indeterminada; B, C, D - Mastocitose cutânea na parede abdominal em gato persa. Lesão linear na parede abdominal (C). Pele do abdómen após quimioterapia (D).	41
Figura 6 - Mastocitose cutânea. A - HE, x 100; B - AT, x 100 (detalhe ampliado, AT, x 400).	42
Figura 7 - Mastocitoma extracutâneo. A - Infiltração por mastócitos da lâmina própria do lábio com invasão do epitélio, HE, x 400; B - Invasão da submucosa do estômago por mastócitos, HE, x 40 (detalhe ampliado, AT, x 100).	44
Figura 8 - Mastocitoma sistémico. A - Baço hipertrofiado e com espessamento da cápsula; B - Infiltração difusa por mastócitos do baço representado em A. Ao centro folículo linfóide preservado, HE, x 40 (detalhe ampliado, HE, x 100).	45
Figura 9 - A, B, C - Padrões de marcação do CD117 em mastocitomas cutâneos. Padrão I - membranar (A); Padrão II - citoplasmático perinuclear (B); Padrão III - citoplasmático difuso (C); D e E - Marcação negativa em mastocitomas extracutâneos, do lábio (D) e vulva (E). No detalhe inserido em cima em E, os mastócitos da mesma lesão podem ser identificados pelo AT. F - Marcação negativa para o CD117 em mastocitose cutânea. (CD117, Envision, Hematoxilina de Harris, x 400).	46
Figura 10 - A e B - Marcação para o MMP-9 em mastocitoma cutâneo. Marcação citoplasmática difusa, sendo igualmente visíveis alguns núcleos marcados. (MMP-9, Envision, Harris Haematoxylin, x400).	47
Figura 11 - Marcação de MMP-9 em mastocitoma extracutâneo. A - Marcação ténue de mastócitos na lâmina própria do lábio com invasão do epitélio; B - Forte marcação citoplasmática dos mastócitos e fibroblastos da vulva. (MMP-9, Envision, Harris Haematoxylin, x400).	48
Figura 13 - Distribuição das células neoplásicas pelas diferentes camadas de pele e sua marcação para MMP-9. A intensidade da cor azul nas barras à direita é proporcional ao número de casos identificados.	49
Figura 12 - Marcação de MMP-9 de casos de mastocitose cutânea. A - Mastócitos positivos na derme. No canto inferior esquerdo identifica-se uma glândula sebácea com marcação positiva; B - Eosinófilos também marcados para o MMP-9 conjuntamente com mastócitos (setas). (MMP-9, Envision, Harris Haematoxylin, x400).	49

Índice de tabelas

Tabela 1 - Composição da amostra	33
Tabela 2 - Média de idades consoante o sexo.....	33
Tabela 3 - Distribuição da doença por raças.....	34
Tabela 4 - Distribuição dos tumores por localização anatómica	34
Tabela 5- Distribuição do tamanho dos nódulos para tumores solitários e múltiplos.....	35
Tabela 6 - Relação entre o tipo de mastocitomas e presença de granulações (de ausente(-) a muito elevada(+++)).....	35
Tabela 7 - Relação entre o tipo de mastocitoma e a infiltração por eosinófilos (de ausente (-) a muito elevada (+++)).....	36
Tabela 8 - Tipos de mastocitoma e organização compacta ou difusa dos mastócitos nos tecidos	37
Tabela 9 - Relação entre o tipo de mastocitoma e a apoptose (de ausente (-) a muito elevada (+++))	38
Tabela 10 - Relação entre o tipo de mastocitoma e o índice mitótico	38
Tabela 11 - Relação entre o tipo de mastocitoma e sua organização compacta ou difusa nos tecidos.....	43
Tabela 12 - Padrão de marcação do CD117 dos diferentes tipos de mastocitoma cutâneo	45
Tabela 13 - Intensidade da marcação do CD117 dos diferentes tipos de mastocitoma cutâneo	46
Tabela 14 - Intensidade da marcação do MMP-9 dos mastocitomas cutâneos e extracutâneos.	47
Tabela 15 - Relação da intensidade da marcação para MMP-9 e organização difusa ou compacta das células tumorais.....	48
Tabela 16 - Intensidade da marcação para MMP-9 para os casos de mastocitose.....	48
Tabela 17 - Evolução clínica por tipo de mastocitoma	50
Tabela 18 - Relação entre a evolução clínica e o índice mitótico.....	51
Tabela 19 - Intensidade de marcação para MMP-9 dos casos de mastocitoma cutâneo relativamente à evolução clínica dos mesmos	53

Índice de gráficos

Gráfico 1- Distribuição da idade e o tipo de mastocitoma cutâneo.....	39
Gráfico 2- Relação entre a evolução clínica e o padrão de expressão do CD117 em casos de mastocitoma cutâneo.....	52
Gráfico 3- Distribuição da intensidade da marcação do CD117 e a evolução clínica.....	52

Abreviaturas, acrónimos e siglas

AT - Azul de Toluidina

ATP - adenosina trifosfato

CD - *Cluster of differentiation*

CCNU - Lomustina

CTMC - *Connective tissue mast cells*

cys-LTs - leucotrienos cisteínicos

DAB - Tetra-hidrocloreto de 3,3'-diaminobenzidina

ECF-A - *Eosinophil chemotactic factor of anaphylaxis*

Fc - Fracção cristalizável

FcεRI – Receptor de IgE de alta afinidade

FeLV - *Feline Leukemia Virus*

FIV - *Feline Immunodeficiency Virus*

GALT - Gut-associated Lymphoid Tissue (tecido linfóide associado às mucosas)

HE - Hematoxilina e Eosina

HRP - *Horseradish peroxidase*

ICAM - *Inter-Cellular Adhesion Molecule*

IL - Interleucina

INF - Interferão

LT - leucotrieno

M - Mastócito

MMC - *mucosal mast cells*

mMCP - *mouse mast cell protease*

MMP - *Matrix metalloproteinase*

n - Número de observações

NK - *Natural Killer*

OMS - Organização Mundial da Saúde

PAF - factor de activação plaquetário

PG - Prostaglandina

PIF - Peritonite Infecciosa Felina

Q - Quimase

RECK - *reversion inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs*

RNA - *Ribonucleic acid (ácido ribunucleico)*

RT-PCR - *Real Time – Polimerase chain reaction*

SCF - *Stem Cell Factor*

SI - *Steel locus*

SRS-A - *Slow reacting substance of anaphylaxis*

T - Triptase

TGF - *Transforming Growth Factor* (factor de crescimento transformante)

TNF - *Tumor Necrosis Factor* (factor de necrose tumoral)

VEGF-A - *Vascular Endothelial Growth Factor* (factor de crescimento vascular endotelial)

1. Introdução

O mastocitoma é uma neoplasia de origem hematopoiética cuja incidência é mais baixa em gatos do que em cães, representando entre 8 a 15% dos tumores cutâneos daquela espécie (Gross, Ihrke, Walder & Affolter, 2005). Ocorre também na forma sistêmica, estando descrito como o tumor hematopoiético mais comum do baço a seguir ao linfoma; e na forma gastrointestinal com a terceira incidência mais alta a seguir ao linfoma e adenocarcinoma (Rogers, 2009).

O comportamento biológico desta neoplasia no gato não é tão variável e imprevisível como no cão. Apresenta-se, contudo, com uma forma visceral primária tão importante quanto a cutânea, o que não acontece no cão (Rogers, 2009).

Os mastocitomas são considerados pela maioria dos estudos como sendo benignos, com taxas de recorrência local baixas (Wilcock, Yager & Zink., 1986; Buerger & Scott, 1987; Molander-McCrary, Henry, Potter, Tyler & Buss, 1998; Johnson, Schulman, Lipscomb & Yantis, 2002) e desenvolvimento de tumores primários com multiplicidade regional a nível cutâneo em cerca de 43% dos casos reportados; metástases distantes não foram observadas (Buerger & Scott, 1987).

No Homem, é uma doença rara que surge sob a forma de mastocitoma cutâneo múltiplo ou solitário, mastocitose sistêmica e cutânea e leucemia mastocitária. Todas estas também têm sido encontradas no gato com exceção da leucemia mastocitária (Gross et al., 2005).

Não há no gato um sistema de gradação histológica como existe para o cão (sendo o mais utilizado o sistema de Patnaik) que se tenha revelado útil na determinação do prognóstico (Molander-McCrary et al, 1998; Gross et al., 2005), sendo que a actividade mitótica parece ser o único parâmetro indicativo de malignidade nestas neoplasias (Johnson et al., 2002).

Os mastocitomas no gato podem ser agrupados, de acordo com as suas características histológicas, em mastocíticos, e dentro destes em bem diferenciados e pleomórficos ou pouco diferenciados (Johnson et al., 2002); e histiocíticos (Wilcock et al., 1986) ou atípicos, de células pouco granuladas (Gross et al, 2005; Rodriguez-Cariño, Fondevila, Segalés & Rabanal, 2009).

A determinação do prognóstico com base apenas nos parâmetros histológicos e, no caso do tipo histiocítico, o diagnóstico do mesmo, nem sempre são fáceis (Wilcock et al., 1986), pelo que o uso de marcadores imunohistoquímicos tem vindo a tornar-se uma ferramenta indispensável na identificação e classificação destes e outros tumores.

O c-kit trata-se de um receptor de membrana especialmente importante nos mastócitos e é responsável pela sua diferenciação, proliferação, sobrevivência, e activação via ligação com o

Stem Cell Factor (Ashman, 1999), que tem vindo a ser investigado em associação com diversas neoplasias, uma vez que mutações no gene responsável pela sua expressão podem estar envolvidas na origem da proliferação neoplásica destas células (Ma et al., 1999). Foram já identificadas mutações do gene responsável por este receptor em humanos (Furitsu et al., 1993), cães (London et al, 1999) e mesmo em gatos (Isotani et al., 2006) e feitos estudos de correlação da distribuição da expressão deste receptor com os tipos histológicos tanto no cão (Webster, Kiupel, Kaneene, Miller & Yuzbasiyan-Gurkan, 2004; Preziosi, Morini & Sarli, 2004; Reguera et al., 2000; Webster, Yuzbasiyan-Gurkan, Miller, Kaneene & Kiupel 2007) como no gato (Rodriguez-Cariño et al., 2009). Nesta última espécie não foi possível estabelecer qualquer correlação.

As metaloproteinases são um grupo de enzimas proteolíticas capazes de degradar a matriz extracelular e moléculas da superfície celular (McCawley & Matrisian, 2001; Sternlicht & Werb, 2001). A desregulação destas tem já sido envolvida em várias doenças degenerativas e auto-imunes, bem como na metastização tumoral (Yoon, Park, Yun & Chung, 2003), sendo as MMP-2 e MMP-9 abundantemente expressas em vários tumores malignos, podendo ter um papel importante na migração das células neoplásicas (Johnsen, Lund, Rømer, Almholt & Danø, 1998) e mesmo dos mastócitos normais que, embora residentes na derme e outros tecidos conjuntivos, retêm a sua capacidade migratória após diferenciação (Noli & Miolo, 2001).

2. Revisão Bibliográfica

2.1. O Mastócito

Embora já tivessem sido identificadas células no mesentério da rã com características que levam a pensar que fossem mastócitos (Von Recklinghausen, 1863 citado por Archer, 1980) só em 1879 foram propriamente identificadas por Paul Ehrlich, e apelidadas de células *mastung* (i.e. sobrealimentadas), quando este estudava as características tintoriais dos seus grânulos citoplasmáticos (Ehrlich, 1879 citado por Archer, 1980). Os mastócitos do gato são células de origem hematopoiética que se encontram nos diferentes tecidos onde participam tanto em processos inflamatórios do tipo alérgico e não alérgico, bem como na imunidade inata e adaptativa em resposta a agentes infecciosos, através do seu conteúdo em mediadores inflamatórios (Boyce, 2010).

Em gatos saudáveis, o número médio de mastócitos na pele é de 12,5 por campo de maior ampliação (x400) chegando a atingir valores de até 60 mastócitos por campo (Foster, 1994), número este muito maior do que no cão onde o normal será 4 a 12 mastócitos na mesma ampliação (Benigno, Scott & Erb, 2000). Os locais com maior número de mastócitos são as extremidades distais dos membros, mento e pavilhão auricular (Foster, 1994).

Estas células encontram-se predominantemente nos tecidos conjuntivos e superfícies mucosas com distribuição perivascular e na proximidade de nervos e vasos linfáticos (Weidner e Austen, 1990, citado por Boyce, 2010), sendo especialmente abundantes em tecidos que formam interface com o ambiente externo como a pele, conjuntiva, mucosa intestinal e das vias aéreas, sugerindo uma localização estratégica integrando a primeira linha de defesa do hospedeiro (Boyce, 2010).

O tempo de semi-vida dos mastócitos está descrito como sendo de cerca de 40 dias (Enerbäck & Löwhagen, 1979; Mellblom, 1980).

2.1.1. Morfologia

Os mastócitos felinos têm 7 a 10 μm de diâmetro e aparecem nos tecidos como células estreladas, fusiformes ou poligonais (Ward & Hurvitz, 1972), com um núcleo pequeno, esférico e central e de difícil observação por estar frequentemente encoberto pelos grânulos citoplasmáticos (Zorn, 2004). Por microscopia electrónica verifica-se que estes são densos aos electrões e que os mastócitos possuem finos processos conhecidos por *microplicae* com cerca de 1 a 2 μm (Boyce, 2010). No gato, os grânulos citoplasmáticos têm em média 0,6 μm de

diâmetro mas podem chegar a ter 0,9 µm (Ward & Hurvitz, 1972) e contêm numerosos mediadores inflamatórios que são libertados aquando da sua estimulação (Tharp, 1998). Cada mastócito contém, em média, 1000 grânulos densos aos electrões, heterogéneos e ricos em mediadores químicos como a histamina e glicosaminoglicanos (Zorn, 2004). São rapidamente identificados, com microscópio óptico, usando corantes catiónicos que se ligam aos seus grânulos secretores. Estes corantes (azul de toluidina, Giemsa) mudam de cor do azul para o púrpura, fenómeno conhecido por metacromasia. De todas as células hematopoiéticas, apenas os basófilos partilham esta capacidade. Esta metacromasia reflecte o seu conteúdo em radicais ácidos presentes nos glicosaminoglicanos como a heparina altamente sulfatada e sulfato de condroitina, devido à presença de resíduos alternados de serina e glicina na estrutura dos seus aminoácidos. Os glicosaminoglicanos sulfatados dos grânulos dos mastócitos são essenciais para o armazenamento de proteases (triptase e quimase) e aminas (histamina e serotonina). Como a porção maior do peso dos seus grânulos se deve às proteases, os mastócitos podem ser também identificados por histoquímica ou por reacções bioquímicas que detectem as mesmas, como a actividade da cloroacetato esterase (indicadora de proteases quimotripticas) ou por imunohistoquímica, com anticorpos contra triptase ou quimase (Boyce, 2010). Outros constituintes dos grânulos dos mastócitos são a histamina e o factor quimiotáctico dos eosinófilos na anafilaxia, mais conhecido pela sigla ECF-A “*eosinophil chemotactic factor of anaphylaxis*”. Os mastócitos secretam também alguns leucotrienos (C4, D4, E4) ou SRS-A “*slow reacting substance of anaphylaxis*”. Porém, estas substâncias não existem pré-formadas na célula. Elas são sintetizadas a partir dos fosfolípidos da membrana plasmática e imediatamente libertadas para o meio extracelular quando o mastócito recebe os sinais apropriados como por exemplo na interacção com fibroblastos. As moléculas produzidas pelos mastócitos actuam localmente como secreções do tipo parácrino (Zorn, 2004).

2.1.2. Diferenciação

No Homem, os mastócitos desenvolvem-se a partir de progenitores hematopoiéticos pluripotentes da medula óssea, nomeadamente da subpopulação CD34⁺/c-kit⁺/CD13⁺, também identificados no sangue do cordão umbilical, sangue periférico e fígado fetal (Nilsson et al., 1993; Kirshenbaum et al., 1999; Arok, 2004). Enquanto que a maioria dos descendentes de células germinativas pluripotentes como eritrócitos, neutrófilos, basófilos ou eosinófilos, não deixam o tecido hematopoiético até que a sua diferenciação esteja completa, os mastócitos invadem o tecido conjuntivo e mucosas como células progenitoras morfológicamente não identificáveis, diferenciando-se nesses locais (Welle, 1997). Através

de experiências com ratinhos, concluiu-se que o receptor proteico da tirosina cinase c-kit (CD117), codificado pelo proto-oncogene *c-kit*, é fundamental na proliferação e diferenciação dos mastócitos. A ligação entre este último e o SCF “*stem cell factor*”, expresso nos fibroblastos, células endoteliais e outros tipos de células justapostas aos mastócitos nos tecidos periféricos (Boyce, 2010), é essencial para que estas células precursoras se diferenciem em mastócitos e para a sua sobrevivência quando células maduras. Outras citocinas que regulam a diferenciação e proliferação dependentes de SCF incluem a interleucina 3 (IL-3), IL-4, IL-5 e interferão- γ (INF- γ). A IL-3 partilha vias de transdução de sinais com o SCF, sendo ambos importantes na diferenciação e proliferação das células precursoras dos mastócitos (Durand et al, 1994). No entanto, apresenta poucos efeitos directos na proliferação de mastócitos humanos maduros (Kulka & Metcalfe, 2005). A IL-4 amplia a função dos mastócitos quando adicionada a culturas maduras. Por exemplo, a IL-4 aumenta a expressão de um receptor tetramérico Fc de alta afinidade para IgE, conhecido por Fc ϵ RI, por parte dos mastócitos e subseqüentemente potencia a desgranulação espontânea e a estimulada por antigénios. Se adicionada durante uma fase de diferenciação dependente de SCF, a IL-4 inibe a divisão celular e diminui o número final de mastócitos. Em mastócitos em desenvolvimento, a IFN- γ inibe a sua proliferação e influencia o seu fenótipo e funções, mas os seus efeitos são mínimos na activação de mastócitos maduros (Kulka & Metcalfe, 2005). Contrariamente a outras células hematopoiéticas maduras, os mastócitos ainda têm potencial proliferativo, embora, até à data, nunca tenham sido observadas mitoses nos tecidos (Welle, 1997).

2.1.3. Heterogeneidade

Em 1906, Maximow verificou que as células presentes no tracto intestinal de diversas espécies eram mais pequenas e continham menos grânulos que as mesmas células de outros locais, pelo que suspeitou da existência de uma população heterogénea de mastócitos (Welle, 1997). Esta hipótese veio a ser confirmada primeiro no ratinho, onde se demonstrou que as células da pele eram distinguíveis das das mucosas pelas suas características histoquímicas e imunohistoquímicas, o que levou ao termo de mastócitos do tecido conjuntivo (CTMC – “*connective tissue mast cells*”) e mastócitos das mucosas (MMC – “*mucosal mast cells*”) (Hill & Martin, 1998). Assim, encontramos os primeiros ao nível da pele, músculo e cavidade peritoneal, enquanto que os MMC predominam ao nível da mucosa do tracto gastrointestinal (Enerback, 1981 citado por Gibson & Miller, 1986).

Crê-se que ambos exibem funções diferentes. Por exemplo, no caso de uma infecção parasitária ou reacção alérgica, só os mastócitos das mucosas se encontram aumentados (Lutzelschwab, Lunderius, Enerbäck & Hellman, 1998; Miller, 1996) e no caso de doenças fibróticas aumenta o número de mastócitos do tecido conjuntivo (Carter & Metcalfe, 2007).

Em estudos realizados em ratinhos verificou-se que os mastócitos das mucosas são dependentes das células T, ao contrário dos mastócitos dos tecidos conjuntivos, sendo que, nos animais deficientes em células T, os mastócitos das mucosas apresentam-se em menor número durante infecções parasitárias (Mayrhofer & Fisher, 1979).

Outra diferença verificada nesta espécie, consiste na composição das suas proteases e proteoglicanos. No caso dos CTMC encontramos carboxipeptidase A, quimases mMCP-4 e mMCP-5 e triptases mMCP-6 e mMCP-7 (Braga et al., 2007) e catepsina G (Schechter et al., 1990). Os MMCs contêm as quimases mMCP-1 e mMCP-2. Relativamente aos proteoglicanos, identifica-se a heparina nos CMTCs e nos MMCs principalmente sulfato de condroitina, embora também contenham heparina em baixas quantidades (Braga et al., 2007). Um terceiro fenótipo foi descrito em mastócitos que se encontram na pele, linfonodos e submucosa intestinal que apenas contêm quimase (Carter & Metcalfe, 2007). Tanto em humanos como em ratinhos, as diferenças na expressão das proteases e proteoglicanos de acordo com a região anatómica em que se encontram, vêm também acompanhadas por heterogenidade das citocinas e eicosanóides produzidos (Boyce, 2010).

Nos mastócitos caninos também se faz a classificação dos mastócitos de acordo com a sua sensibilidade à formalina e presença de proteases; assim temos mastócitos contendo quimase (Mq) e mastócitos contendo quimase e triptase (Mtg). Em pele normal, fixada com formalina, predominam os Mtq, enquanto que na fixação com fixador de Carnoy predominam os Mq. Esta variação deve ser considerada quando é usada histoquímica para triptase para identificar mastócitos de cão (Gross et al, 2005).

Igualmente no gato foram identificados diferentes tipos de células. Mastócitos ricos em quimase foram encontrados na derme da orelha, a qual foi demonstrada em 99,6% destes, e ainda na submucosa e muscular do estômago e na submucosa do recto. O mesmo tipo de mastócitos não foi encontrado no coração, na muscular e serosa do duodeno, jejuno, íleo e recto, locais mais distantes do lúmen onde ocorre o contacto com antígenos (Noviana et al., 2001).

Quanto às células ricas em triptase, estas eram evidentes principalmente na pele da orelha, com 91,9% destas células contendo esta protease, e no baço, com uma prevalência de 89,5%. Também no coração se encontraram mastócitos positivos para a triptase. Exceptuando a submucosa do estômago, os mastócitos do tracto gastrointestinal demonstraram maior

atividade para a triptase que para a quimase. Comparativamente com o cão, também os gatos têm maior número de mastócitos na pele da orelha, pulmões, linfonodos, estômago e duodeno. Na orelha do gato o número de mastócitos encontrado foi muito superior ao encontrado no cão (Noviana et al., 2001).

Em relação ao estudo de mastócitos contendo tanto quimase como triptase, poucos estudos foram feitos uma vez que requerem uma técnica de dupla marcação nem sempre disponível. No entanto, a mesma foi realizada num estudo sobre patologia de eosinófilos em gatos que permitiam concluir que os mastócitos M₁ são o principal subtipo a nível da derme e subepiderme de gatos normais, coincidente com o que ocorre na pele do cão e do homem (Noli, Welle, Scarpella & Abramo, 2003).

Kitamura e co-autores, hipotetizaram que o desenvolvimento dos diferentes fenótipos se encontrava dependente do microambiente da região anatómica em que a sua diferenciação final tinha lugar. Esta teoria foi apoiada por estudos *in vivo* e *in vitro* que demonstraram que os mastócitos das mucosas podem diferenciar-se nos do tecido conjuntivo e vice-versa (Kitamura, Nakano, & Kanakura, 1986; Kitamura, Kanakura, Fujita & Nakano, 1987).

No ratinho veio a perceber-se que, entre os factores do microambiente que influenciavam a diferenciação destas células, se encontrava a IL-3, responsável pela diferenciação no subtipo das mucosas (Haig et al., 1988), e o SCF (Zsebo et al., 1990) e que também os fibroblastos desempenhavam um papel importante na diferenciação dos mastócitos no subtipo do tecido conjuntivo (Dayton et al., 1988).

2.1.4. Funções biológicas

Os mastócitos são as células efectoras primárias nas reacções inflamatórias mediadas pela imunoglobulina E (IgE). Estão implicadas tanto na resposta imune adquirida como na inata, na cicatrização, fibrose, angiogénese, doenças auto-imunes (Carter & Metcalfe, 2007), anafilaxia, urticária, angioedema e exacerbação da asma e são melhor conhecidos pelo seu papel nas reacções de hipersensibilidade do tipo I (alérgicas) (Boyce, 2010).

A activação dos mastócitos é iniciada pela ligação cruzada de alergenos multivalentes ao FcεRI, por via de moléculas de IgE monoméricas específicas associadas a membranas. O FcεRI é composto de uma subunidade α ligada a Fc, uma subunidade β e duas subunidades γ (Boyce, 2010) e, na maioria dos mamíferos, encontram-se entre 100.000 a 500.000 destes receptores na superfície externa dos mastócitos (Kalinin, 1979). Por meio da IgE, o FcεRI tem ligação cruzada com antigénios multivalentes resultando na transdução de sinais que

conduzem à fusão imediata de grânulos e sua exocitose, activação do metabolismo do ácido araquidónico e indução da transcrição de genes das citocinas e quimiocinas (Boyce, 2010).

A expressão de FcεRI na membrana dos mastócitos e basófilos está dependente da presença de IgE, sendo que, em ratinhos incapazes de produzir IgE, os mastócitos peritoneais têm níveis muito baixos de FcεRI que aumentam quando é administrada IgE exógena. Está também dependente de citocinas, sendo que a IL-4 conduz à transcrição de FcεRIα, proporcionando mais subunidades para expressão superficial. Este mecanismo actua em sinergia com a estabilização dos receptores por acção da IgE. Ambos os mecanismos amplificam a libertação de mediadores em resposta à ligação cruzada com FcεRI (Boyce, 2010). Sinais não mediados por IgE que activam os mastócitos incluem ligandos de receptores “*Toll-like*” tais como os lipopolissacáridos e ácidos nucleicos, certas citocinas e quimiocinas e anafilatoxinas C3a, C4a e C5a (Metcalf, Baram & Mekori, 1997).

Grânulos secretores contendo mediadores pré-formados são libertados em resposta à agregação do receptor de IgE, activação pelo sistema complemento ou por citocinas. A triptase é libertada aquando da activação dos mastócitos, junto com a histamina, heparina, quimase e carboxipeptidase A. A função da triptase não é ainda completamente conhecida mas pensa-se que é responsável pela activação de sistemas de cascatas proteicas, alterações na permeabilidade vascular e tónus do músculo liso das vias aéreas (Tam & Caughey, 1990). A triptase tem a capacidade de clivar a fibronectina (Lohi, Harvima & Keski-Oja, 1992), o péptido geneticamente relacionado com a calcitonina, o péptido intestinal vasoactivo (Tam & Caughey, 1990) e quinogénio (Walls, Bennett, Sueiras-Diaz, & Olsson, 1992). É também um factor de crescimento para as células epiteliais (Cairns & Walls, 1996) células do músculo liso das vias aéreas (Brown et al., 1995) e fibroblastos (Ruoss, Hartmann & Caughey, 1991). A triptase é usada como um parâmetro indirecto do número de mastócitos e sua activação, encontrando-se elevada em pacientes com mastocitose sistémica e em casos de anafilaxia (Schwartz, Yunginger, Miller, Bokhari & Dull, 1989).

A quimase é responsável pela conversão da angiotensina I em angiotensina II levando consequentemente a hipertensão em alguns indivíduos devido às propriedades vasoactivas desta (Caughey, Raymond & Wolters, 2000). A carboxipeptidase A é também responsável por esta conversão (Goldstein, Kaempfer, Kealey & Wintroub, 1989).

A histamina é armazenada em todos os mastócitos, assim como nos basófilos e é libertada com a activação destas células. Os seus efeitos biológicos são mediados através da activação dos receptores H₁, H₂, H₃ e H₄. Os receptores H₁ encontram-se nas células epiteliais, bem como nas células vasculares e perivasculares e medeiam a permeabilidade vascular, a contracção do músculo liso dos brônquios e intestinos, edema, prurido e rubor (Hill et al.,

1997). Os receptores H₂ estão presentes nas células epiteliais do tracto gastrointestinal e estão associadas à hipersecreção gástrica (Gantz et al., 1991). Os receptores H₃ encontram-se no cérebro e tracto gastrointestinal e podem estar associados a certos efeitos neurológicos como dores de cabeça (Lovenberg et al., 1999). Os receptores H₄ são expressos predominantemente nas células da medula óssea e estão também presentes nos eosinófilos e mastócitos (Liu et al., 2001). A sua função não está bem entendida nos seres humanos. Apesar da expressão destes receptores ser baixa na maioria dos tecidos, a sua presença nos mastócitos e eosinófilos e também nas células T, implica que têm um papel nas respostas inflamatória e imune (Dunford et al., 2006).

A heparina estabiliza e regula as proteases dos grânulos secretores. Adicionalmente, liga-se à antitrombina III, inibindo a activação da cascata de coagulação. É também responsável pela regulação e estabilização de citocinas e factores de crescimento. A heparina está também envolvida em fenómenos de diátese hemorrágica, osteopénia e osteoporose (Carter & Metcalfe, 2007).

Adicionalmente, os mastócitos activados secretam mediadores lipídicos sintetizados no momento, produtos do metabolismo de ácido araquidónico endógeno. Neste grupo incluem-se a prostaglandina D₂ (PGD₂), leucotrieno (LT) B₄ e LTC₄, uma molécula parente dos leucotrienos cisteínicos (cys-LTs) (Boyce, 2010) e factor de activação plaquetário (PAF). Estes mediadores têm efeitos profundos tanto na reacção alérgica imediata como na tardia (Carter & Metcalfe, 2007).

Os receptores para PGD₂ estão presentes nas células vasculares e perivasculares e medeiam efeitos como o broncospasmo, vasodilatação, permeabilidade vascular e inibição da agregação plaquetária (Metcalfe et al., 1997).

Os leucotrienos cisteínicos aumentam a permeabilidade vascular (Joris, Majno, Corey & Lewis, 1987) e causam broncoconstrição (Arm & Lee, 1993). Estes mediadores são também responsáveis por pápulas e eritema persistentes quando injectados por via intradérmica na pele humana (Maxwell, Atkinson, Spur, Lessof & Lee, 1990).

O PAF é um potente indutor de broncoconstrição mediada através de extravasão microvascular nas vias aéreas e subsequente desenvolvimento de edema submucoso. Muitas células sintetizam PAF, incluindo células endoteliais, neutrófilos e macrófagos. O PAF reproduz muitos aspectos da inflamação ao funcionar como um agente quimiotáctico dos eosinófilos (Chung & Barnes, 1991), neutrófilos (Shaw, Pinckard, Ferrigni, McManus & Hanahan, 1981) e mastócitos (Nilsson, Metcalfe & Taub, 2000).

Os mastócitos activados também produzem e libertam várias citocinas pró-inflamatórias durante um período de horas. Desta forma, o resultado da activação dos mastócitos inclui o

rápido desenvolvimento de extravasão de plasma, edema dos tecidos, broncoconstrição, recrutamento de leucócitos e inflamação persistente (Boyce, 2010). As citocinas podem também contribuir para os sintomas da mastocitose. O factor de necrose tumoral (TNF) provoca caquexia e instabilidade vascular. O factor de crescimento transformante- β (TGF- β) contribui para a fibrose dos tecidos, remodelação óssea anormal, osteopénia e eosinofilia (Valent et al., 2003).

A IL-4 está implicada na síntese de IgE e no desenvolvimento de um fenótipo de linfócito T *helper 2*. A IL-5 actua no recrutamento e sobrevivência dos eosinófilos que contribuem para a lesão tecidular. A IL-6 tem sido ligada à patogenia da osteoporose (Jilka et al., 1992) e encontra-se elevada em pacientes com mastocitose sistémica (Brockow et al., 2002; Theoharides, Boucher & Spear, 2002; Brockow, Akin, Huber & Metcalfe, 2005). Provas do papel dos mastócitos na imunidade inata são dadas pela produção de IL-1 β , IL-6 e outras quimiocinas na resposta a patogéneos e seus produtos (Lin, Garduno, Boudreau & Issekutz, 2002).

2.1.5. C-kit

O proto-oncogene celular *c-kit* foi primeiro identificado e clonado em 1987 (Yarden et al., 1987). Contudo, já em 1986 havia sido descoberto o seu homólogo viral *v-kit*, identificado como o gene transformado do sarcoma felino de Hardy-Zuckerman 4 (Besmer et al., 1986).

A proteína c-kit (também chamada de KIT ou CD117) é um produto do proto-oncogene *c-kit*, e é um receptor tirosina cinase tipo-III expresso pelos mastócitos e células progenitoras dos mastócitos e também expresso normalmente, no cão e gato, por células epiteliais da glândula mamária, células intersticiais de Cajal, oócitos, células do endométrio e células de Purkinje, bem como células neoplásicas no melanoma maligno, adenoma e carcinoma mamários, tumores do estroma gastrointestinal, carcinoma do ovário, carcinoma do endométrio, feocromocitoma e mastocitoma (Rodriguez-Cariño et al., 2009). É constituído por um domínio extracelular, contendo 5 pontes semelhantes a imunoglobulinas (IgD), uma região hidrofóbica transmembranar, e uma intracelular que inclui uma região justamembranar e um domínio cinase que é clivado por uma sequência de inserção em regiões ligantes a adenosina trifosfato (ATP) e fosfotransferase (Yarden & Ulrich, 1988; Isotani et al., 2006).

O c-kit tem um papel determinante durante o desenvolvimento fetal e a sua expressão é mantida nas células germinativas hematopoiéticas, mastócitos, linfócitos intraepiteliais, células germinativas, melanócitos e células intersticiais de Cajal, onde actua como um receptor de factor de crescimento celular (Gibson & Cooper 2002).

O ligando para o receptor c-kit, o SCF, também chamado factor de crescimento dos mastócitos, é uma citocina que, na pele, é produzida por fibroblastos, queratinócitos e células endoteliais (Rodríguez-Cariño et al., 2009) e que também surge ligada à membrana de mastócitos e outros tipos de células justapostas a estes nos tecidos periféricos (Boyce, 2010).

É um importante factor de crescimento celular dos mastócitos, promovendo a sua diferenciação a partir de células progenitoras CD34+ (Reber, Da Silva & Frossard, 2006) e tem múltiplos efeitos nestes, incluindo proliferação, maturação, migração, supressão da apoptose e adesão à fibronectina (Webster et al., 2004), levando à expressão e libertação de histamina, citocinas pró-inflamatórias e quimocinas. O SCF também induz adesão e activação dos eosinófilos por via da activação e desgranulação dos mastócitos (Lukacs et al., 1996) com produção de leucotrieno e quimocina CC (Oliveira et al., 2002). Encontra-se sobreexpressado em condições inflamatórias tanto *in vitro* como *in vivo*, em humanos e ratinhos. A inibição da via SCF/c-kit leva a uma diminuição significativa do número de mastócitos, à inibição da sua desgranulação e, conseqüentemente, à inibição de libertação de histamina, metabolitos de ácido araquidónico e serotonina. Diminui ainda a resposta excessiva das vias aéreas a alérgenos bem como a infiltração por eosinófilos (Reber et al., 2006).

Vários estudos têm sido feitos que demonstram a importância desta via. Duas estirpes de ratinhos de laboratório deficientes em mastócitos demonstraram ter mutações com perda de função no *locus W* onde reside o *c-kit*. Outra estirpe também deficiente nestas células tinha uma mutação com perda de função no *locus Steel* (Sl) que codifica a forma ligada à membrana do SCF. Uma vez que este é o ligando para o c-kit, estes defeitos moleculares definem os requisitos fundamentais para o desenvolvimento dos mastócitos (Boyce, 2010).

O SCF é expresso como uma proteína transmembranar glicosada que pode sofrer uma clivagem alternativa e dar origem a dois isómeros que diferem na ausência ou presença de um certo local de clivagem proteolítica específica (Huang, Nocka, Buck & Besmer, 1992). A isoforma contendo o local de clivagem sofre proteólise e torna-se solúvel após libertação da membrana plasmática, enquanto que a isoforma sem o dito local de clivagem continua associado à célula. A resposta a estas duas isoformas é também diferente. A estimulação com a isoforma solúvel leva a uma activação e autofosforilação do c-kit rápida e transitória, bem como a uma degradação rápida, ao passo que a estimulação com a isoforma associada à membrana leva a uma activação mais prolongada (Miyazawa et al., 1995; Rönnstrand, 2004).

Estudos *in vitro* usando mastócitos de ratinhos e humanos confirmam que o SCF solúvel protege os mastócitos da apoptose, induz a proliferação, pode induzir a migração e algum grau de activação e secreção independente do receptor de alta afinidade FcεR1 e do seu ligando IgE, importantes na resposta imunitária (Boyce, 2010).

2.1.6. Metaloproteinase-9

Esta metaloproteinase, que é também conhecida por gelatinase B pela sua capacidade de degradar gelatina, é uma enzima proteolítica, dependente de zinco, capaz de degradar matriz extracelular, o que inclui colagénio tipo IV e V, laminina, fibronectina. É capaz de clivar, além de substratos da matriz extracelular, moléculas da superfície das células, juntamente com proteínas pericelulares, regulando o comportamento celular de várias formas (McCawley & Matrisian, 2001; Sternlicht & Werb, 2001; Egeblad & Werb, 2002). Estes substratos incluem uma variedade de outras proteinases, inibidores de proteinases, factores de coagulação, moléculas quimiotácticas, factores de crescimento latentes, factores de crescimento ligados a proteínas, receptores da superfície celular e moléculas de adesão, influenciando assim diversos processos fisiológicos e patológicos. É produzida por queratinócitos, monócitos, macrófagos e muitas células malignas (Kerkelä & Saarialho-Kere, 2003) e encontra-se envolvida no desenvolvimento embrionário, cicatrização, ovulação, remodelação óssea e na função dos macrófagos e neutrófilos e a sua desregulação está envolvida em diversas doenças, nomeadamente metástases tumorais, artrite reumatóide, doença periodontal, úlceras gástricas e arteriosclerose (Kähäri & Saarialho-Kere, 1997; Westermarck & Kähäri, 1999).

A sua actividade está intimamente regulada pelos níveis de transcrição genética, pela activação de zimogénios por proteólise, por inibidores tecidulares de metaloproteinase e por um regulador de membrana, rico em cisteína, designado RECK (*reversion inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs*) (Yoon et al., 2003).

Para as células precursoras dos mastócitos, a MMP-9, parece ser essencial na invasão dos tecidos conjuntivos a partir dos vasos sanguíneos, onde completam a sua diferenciação. No processo da sua maturação, os mastócitos migram de encontro ao SCF expresso pelos fibroblastos. Como não foi encontrada actividade por parte da MMP-9 em culturas de mastócitos com mutações activas no gene *c-kit*, crê-se que o SCF é capaz de suprimir, pela sua ligação com o receptor *c-kit*, a produção de MMP-9 pelos precursores dos mastócitos (Tanaka, Arai, Kitamura & Matsuda, 1999).

No cão, verificou-se que as células do mastocitoma secretam metaloproteinases relacionadas com a progelatinase B que é directamente activada fora da célula pelas quimases entretanto libertadas pelas mesmas células. Esta via pode facilitar a invasão tumoral dos tecidos adjacentes e, nos mastócitos normais, pode ser responsável pela remodelação e reparação dos tecidos (Fang, Raymond, Lazarus & Caughey, 1996).

As metaloproteinases são o principal grupo de enzimas proteolíticas envolvidas na invasão tumoral, metástase e angiogénese tumorais (Westermarck & Kahari, 1999; Chang & Werb, 2001), sendo a MMP-2 e a MMP-9 abundantemente expressas em vários tumores malignos (Johnsen et al., 1998). Durante a progressão tumoral, a microecologia dos tecidos do hospedeiro é um factor determinante na evolução do tumor. A invasão ocorre na interface entre o hospedeiro e o tumor, onde este e as células do estroma trocam enzimas e citocinas que modulam a matriz extracelular local e estimulam a migração celular, por via da regulação da degradação da matriz, da adesão entre células e entre células e a matriz (Yoon et al., 2003). As metaloproteinases estão envolvidas na fuga ao sistema imunitário por estimulação de interacções entre células tumorais e plaquetas (Sawicki, Salas, Murat, Miszta-Lane & Radomski, 1997) e inibição das funções e da proliferação de células responsáveis do sistema imunitário como as células T e NK. A habilidade das células tumorais malignas para agregar plaquetas permite-lhes evadir-se ao sistema imunitário (Philippe et al., 1993). Outra vantagem deve-se ao facto destes agregados serem capazes de embolizar na microvasculatura num novo local de extravasão (Yoon et al., 2003). Além disso, ainda facilitam a extravasão das células tumorais (Mehta, 1984).

As MMP também medeiam a clivagem de IL-2R α o que diminui a capacidade proliferativa das células T (Sheu et al., 2001) e activam a TGF- β (Yu & Stamenkovic, 2000), um importante inibidor da resposta dos linfócitos T contra tumores (Gorelik & Flavell, 2001). A MMP-9 é capaz de clivar o domínio extracelular da ICAM-1, libertando-a da superfície celular e promovendo a resistência das células do tumor mamário às células NK (Fiore, Fusco, Romero & Stamenkovic, 2002).

Também desempenham um papel importante na angiogénese, sendo que a MMP-9 é responsável pela degradação da membrana basal, permitindo a migração das células endoteliais. Adicionalmente, tem efeitos sobre moléculas pro-angiogénicas e anti-angiogénicas. Isto mostra que a mesma tem importância tanto na angiogénese como na inibição da mesma, sendo o equilíbrio entre ambas as funções fulcral no desenrolar da angiogénese. Um estudo comprovou que a MMP-9 estava envolvida na libertação de VEGF-A (*vascular endothelial growth factor A*) (Bergers et al., 2000).

São ainda importantes no crescimento tumoral, uma vez que permitem a libertação de factores de crescimento da membrana das células por proteólise (Yoon et al., 2003).

No cão, foi comprovada a existência de um aumento drástico de actividade da proenzima MMP-9 em mastocitomas de grau III, comparativamente aos de grau II. Também se verificou um aumento drástico da sua actividade nos tecidos tumorais quando comparados com o estroma tecidual normal (Leibman et al., 2000).

2.2. Mastocitose e mastocitomas

A regulação do número de mastócitos nos tecidos depende tanto da taxa de produção dos seus precursores da medula óssea como do tempo de sobrevivência dos mastócitos maduros nos tecidos, pelo que a alteração de um destes factores pode resultar na sua sobreexpressão nos tecidos (Metcalf, Mekori & Rottem, 1995).

O termo mastocitose agrupa um conjunto heterogéneo de doenças caracterizado pelo crescimento e concentração anormais de mastócitos num ou mais órgãos. Os mastócitos derivam de progenitores hematopoiéticos, logo, a mastocitose representa uma anomalia hematopoiética. A manifestação da doença pode ir desde lesões cutâneas, que podem regredir espontaneamente, até neoplasias altamente agressivas com envolvimento multissistémico e curtos tempos de vida (Valent et al., 2001a).

Na mastocitose cutânea, os mastócitos encontram-se confinados à pele; a mastocitose sistémica é caracterizada pelo envolvimento de, pelo menos, um órgão extracutâneo, com ou sem evidência de infiltração cutânea (Valent et al., 2001a).

Nos últimos anos têm sido propostas várias classificações para este conjunto de doenças, mas nenhuma tem sido universalmente aceite. A proposta adoptada pela OMS é um sistema de classificação consensual desenvolvido em 2000. Este tem em conta não só aspectos morfológicos mas também parâmetros clínicos e tenta ser flexível o suficiente para incorporar nova informação molecular emergente para estas doenças (Valent et al., 2001a).

Assim a mastocitose nos seres humanos está dividida nos seguintes tipos: mastocitose cutânea (incluindo nesta os subtipos urticaria pigmentosa, mastocitose cutânea maculopapular, mastocitose cutânea difusa e o mastocitoma cutâneo), mastocitose sistémica indolente, mastocitose sistémica com uma alteração hematológica clonal não mastocitária, mastocitose sistémica agressiva, leucemia mastocitária, sarcoma mastocitário e mastocitoma extra-cutâneo (Valent et al., 2001b).

Os mastocitomas cutâneos e a mastocitose sistémica e cutânea podem ser encontrados nos gatos e nos cães (Gross et al., 2005), assim como uma forma rara de mastocitoma gastrointestinal (Tamm & Vail, 2007; Rogers, 2009).

O mastocitoma cutâneo é diagnosticado menos frequentemente que em cães e permanece um dos tumores da pele mais comuns em gato, juntamente com o carcinoma escamoso e o fibrossarcoma, representando 12% a 20% das neoplasias que afectam a pele desta espécie. Em felinos, a mastocitose sistémica e o linfoma estão descritos como os dois tumores hematopoiéticos mais comuns do baço, sendo o mastocitoma intestinal o terceiro tumor mais comum do intestino a seguir ao linfoma e adenocarcinoma (Rogers, 2009).

2.2.1. Etiopatogenia

A etiologia do mastocitoma é desconhecida. Têm sido observadas partículas virais em amostras de tecido de mastocitoma felino, mas estes não proliferaram em cultura de tecidos nem demonstraram transmissibilidade a outros gatos, ratinhos ou hamsters. Não foi relatada nenhuma associação ao FeLV ou ao PIF (Tamm & Vail, 2007). Foi feita, no entanto, uma associação entre a infecção por FIV e o desenvolvimento de tumores cutâneos múltiplos, que se hipotetizou ser devida a imunossupressão associada ao FIV (Barr et al., 1993; Wilcock et al., 1986). Foi proposta a hipótese de predisposição genética devido à alta incidência em gatos Siameses, sobretudo da variante histiocítica (Wilcock et al., 1986).

Nos seres humanos e em cães foram detectadas mutações no domínio cinase do *c-kit* associadas à proliferação anormal de mastócitos (Nagata et al., 1995; Longley et al., 1996; London et al., 1999). Também foi identificada no gato uma duplicação em tandem numa sequência de 12 pares de bases, na região correspondente ao exão 8, que se considerou contribuir para a transformação neoplásica dos mastócitos no gato por aumento da fosforilação do *c-kit* (Isotani et al., 2006; Hadzijusufovic et al., 2009).

Devido à heterogenidade que esta doença apresenta e à incapacidade em comprovar a existência de mutações em alguns casos de medicina humana (Longley et al., 1996), duvidou-se que estas mutações pudessem, isoladamente, explicar a doença. Uma das hipóteses formuladas envolve a mudança da distribuição das isoformas de SCF em casos de mastocitose cutânea. Enquanto que nos tecidos normais, vemos sobretudo a isoforma associada às membranas, neste caso dos queratinócitos, nas situações de mastocitose surge principalmente a isoforma solúvel de SCF entre estas células. Igualmente, notou-se nestes pacientes hiperpigmentação, que não podia ser explicada apenas por mutações no *c-kit* já que estas não afectam directamente a produção de melanina pelos melanócitos. Assim julga-se que a proliferação dos mastócitos, devida à mutação do *c-kit*, induz a libertação da isoforma de SCF ligada à membrana dos queratinócitos (Longley et al., 1993). O SCF solúvel resultante pode, de seguida, estimular os melanócitos a produzir melanina e estimular mais ainda a proliferação de mastócitos. A suportar esta teoria, está o facto de que a enzima quimase, produzida pelos mastócitos, é capaz de clivar especificamente o SCF, libertando um fragmento solúvel e bioactivo (Longley et al., 1997).

2.2.2. Mastocitoma cutâneo felino

A incidência de mastocitoma em gatos documentada na maioria dos relatos varia entre 8% a 15% dos tumores cutâneos (Buerger & Scott, 1987). Outro estudo relatava uma incidência de 21% numa população de 340 gatos (Miller et al., 1991).

São mais frequentemente diagnosticados em gatos de meia-idade (entre 9 a 11 anos em média) (Gross et al., 2005), tendo a maioria dos gatos mais de 4 anos (Goldshmidt & Hendrick, 2002; Gross et al., 2005), e não se regista predisposição sexual. Os gatos Siameses parecem estar mais representados em alguns estudos (Tamm & Vail, 2007; Miller et al., 1991), incluindo a rara variante histiocítica, que surge em gatos de 6 semanas de idade até 4 anos (Wilcock et al., 1986), sendo a média cerca de 2,4 anos (Miller et al., 1991; Buerger & Scott, 1987). Os tumores multicêntricos são muito mais comuns no gato que no cão (Goldshmidt & Hendrick, 2002).

A cabeça, pescoço e membros são os locais mais afectados (Buerger & Scott, 1987); a cabeça, tronco e face dorsal da cauda foram relatados como os mais comuns num outro estudo (Macy & Reynolds, 1981). São, frequentemente, tumores solitários, sendo que os tumores múltiplos apenas se encontram em 10 a 43% dos casos (Buerger & Scott, 1987; London & Seguin, 2003; Rodriguez- Cariño et al., 2009).

Os mastocitomas felinos incluem desde tumores bem diferenciados, a atípicos pouco granulados também chamados de histiocíticos (Wilcock et al, 1986), e a pleomórficos (Johnson et al, 2002). O sistema de gradação de Patnaik, Ehler e MacEwen (1984) utilizado para o cão, não permite extrair informação útil para o prognóstico no caso do gato (Molander-McCrary et al., 1998).

2.2.2.1. Aspectos clínicos e características macroscópicas

O mastocitoma felino apresenta-se como uma pápula ou nódulo discreto, firme, acastanhado e alopecico, que pode ter desde alguns milímetros até 2 cm de diâmetro. Podem desenvolver-se nódulos solitários ou múltiplos. Lesões de maiores dimensões encontram-se muitas vezes ulceradas. O mastocitoma atípico pouco granulado, também descrito como histiocítico, ocorre como lesões nodulares ou papulares agrupadas, geralmente na cabeça (Wilcock et al., 1986).

As metástases são menos comuns no gato que no cão mas, quando ocorrem, surgem principalmente nos linfonodos regionais. Em vários estudos, poucos gatos demonstraram metástases e a ocorrência de recidivas na pele foi registada num terço a um meio dos animais estudados. Ocasionalmente, as lesões cutâneas podem representar metástases da forma

visceral da doença e é recomendado que, qualquer gato com lesões cutâneas múltiplas, seja avaliado para esta hipótese (Rogers, 2009).

Trauma ligeiro, incluindo coçar ou esfregar as lesões, normalmente causa eritema e prurido em torno das máculas, conhecido como sinal de Darier (Carter & Metcalfe, 2007).

2.2.2.2. **Histiopatologia**

a) Mastocitoma bem diferenciado

Apresenta-se como massas a nível da derme com demarcação variável e não encapsuladas que podem, ocasionalmente, estender-se ao tecido subcutâneo. Normalmente, existe uma fina banda de derme superficial não envolvida em seu redor, conhecida por zona de Grenz. Em alguns casos, as células tumorais podem atingir a junção dermo-epidérmica e estão mesmo descritos dois casos de invasão da epiderme, com agregados de 3 a 5 células distribuídos por esta, pelas bainhas foliculares e glândulas anexas (Buerger & Scott, 1987; Lamm et al., 2009). Pode estar presente um número variável de eosinófilos que é, no entanto, normalmente reduzido. Podem também ser observados linfócitos (Marcos, R., Santos, M., Pissarra, H. & Peleteiro, M. C., 2011).

Os tumores são compostos de infiltrados, por vezes compactos, de células redondas uniformes com discretos limites citoplasmáticos. O citoplasma tem granulação variável e pode surgir eosinófilico, acizentado. Os grânulos, embora finos, são geralmente reconhecidos sem colorações específicas. São corados metacromaticamente de púrpura com o azul de toluidina ou Giemsa. O núcleo encontra-se centrado ou ligeiramente desviado do centro da célula e é redondo com cromatina ligeiramente reticulada. O pleomorfismo nuclear está ausente ou é mínimo. Os nucléolos são de difícil visualização e as figuras mitóticas raramente são observadas. Trata-se, portanto, de um tumor característico e cuja diferenciação de outros tumores de células redondas não apresenta problema (Gross et al., 2005).

b) Mastocitoma atípico, pouco granuloso ou histiocítico

A forma histiocítica de mastocitoma felino é pouco comum e representa um desafio de diagnóstico para o patologista (Buerger & Scott, 1987; Chastain, Turk & O'Brien, 1988).

Estas proliferações de mastócitos são pequenas, não encapsuladas e surgem como nódulos a nível subcutâneo e da derme profunda, constituídos por infiltrados de grandes células poligonais a fusiformes, que podem lembrar histiócitos. Os núcleos são grandes, vesiculares e

podem ser ligeiramente indentados. Os nucléolos são pequenos e a actividade mitótica é baixa. As células tumorais têm um citoplasma eosinofílico amplo, que pode conter vacúolos. A granulação citoplasmática pode ser enganadora quando avaliada com coloração de hematoxilina-eosina (HE). A maioria das células tem grânulos ortocromáticos (azuis) quando corados por Giemsa ou azul de toluidina. Algumas células tumorais têm granulação púrpura metacromática fraca, indicando a sua origem mastocitária. Apenas 20% das células presentes se identificam facilmente como sendo mastócitos. Contudo, com o auxílio do microscópio electrónico, torna-se possível evidenciar grânulos típicos dos mastócitos que identificam as células de aspecto histiocitário como tal (Wilcock et al., 1986). Os eosinófilos tendem a ser mais numerosos que nos mastocitomas bem diferenciados (Gross et al., 2005).

Podem ser diagnosticados como uma inflamação granulomatosa (Goldshmidt & Hendrick, 2002), paniculite nodular granulomatosa ou dermatite profunda, quando observados por patologistas menos familiarizados com esta forma da doença (Tamm & Vail, 2007). Devem também ser diferenciados de lesões histiocíticas e xantomias cutâneas. A presença de grânulos metacromáticos, quando observados com azul de toluidina ou Giemsa, confirma a sua origem mastocitária. Os xantomias podem conter também eosinófilos, mas geralmente estão associados a linfócitos e neutrófilos, acompanhados por macrófagos que contêm numerosos vacúolos lipídicos. Pode ser necessário recorrer a técnicas de imunohistoquímica para distinguir entre proliferações histiocíticas e mastocitomas atípicos pouco granulados (Gross et al., 2005).

c) Mastocitoma pleomórfico

Uma pequena percentagem de mastocitomas felinos exhibe marcado pleomorfismo. Estas neoplasias pouco diferenciadas são geralmente maiores, menos discretas e infiltram mais profundamente os tecidos subjacentes. É evidente a perda parcial ou total das granulações citoplasmáticas com técnicas de rotina como a coloração HE, assim como com o azul de toluidina. Os poucos grânulos metacromáticos que possam estar presentes são muito delicados, e a alta ampliação do microscópio pode ser necessária para a sua detecção. Os núcleos são grandes e geralmente têm uma localização excêntrica e padrões variáveis de cromatina, e um só nucléolo que varia de quase indetectável a proeminente. A actividade mitótica pode ser moderada ou alta. Podem ser observadas células gigantes tumorais com um único núcleo multilobulado ou múltiplos núcleos (Gross et al., 2005).

Estes tumores devem ser diferenciados de outros tumores cutâneos de células redondas, tais como o linfoma não-epiteliotrópico, plasmocitoma, alguns melanomas amelanóticos e todas as neoplasias histiocitárias. Na maioria dos casos, as colorações por Giemsa ou azul de toluidina revelam granulações metacromáticas em, pelo menos, uma pequena subpopulação de células tumorais. O linfoma não-epiteliotrópico é composto sobretudo de células redondas com elevada relação núcleo/citoplasma, por vezes com formação de chanfraduras nucleares. Os plasmocitomas têm citoplasma menos abundante; a elevada concentração de RNA citoplasmático cora de magenta com a coloração de verde metil pironina. Pequenos números de plasmócitos bem diferenciados podem ser, por vezes, identificados e pode estar presente substância amilóide. Nos melanomas amelanóticos do gato, as células têm um citoplasma eosinofílico abundante e um núcleo pleomórfico e excêntrico. Podem ser observados alguns grânulos de melanina com recurso à técnica de Fontana-Masson. As neoplasias histiocitárias são caracterizadas pela proliferação de grandes células com citoplasma eosinofílico abundante e núcleos normalmente indentados (Gross et al., 2005).

2.2.3. Mastocitose cutânea felina

Nos seres humanos a mastocitose é dividida, consoante a idade, em forma adulta e pediátrica (Longley & Metcalfe, 2000; Valent et al., 2001a; Wolff, Komar & Petzelbauer, 2001) e pode tratar-se de uma hiperplasia de mastócitos auto-limitante ou de uma doença maligna progressiva. A maioria dos casos pediátricos não tem envolvimento sistémico e, no geral, tem uma maior incidência de regressão espontânea (Valent et al., 2001a).

Pode apresentar-se nos seres humanos como urticaria pigmentosa (também referida como mastocitose cutânea maculopapular) ou mastocitose cutânea difusa (Valent et al., 2001a). A urticaria pigmentosa é caracterizada por nódulos ou placas que podem estar associados a telangiectasia. A mastocitose difusa está associada a pele espessada de forma difusa, que pode ter superfície lisa (Gross et al., 2005).

Apesar de poder existir envolvimento cutâneo, a maior parte dos relatos de mastocitose em cão e gato descreve mastocitose sistémica afectando vários órgãos internos com ou sem mastocitemia (Weller, 1978; O'Keefe, Couto, Burke-Schwartz & Jacobs, 1987). Alguns casos de mastocitose cutânea primária maculopapular, semelhantes à urticaria pigmentosa em humanos, foram descritos em cão e gato (Davis, Page, Sannes & Meuten, 1992; Vitale, Ihrke, Olivry & Stannard, 1996). Um caso de mastocitose cutânea relatado em gato é consistente com mastocitose difusa como é descrita em humanos (Brown & Chalmers, 1990).

2.2.3.1. Aspectos clínicos e características macroscópicas

A mastocitose cutânea maculopapular é rara no gato (Vitale et al., 1996) e a mastocitose cutânea difusa foi reconhecida em apenas um caso (Brown & Chalmers, 1990). A primeira foi observada em três gatos da raça Esfinge, aparentados (Vitale et al., 1996), e cinco gatos da raça Devon Rex, sem qualquer parentesco (Noli et al., 2004). A primeira é uma raça sem pêlo e a segunda é hipotricótica, pelo que se hipotetizou que estas raças estivessem predispostas ou que, noutras raças com mais pêlo, a doença não fosse reconhecida (Noli et al., 2004).

Relativamente às lesões, foram observadas máculas castanho escuras, parcialmente simétricas, coalescentes com eritema e pápulas miliares, crostosas no ventre, peito, pescoço e extremidades. As lesões tinham uma apresentação linear e a pele encontrava-se espessada e liquenificada. Não havia dermatografismo. Foi observado prurido generalizado e linfadenopatia moderada. A idade dos três gatos Esfinge estava compreendida entre os 8 meses e 2,5 anos (Vitale et al., 1996) e a dos Devon Rex entre as 3 semanas e 10 meses (Noli et al., 2004).

O único caso de mastocitose cutânea difusa foi relatado num gato de raça indefinida de um ano de idade (Brown & Chalmers, 1990). Foram observadas pápulas crostosas, miliares, com alopecia e erosões. A pele apresentava-se difusamente liquenificada e notavam-se dobras de pele espessas. Havia linfadenopatia periférica moderada generalizada. Foram observados mastócitos na camada leucoplaquetária, mas não foi encontrado envolvimento de órgãos internos. O animal em causa foi eutanasiado (Gross et al., 2005).

2.2.3.2. Histopatologia

a) Mastocitose cutânea maculopapular (“urticaria pigmentosa”)

As lesões desta forma são caracterizadas por infiltração, moderada a severa, de mastócitos bem diferenciados que podem estender-se da derme superficial até à derme profunda, com um arranjo perivascular ou difuso. Os mastócitos são caracterizados por um núcleo central e citoplasma granular. As figuras mitóticas são raras. Pequenos números de eosinófilos e neutrófilos podem ser encontrados, bem como agregados linfóides (Gross et al., 2005).

Com envolvimento dos linfonodos, numerosos mastócitos podem ser detectados na região paracortical e seios subcapsulares. Os mastócitos migrantes são bem diferenciados e têm citoplasma granulado (Gross et al., 2005).

A mastocitose cutânea maculopapular caracteriza-se pelos seus mastócitos bem diferenciados e o diagnóstico definitivo não levanta normalmente problemas. Ligeiras alterações precoces, caracterizadas por agregados de mastócitos perivasculares, devem ser diferenciadas de reacções de hipersensibilidade, as quais contêm também numerosos mastócitos (Gross et al., 2005).

b) Mastocitose cutânea difusa

O único caso de mastocitose cutânea difusa relatado dizia respeito a uma gata de pêlo curto, com cerca de um ano, e esterilizada. O estímulo iatrotópico era prurido com 9 meses de duração e tinha uma lesão papulosa na orelha esquerda, que se desenvolveu em lesões pruríticas papulocrostosas na cabeça e pescoço, que progrediram e acabaram eventualmente por envolver todo o corpo. O animal apresentava, além de lesões papulocrostosas miliares, alopecia, eritema, escoriações e liquenificação difusa da pele (Brown & Chalmers, 1990).

Microscopicamente, verificou-se que ambas as orelhas continham grande infiltrado de mastócitos na derme, de ambos os lados da cartilagem auricular. Estes eram poligonais com núcleos redondos e vesiculares e citoplasma granular, eosinofílico abundante. Os grânulos apresentavam metacromasia quando corados por azul de toluidina e Giemsa. Eram comuns os mastócitos bi- e tri-nucleados e, por vezes, observavam-se mitoses. O tecido subcutâneo e derme em redor evidenciavam edema. Os linfonodos periféricos encontravam-se infiltrados por grande número de mastócitos que se apresentavam em bandas subcapsulares e em todo o paracórtex e medula. Estas células exibiam moderada anisocariose, sendo comuns os mastócitos multinucleados. Estas células eram semelhantes às encontradas na variante pleomórfica do mastocitoma felino (Brown & Chalmers, 1990), em contraste com a forma maculopapular, na qual as células são bem diferenciadas (Gross et al., 2005).

2.2.4. Mastocitoma extracutâneo

2.2.4.1. Mastocitose sistémica

A mastocitose sistémica envolve tipicamente baço, fígado e linfonodos abdominais. Uma forma esplénica, por vezes referida como linforreticular, é o diagnóstico diferencial mais comum para a doença esplénica em gatos, representando 15% de 455 casos submetidos num estudo (Spangler & Culberston, 1992). A idade dos gatos afectados varia entre 4 e 17 anos,

sendo a média de aproximadamente 10 anos. Não é conhecida uma predisposição racial ou sexual (Carpenter, Andrews & Holzworth, 1987; Tamm & Vail, 2007; Rogers, 2009).

A histopatologia revela células bem ou pouco diferenciadas. No baço, os mastócitos neoplásicos distendem a polpa vermelha mas os folículos linfóides encontram-se normalmente preservados. Em 15% dos casos, as células tumorais formam nódulos na polpa vermelha. É frequente observar-se hemorragia, necrose e fibrose. Em 65% dos casos, nódulos discretos também rodeiam as veias centrais ou a tríade portal. Nos linfonodos, as células tumorais podem distender os seios subcapsulares e medulares. Embora os centros germinativos se encontrem geralmente intactos, os linfonodos são ocasionalmente substituídos por células tumorais. A fibrose é comum em linfonodos gravemente afectados (Carpenter et al., 1987).

2.2.4.2. Mastocitoma gastrointestinal

Esta forma de mastocitoma é pouco frequente e surge primeiro no intestino delgado. É, no entanto, o terceiro tumor primário intestinal em gatos, a seguir ao linfoma e adenocarcinoma (Carpenter et al., 1987). Não é conhecida uma predisposição racial ou sexual. Parece haver maior risco para gatos idosos (idade média de 13 anos) (Laurenson, Skorupski, Moore & Zwingenberger, 2011), mas tem sido relatado em gatos com 3 anos (Tamm & Vail, 2007). Ao contrário dos cães, gatos com a forma visceral não têm, muitas vezes, um historial de mastocitoma cutâneo. Está mais comumente presente no intestino delgado (igualmente dividido entre o duodeno, jejuno e íleo); o envolvimento do cólon foi referido em menos de 15% dos casos (Tamm & Vail, 2007). A maioria destes tumores são solitários, mas também têm sido relatados tumores múltiplos. Estes são geralmente pouco diferenciados e pode ser difícil chegar a um diagnóstico definitivo, particularmente com recurso apenas à citologia. Os locais de metástase relatados incluem os linfonodos locais, fígado, baço, medula óssea e pulmões (Rogers, 2009).

Os mastócitos destes tumores são menos diferenciados que nos tumores cutâneos e podem organizar-se como agregados de células fusiformes com limites citoplasmáticos indefinidos ou de células poligonais fusiformes, com 10 a 20 µm de diâmetro e limites citoplasmáticos indefinidos, dispostas de forma compacta. As células possuem um núcleo em posição excêntrica, de forma oval ou indentada, e hipercromático. A cromatina pode encontrar-se em posição marginal e o nucléolo pode ser proeminente. O citoplasma é vacuolado ou granular e rosa claro ou transparente. Os grânulos podem ser difíceis de identificar, mesmo com corantes metacromáticos (Alroy et al., 1975 citado por Carpenter et al., 1987).

As células tumorais infiltram-se por entre as células do músculo liso da túnica muscular. O tecido linfóide associado às mucosas (GALT pode encontrar-se rodeado pelo tumor mas raramente se encontra invadido. Por vezes o tumor, pode estender-se à lâmina própria, mas não ocorre ulceração da mucosa. A fibrose é comum e podem observar-se alguns eosinófilos (Alroy et al., 1975 citado por Carpenter et al., 1987).

2.2.4.3. Sinais clínicos das formas extracutâneas

Sinais sistémicos acompanham sobretudo as formas sistémica e gastrointestinal da doença, uma vez que a forma cutânea muito raramente tem repercussões do ponto de vista clínico (Wilcock et al., 1986, Johnson et al. 2002).

Clinicamente, a doença oncológica é normalmente acompanhada por activação e desgranulação dos mastocitomas, incluindo ulceração gastrointestinal (Seawright & Grono, 1964; Hasler & van den Ingh, 1978; Howl & Petersen, 1995), problemas de coagulação e reacções anafiláticas (Tamm & Vail, 2007). Adicionalmente, verificou-se que os mastócitos felinos têm capacidade para fagocitar os eritrócitos tanto em modelos experimentais como em patologia espontânea (Madewell, Gunn & Gribble, 1983; Madewell, Munn & Philips, 1987).

Os sinais clínicos da forma sistémica da doença incluem massa intra-abdominal visível ou palpável, vômito com ou sem conteúdo hemorrágico, perda de peso, anorexia, desconforto abdominal, ascite e letargia. Os sinais gastrointestinais devem-se ou à ocupação de espaço por uma grande massa ou à libertação de histamina com conseqüente ulceração gástrica. Uma crise abdominal aguda pode ocorrer por perfuração intestinal secundária a ulceração ou por ruptura de baço. Em até 50% dos casos podem surgir alterações laboratoriais como anemia e mastocitemia, bem como presença de mastócitos no líquido de derrame cavitário (Rogers, 2009).

Na forma gastrointestinal podemos encontrar vômito, diarreia, anorexia e perda de peso. A ulceração não é comum, pelo que o vômito deve-se provavelmente a obstrução mecânica (Rogers, 2009).

2.2.5. Diagnóstico

As técnicas de diagnóstico usadas em cão são semelhantes para o gato, com a citologia e histopatologia sendo as mais úteis. Algumas células possuem finos grânulos difíceis de observar, mesmo com colorações específicas, tais como o azul de toluidina ou o Wright-Giemsa. Tem sido sugerido que o exame da camada leucoplaquetária possa ser um teste de

estadiamento mais fiável para os gatos que para os cães, uma vez que não foram encontrados mastócitos circulantes em gatos clinicamente normais ou com doença não relacionada com mastocitoma (Rogers, 2009).

A citologia do baço, fígado, linfonodos abdominais e medula óssea, demonstra infiltrados de mastócitos típicos e, ocasionalmente, observa-se eritrofagocitose por parte das células neoplásicas. Está recomendado o uso de anti-histamínicos antes de se realizar uma citologia por aspiração do baço. Uma agulha de 25 gauge permite uma colheita adequada de células, minimizando o risco de hemorragia e desgranulação (Rogers, 2009).

Radiografias abdominais e torácicas ou ultrassonografia podem demonstrar um aumento do baço, fígado ou linfonodos mesentéricos e podem ajudar na citologia ecoguiada destes órgãos. A radiografia torácica pode também ser útil na identificação de derrames pleurais que ocorrem em cerca de um terço dos casos de mastocitose sistémica. Pode ainda ser útil, realizar a toracocentese ou abdominocentese destes líquidos de derrame para avaliar o tipo de células presentes (Rogers, 2009).

Quando se suspeita de disseminação da doença, deve ser feito um hemograma, esfregaço da camada leucoplaquetária, citologia de medula óssea, avaliação de perfis de coagulação e análise bioquímica sanguínea. Um terço dos gatos com doença visceral (i.e. formas sistémica e gastrointestinal) demonstram anemia e cerca de 40% dos gatos com mastocitose sistémica têm envolvimento da medula óssea e da camada leucoplaquetária. A mastocitose periférica pode ser muito grave, com contagens de cerca de 32.000 células/ μ l (Carpenter et al., 1987). Ao contrário da forma sistémica, o mastocitoma gastrointestinal não está normalmente associado a mastocitose periférica e eosinofilia é relatada raras vezes (Bortnowsky & Rosenthal, 1992; Peaston & Griffey, 1992). Num estudo com 43 gatos com mastocitoma sistémico, 90% tinha alterações do perfil de coagulação. Embora raramente isto tenha relevância clínica, deve ser tido em conta como precaução pré-operatória se se efectuar a cirurgia (Feinmehl et al., 1992 citado por Tamm e Vail, 2007). Também foi observada hiperglobulinémia. Embora se desconheça a causa, verificou-se que o dicloridrato de histamina provoca o aumento da alfa-2-globulina, pelo que se hipotetizou que a histamina produzida pelas células tumorais pudesse estar na origem destas alterações nas proteínas séricas. A histamina também pode induzir os linfócitos B a produzir níveis de anticorpos suficientemente elevados para causar hipergamaglobulinémia. As alfa-globulinas também se encontram aumentadas pela destruição tecidual, comum nos mastocitomas. Nas lesões hepáticas associadas ao mastocitoma metastático as alfa e beta-globulinas podem encontrar-se elevadas (Carpenter et al., 1987).

Como diagnósticos diferenciais de esplenomegália em gato, devemos considerar o linfoma, doença mieloproliferativa, hemangiossarcoma, baço acessório, nódulos hiperplásicos e esplenite (Spangler & Culbertson, 1992). Os dois diagnósticos diferenciais mais comuns para massas intestinais em gatos idosos são o linfoma e adenocarcinoma (Carpenter et al., 1987).

Pode ser necessária uma ecografia abdominal para determinar a extensão de envolvimento intestinal e o tamanho dos linfonodos, bem como detectar disseminação visceral. Embora a maioria dos mastocitomas intestinais sejam palpáveis ou visíveis nas radiografias e exames ecográficos abdominais, a laparotomia exploratória pode ser necessária como meio de diagnóstico definitivo (Tamm & Vail, 2007). Por ultrassonografia, é ainda possível distinguir entre duas formas de mastocitoma esplénico: uma difusa e outra nodular, menos comum (Hanson, Papageorges, Girard, Menard & Hebert, 2001).

2.2.6. Imunofenotipagem por imunohistoquímica

Em estudos prévios no cão, envolvendo o receptor de membrana c-kit, verificou-se a existência de diferentes padrões de expressão desta proteína e uma correlação inversa entre a intensidade de expressão desta proteína e o grau de diferenciação (Reguera et al., 2000), bem como uma relação entre o padrão de expressão e o grau histológico, provando que pode tornar-se numa importante ferramenta como factor de prognóstico no cão. Estes padrões foram definidos como membranar (padrão I), focal ou perinuclear (padrão II) e citoplasmático difuso (padrão III) (Preziosi et al., 2004). De facto, é sabido que numerosas mutações no *c-kit* foram descritas na progressão de mastocitomas no homem e cão com localização aberrante de c-kit. Uma possível explicação para este fenómeno é que as células que apresentam c-kit no seu citoplasma estão a sintetizar este receptor activamente que, mais tarde, migra para a membrana celular (Rodriguez-Cariño et al., 2009). Alternativamente, também é possível que o c-kit se encontre maioritariamente na forma activada nestas células, devido a mutações que causam a sua fosforilação, interferindo na migração desta molécula a nível intracelular e promovendo a sua acumulação em organelas como o aparelho de Golgi ou o retículo endoplasmático (Gil da Costa, Matos, Rema, Lopes, Pires & Gärtner, 2007). Embora no gato, como foi antes referido, o sistema de Patnaik não possa ser utilizado, também foram verificados estes padrões de expressão. Na forma bem diferenciada do mastocitoma cutâneo felino observou-se predominantemente o padrão membranar (padrão I) e citoplasmático difuso (padrão III), enquanto que na forma atípica verificou-se sobretudo uma marcação citoplasmática difusa (Rodriguez-Cariño et al., 2009). O c-kit, sendo uma proteína transmembranar, encontra-se na membrana celular dos mastocitócitos normais de cão e gato

bem como nas células neoplásicas dos mastocitomas bem diferenciados do cão (Reguera et al., 2000; Webster et al., 2004; Morini, Bettini, Preziosi & Mandrioli, 2004; Rodriguez-Cariño et al., 2009). No gato, parece que a proteína c-kit pode também estar presente no citoplasma de alguns mastócitos. No entanto, em trabalhos anteriores (Morini et al., 2004; Rodriguez-Cariño et al., 2009), não foi possível estabelecer qualquer relação entre o tipo de mastocitoma e a expressão de c-kit nesta espécie.

2.2.7. Tratamento

A cirurgia é o tratamento de eleição para a forma bem diferenciada do mastocitoma cutâneo em gatos. Uma vez que esta neoplasia tem na generalidade, comportamento benigno, a dimensão das margens cirúrgicas pode não ser tão crítica como é o caso do cão. Isto é conveniente dado que a maioria destes tumores surgem na cabeça, onde tais margens seriam difíceis de assegurar. As incidências de recorrência local e disseminação sistémica variam muito na literatura. As taxas de recorrência local após excisão cirúrgica estão relatadas entre 0 a 24% (Buerger & Scott, 1987; Wilcock et al., 1986; Johnson et al., 2002). A recorrência, quando ocorre, normalmente é notada num espaço de 6 meses. Para tumores pleomórficos, uma abordagem cirúrgica mais agressiva, semelhante à usada nos mastocitomas caninos, deve ser feita, uma vez que as taxas de recorrência local e metástases associadas a este tipo de tumor são mais altas. No caso da variante histiocítica dos gatos jovens com massas múltiplas, pode ser feita uma ressecção conservativa ou eventualmente “esperar para ver”, dado que muitos dos casos relatados regridem espontaneamente (Miller et al., 1991).

Se os tumores forem removidos incompletamente, ou houver evidência de doença sistémica, estão aconselhadas a quimioterapia e radioterapia. Uma vez que a vinblastina e a lomustina (CCNU) são agentes activos nos mastocitomas caninos, podem também ter um papel importante no tratamento em gatos (Rassnik et al., 2008; Govier, 2003). Apesar de a histamina ser um grande responsável pelos sinais clínicos associados a esta doença, a serotonina parece ser o mediador inflamatório mais importante nesta espécie. Assim, a ciproheptadina pode ser mais eficaz que a difenidramina nos gatos com sinais clínicos relacionados com a desgranulação dos mastócitos (Scott, Rothstein, Beningo & Miller, 1998; Rogers, 2009). A eficácia dos córticos é também menos clara nos gatos. Num estudo em mastocitoma cutâneo em gatos, verificou-se que a irradiação por estrôncio-90 β parece resultar num controlo a longo prazo da doença (Turrel, Farrelly, Page & McEntee, 2006).

Na forma sistémica desta doença, deve ser feito um tratamento de suporte com prednisona, antagonistas dos receptores H₁ e H₂ e ciproheptadina. No entanto, estes cuidados por si só

falham no alívio dos sinais clínicos. A quimioterapia pode ter um papel importante no manejo da doença sistêmica (Rogers, 2009). A esplenectomia é aconselhada, com tempos de sobrevivência longos, mesmo sem a associação de outras medidas terapêuticas e na presença de metástases (Tamm & Vail, 2007). Os riscos intracirúrgicos incluem hemorragia excessiva, bem como hipotensão e choque quando massas esplênicas são manipuladas. Anteriormente à cirurgia, os gatos devem ser medicados com bloqueadores dos receptores H₁ e H₂ e ciproheptadina para evitar os efeitos adversos da desgranulação dos mastócitos durante a manipulação cirúrgica (Rogers, 2009).

A forma gastrointestinal, quando do diagnóstico, costuma já apresentar metástases e os gatos morrem ou são eutanasiados pouco tempo depois. Se a cirurgia for possível, as margens cirúrgicas devem incluir 5 a 10 cm de intestino normal de cada lado da lesão, isto porque o tumor normalmente estende-se histologicamente para lá do que é detectável. Terapia adjuvante pode ser aconselhável nestes casos (Tamm & Vail, 2007).

Em casos clínicos de mastocitoma e leucemia mastocitária em humanos, um inibidor da tirosina cinase conhecido por imatinib mesilato mostrou grande eficácia terapêutica (Boissan, Feger, Guillosson & Arock, 2000; Akin et al., 2004). O mesmo fármaco revelou igualmente boa resposta em cães (London et al. 2003). Foi ensaiado o tratamento de um gato com mastocitose sistêmica e mastocitemia, tendo as massas tumorais que este apresentava reduzido muito de tamanho (Isotani et al., 2006). Verificaram igualmente boa tolerância por parte do gato, embora estudos de administração a longo-prazo contemplando a farmacocinética deste fármaco estejam ainda por fazer (Daly et al., 2011). Verificou-se num outro estudo realizado *in vitro* que, tanto o imatinib como o midostaurin, o nilotinib e o dasatinib, todos eles inibidores da tirosina cinase, eram capazes de inibir o crescimento dos mastócitos neoplásicos derivados do baço, e que os mesmos apresentavam sinais de apoptose, demonstrando a sua eficácia nestes casos (Hadzijasufovic et al., 2009).

2.2.8. Prognóstico

Como foi dito atrás, o mastocitoma felino é, na sua generalidade, um tumor benigno com taxas de recorrência locais baixas (Wilcock et al., 1986; Buerger & Scott, 1987; Molander-McCrary et al., 1998; Johnson et al., 2002). O desenvolvimento de tumores primários adicionais noutras locais da pele foi relatado, num estudo, em 35% dos gatos afectados; metástases à distância não foram observadas (Buerger & Scott, 1987).

O sistema histológico de gradação usado para o mastocitoma canino não nos dá informações sobre o prognóstico no caso do gato (Buerger & Scott, 1987). Vários relatos indicam que as

características morfológicas geralmente associadas a malignidade, tais como o pleomorfismo e crescimento infiltrativo, não se correlacionam com o comportamento maligno nestes tumores (Buerger & Scott, 1987; Molander-McCrary et al., 1998; Johnson et al., 2002), embora uma alta actividade mitótica possa ser a excepção (Johnson et al., 2002).

Nos gatos com tumores cutâneos o prognóstico é favorável apesar da sua morfologia e tendência para surgir em locais cutâneos adicionais (Gross et al., 2005). No caso da variante histiocítica, presente nos Siameses, verifica-se que esta tende a regredir espontaneamente num espaço de 4 a 24 meses (Wilcock et al., 1986; Chastain et al., 1988). Raramente, numerosas pápulas e nódulos cutâneos dispersos podem resultar de disseminação de um mastocitoma visceral primário (Gross et al., 2005). Num estudo, 18% dos gatos com mastocitoma cutâneo desenvolveram doença esplénica (Carpenter et al., 1987).

Nas formas viscerais de mastocitoma (i.e. esplénica e intestinal), a disseminação e metástases são mais comuns. Da necrópsia de 30 gatos com a forma esplénica observou-se disseminação para o fígado (90%), linfonodos viscerais (73%), medula óssea (40%), pulmões (20%) e intestino (17%) (Carpenter et al., 1987). Cerca de um terço dos pacientes teve derrames peritoneais e pleurais ricos em eosinófilos e mastócitos neoplásicos. O sangue periférico e a medula óssea apresentavam mastócitos neoplásicos em cerca de 40% dos casos (Carpenter et al., 1987). Num relato de 43 casos, 23% tinha envolvimento da medula óssea (Feinmehl et al., 1992 citado por Tamm & Vail, 2007).

Mesmo com metástases disseminadas, a sobrevivência a longo prazo é comum em gatos com mastocitoma esplénico após realização de esplenectomia, sendo o tempo médio de sobrevida com boa qualidade de vida de 18 meses, embora se tenha registado que alguns gatos vivem até 5 anos após a cirurgia (Gordon, McClaran, Bergman & Liu, 2010). O mastocitoma felino intestinal, por sua vez, está associado a disseminação generalizada e tem um mau prognóstico, sendo que a esperança média de vida destes animais quando do diagnóstico é geralmente inferior a 4 meses, embora por vezes os pacientes tenham um tempo de sobrevida longo (Rogers, 2009). É comum a metastização para os linfonodos mesentéricos e fígado, e menos comum para o baço, pulmões e medula óssea. A maioria dos animais morre ou é eutanasiada pouco depois do diagnóstico de mastocitoma intestinal (Tamm & Vail, 2007).

Anorexia, perda de peso significativa, envolvimento da medula óssea e do sangue periférico são apontadas como factores de pior prognóstico. Devem ser feitas reavaliações frequentes e esfregaços da camada leucoplaquetária para averiguar a resposta ao tratamento. Raramente a mastocitose periférica desaparece, mas muitas vezes diminui, sendo que um aumento subsequente pode servir como marcador de progressão (Tamm & Vail, 2007).

3. Objectivos

O presente trabalho tem como objectivo realizar um estudo estatístico de modo a delinear as características epidemiológicas e histopatológicas das proliferações de mastócitos em felinos. Além dos estudos estatísticos, pretende-se realizar estudos imunohistoquímicos com a finalidade de futuramente auxiliar no diagnóstico e prognóstico destes processos, ao determinar se existe correlação entre o padrão de expressão e a intensidade da marcação para o CD117 e o MMP-9 e o comportamento clínico destes tumores no gato.

4. Material e métodos

4.1. Recolha de dados para o estudo de casos no período de 2002-2010

No presente estudo, foram incluídos 50 tumores provenientes de diferentes felinos, não se contando, para efeitos de caracterização morfológica, casos recidivantes. Estes casos foram recebidos de clínicas da Região de Lisboa e Vale do Tejo e diagnosticados como mastocitoma ou mastocitose no Laboratório de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Técnica de Lisboa e no Laboratório de Patologia Veterinária – VetPat, entre 2002 e 2010.

As informações recolhidas incluíram à identificação do animal, à raça, à idade e ao sexo, bem como à localização do tumor, tamanho da lesão e número de tumores identificados em cada animal. Foram ainda recolhidos dados sobre a evolução pós-cirúrgica em 34 destes casos, registando-se a ocorrência de recidivas, locais ou à distância e a morte devida ao tumor. Estas últimas informações foram obtidas pelo contacto com o clínico ou com o proprietário dos animais.

4.2. Amostras

O material avaliado foi obtido por excisão cirúrgica e em necrópsia e posteriormente fixado em formol tamponado a 10%. Após um período de fixação mínimo de 24 horas, o processamento e inclusão em parafina dos tecidos foi efectuado de forma automática, no processador de tecidos LEICA TP 1020[®], de acordo com o protocolo em anexo, e incluído em Histosec Merck[®].

O corte dos blocos de parafina foi realizado em micrótomos rotativo LEICA RM 2135[®] e de correção LEICA SM 2000R[®], tendo-se efectuado cortes com cerca de 3 µm de espessura

para os exames histológicos e para imunohistoquímica. Foi de seguida efectuada a coloração de Hematoxilina e Eosina (H&E) e de azul de toluidina (AT).

Os tumores foram avaliados e classificados de acordo com a localização e dimensão do ponto de vista histológico, quanto ao grau de diferenciação, riqueza em granulações, índice mitótico, frequência de apoptose e infiltrado inflamatório, eosinofílico e/ou linfocítico.

4.3. Imunohistoquímica

Do total de casos estudados, foram submetidos a imunomarcação para CD117 28 mastocitomas cutâneos, 5 mastocitomas extracutâneos, 4 casos de mastocitose cutânea e 1 de mastocitose sistémica. Para marcação para MMP-9, foram seleccionados 28 casos de mastocitoma cutâneo, 4 casos de mastocitoma extra-cutâneo, 5 casos de mastocitose cutânea e 1 caso de mastocitose sistémica. Os cortes histológicos de 3µm foram colocados em lâminas Superfrost® Plus da Thermo Scientific. Seguidamente, foram desparafinados, hidratados e sujeitos a recuperação antigénica em microondas a 900 w durante 15 minutos, usando como soluções de recuperação tampão citrato a pH 6 (no caso da detecção da MMP-9) e EDTA a pH 8 (no caso da detecção do CD117). Após o arrefecimento das lâminas foi efectuada a incubação “*overnight*” a 4° C, com os anticorpos policlonais para MMP- 9 (Rabbit anti-Human Thermo Scientific – Ref. 38182) na diluição de 1/200 e CD117 (Rabbit anti-Human, Dako – Ref. A4502) na diluição 1/500 seguindo-se de 3 lavagens em PBS de 5 minutos cada. As diluições foram efectuadas utilizando solução diluente de anticorpos da Zymed Laboratories (Ref. 00-3218), a qual contém na sua composição Albumina Sérica Bovina. A utilização desta solução diluente apresenta a vantagem de suprimir a etapa de bloqueio da reacção inespecífica do anticorpo primário. Assim sendo, as possíveis ligações que podem ocorrer entre o anticorpo primário e outras estruturas, que não o antigénio que se pretende detectar, são inibidas ao mesmo tempo que ocorre a ligação específica do anticorpo ao antigénio em questão.

A inibição da peroxidase endógena foi feita recorrendo a uma solução aquosa de peróxido de hidrogénio a 3% durante 10 minutos. Após lavagem em PBS seguiu-se a incubação das lâminas com um polímero enzimático conjugado com peroxidase – Horseradish peroxidase (HRP) (Dako Real™ Envision™ /HRP+3,3-Diaminobenzidina (DAB) – Ref. K5007) durante 30 minutos, seguida de lavagem em PBS. A revelação da marcação fez-se com cromogénio DAB+ e substrato (peróxido de hidrogénio), diluído segundo as recomendações do fabricante (20 microlitro de cromogénio para 1 mililitro de solução tampão), durante 10 minutos (5+5 minutos), seguida de contraste com Hematoxilina de Harris.

Como controlo positivo interno foram usados, para o CD117, os mastócitos da pele rodeando as lesões. O limiar de positividade para o CD117 considerado foi de 10%. Para o MMP-9, foi usado como controlo positivo interno, os queratinócitos normais presentes, uma vez que esta enzima se encontra nestas células, e o limiar de positividade foi de 50%.

O controlo negativo foi obtido por substituição do anticorpo primário por PBS. A classificação da marcação do CD117 foi feita de acordo com estudos anteriores em mastocitoma canino e felino, sendo considerados 3 padrões: um padrão membranar, por vezes com marcação citoplasmática granular discreta (padrão I), um padrão focal ou granular, também conhecido por perinuclear (padrão II) e um padrão citoplasmático difuso (padrão III) (Preziosi et al., 2004; Rodriguez-Cariño et al., 2009). Para a MMP-9, a reacção foi considerada positiva sempre que se verificou marcação do citoplasma das células tumorais. A intensidade da marcação, quando positiva, foi estimada semi quantitativamente, para ambos os marcadores, em discreta (+), moderada (++), intensa (+++), e muito intensa (++++).

4.4. Análise estatística

O estudo da distribuição das diferentes variáveis (dados clínicos, epidemiológicos, histopatológicos e imunohistoquímicos) utilizou sobretudo métodos de estatística descritiva. A reduzida dimensão da amostra não possibilitou a utilização de testes de associação entre variáveis, pelo que o estudo da relação entre algumas destas é feito com base em métodos descritivos. O processamento dos dados foi realizado com o programa Microsoft® Office Excel. 2007®.

5. Resultados

Tabela 1 - Composição da amostra

Tipo	Nº de casos	%
Mastocitoma cutâneo	38	76
Mastocitose cutânea	5	10
Mastocitoma extra-cutâneo	5	10
Mastocitose sistémica	2	4
Total	50	100

5.1. Mastocitoma cutâneo

Foram classificados dentro deste grupo 38 dos 50 casos recebidos, sendo a forma da doença mais comum na amostra estudada, perfazendo 76% desta (Tabela 1).

5.1.1. Avaliação dos dados clínicos e epidemiológicos

a) Idade

Apenas foi possível determinar a idade de 34 dos animais afectados. A idade destes, na altura do diagnóstico, variou entre 2 e 16 anos, com média de $9,09 \pm 3,60$ anos e mediana de 9 anos. Não se observou diferença de idades para machos e fêmeas sendo que cada um apresentava, respectivamente, uma média de idades de $9 \pm 3,82$ e $9 \pm 3,43$ (Tabela 2).

Tabela 2 - Média de idades consoante o sexo

Sexo	Média	Desvio padrão (DP)	Mínimo	Máximo
Macho	9	3,82	2	16
Fêmea	9	3,43	2	14
Total Geral	9	3,58	2	16

b) Sexo

Dos casos estudados nos quais foi possível determinar o sexo dos animais afectados ($n=37$), 20 eram machos (54,05%) e 17 eram fêmeas (45,95%).

c) Raça

Dos 33 animais cuja raça era conhecida, a mais representativa era de raça indeterminada com 25 animais (65,79%) (Tabela 3).

Tabela 3 - Distribuição da doença por raças

Raça	Número de casos	%
Raça Indeterminada	25	65,79
Persa	4	10,53
Bosques da Noruega	1	2,63
Siamês e cruzado de siamês	3	7,89
Desconhecida	5	13,16
Total Geral	38	100,00

d) Localização anatômica

Na amostra estudada, o local mais afectado foi o tronco com 11 casos (28,95%), seguida da cabeça e orelhas, ambas com 6 casos (15,79%) (Figura 1). Relativamente aos membros, um dos casos apresentava nódulos tanto nos membros anteriores como nos posteriores, outro apresentava vários nódulos no membro anterior, e os restantes 3 apresentavam nódulos nos membros posteriores, revelando uma certa predominância destes membros (Tabela 4).

Tabela 4 - Distribuição dos tumores por localização anatômica

Localização	Número de casos	%
Cabeça (local inespecificado)	6	15,79
Orelhas	6	15,79
Pele do lábio	3	7,89
Pescoço	4	10,53
Tronco	11	28,95
Membros	5	13,16
Região axilar	1	2,63
Zona inguinal	1	2,63
Desconhecida	1	2,63
Total Geral	38	100,00

e) Tamanho e número de nódulos

Na maioria dos casos (n=30, 78,95%), estes tumores apresentaram-se como nódulos solitários. Relativamente ao tamanho, aferido pelo nódulo de maiores dimensões no caso de lesões múltiplas, vemos que se distribui sobretudo por lesões com diâmetro menor ou igual a 0,5 cm (n=13, 34,21%) e entre 1 e 2 cm, inclusive, (n=11, 28,95%).

Verificou-se que, fosse qual fosse o tamanho das massas, a grande generalidade dos casos dizia respeito a tumores solitários. No entanto, verificou-se uma ligeira predominância de tumores múltiplos em casos que compreendiam massas de diâmetro superior a 2 cm (n=2, 33,3%) (Tabela 5).

Tabela 5- Distribuição do tamanho dos nódulos para tumores solitários e múltiplos

Tipo	Tamanho				Total Geral
	≤0,5 cm	0,5-1 cm	1-2 cm	≥2 cm	
Múltiplo	1	1	1	2	5
Solitário	12	4	9	4	29
Total Geral	13	5	10	6	34



Figura 1 - Mastocitoma cutâneo. A - Mastocitoma da palpebra; B - Lesão ulcerada.

Foto A cedida pela Profª. Esmeralda Delgado do Hospital Escolar da FMV - UTL; Foto B cedida pela Dra. Ana Margarida Santos da Clínica Veterinária João XXI – Algés.

5.1.2. Avaliação histopatológica

Os mastocitomas cutâneos foram divididos de acordo com o seu grau de diferenciação. A classificação quanto à diferenciação baseou-se na homogeneidade morfológica e na presença de granulações. Observou-se que os tumores bem diferenciados apresentavam uma maior riqueza em granulações dos mastócitos, ao passo que nos tumores pouco diferenciados, estas eram na sua maioria irrelevantes (-) ou escassas (+) (Tabela 6).

Tabela 6 - Relação entre o tipo de mastocitomas e presença de granulações (de ausente(-) a muito elevada(+++))

Tipo	-		+		++		+++		Total	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Mastocitoma bem diferenciado		-	2	5,26	4	10,53	17	44,74	23	60,53
Mastocitoma moderadamente diferenciado		-	1	2,63	1	2,63	1	2,63	3	7,89
Mastocitoma pouco diferenciado	3	7,89	3	7,89	1	2,63	2	5,26	9	23,68
Mastocitoma pleomórfico		-		-	2	5,26	1	2,63	3	7,89
Total Geral	3	7,89	6	15,79	8	21,05	21	55,26	38	100,00

De acordo com esta classificação observaram-se sobretudo mastocitomas bem diferenciados, com um total de 23 casos (60,53%), seguidos dos pouco diferenciados (n= 9; 23,68%). Observaram-se ainda 3 casos (7,89%) de mastocitoma moderadamente diferenciado e 3 de mastocitoma pleomórfico (Figura 2).

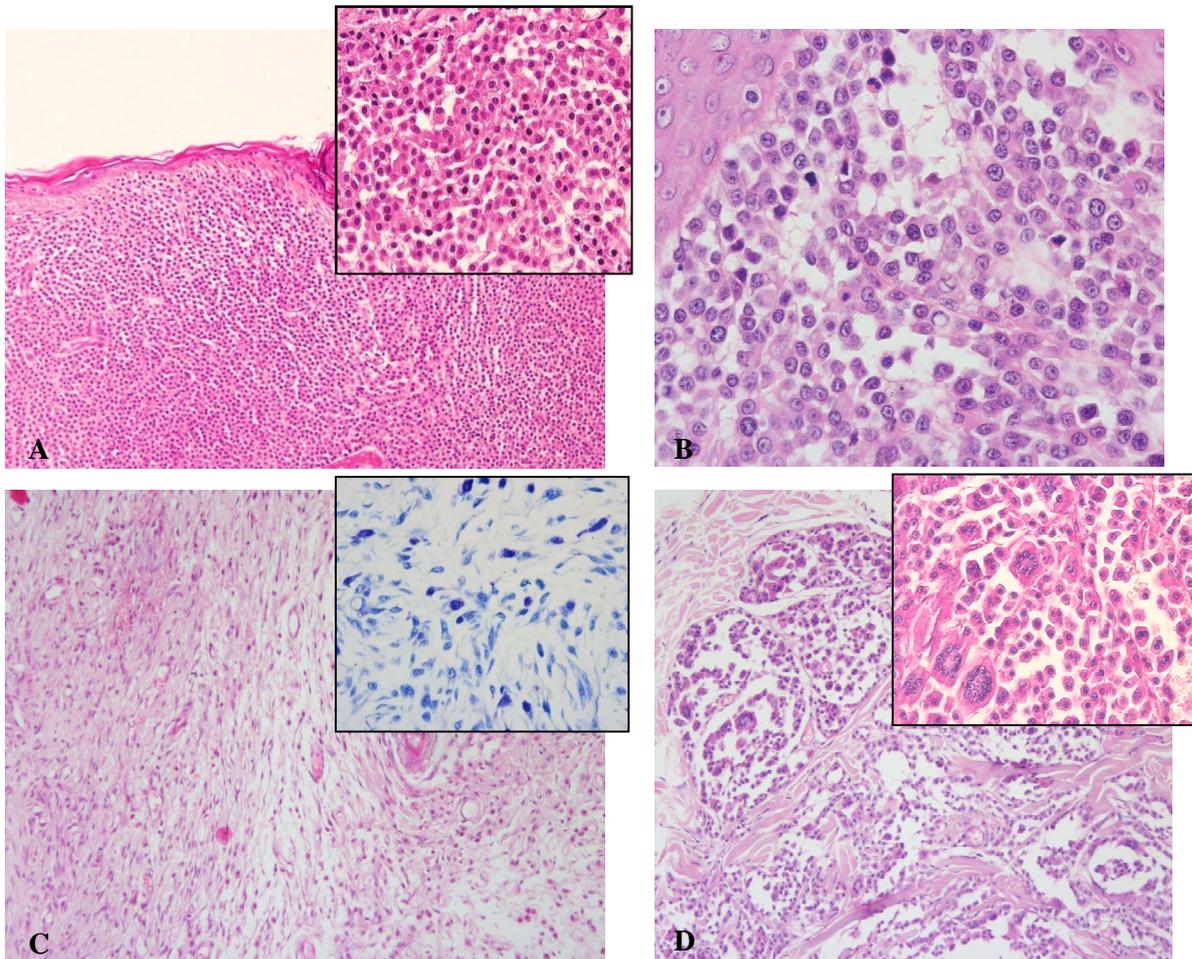


Figura 2 - A - Mastocitoma cutâneo bem diferenciado, HE, x 40 (detalhe ampliado, HE, x 100); B - Mastocitoma moderadamente diferenciado, HE, x 400; C - Mastocitoma pouco diferenciado, HE, x 40 (detalhe ampliado, AT, x 100); D - Mastocitoma pleomórfico, HE, x 100 (detalhe ampliado, HE, x 400).

Em 29 casos (76,32%) não se detectou a presença de eosinófilos, sendo escassa a moderada em 8 casos (21,05%) e abundante num caso (2,63%) (Tabela 7).

Tabela 7 - Relação entre o tipo de mastocitoma e a infiltração por eosinófilos (de ausente (-) a muito elevada (+++))

Tipo	-		+		++		+++	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Mastocitoma bem diferenciado	17	44,74	5	13,16	1	2,63	-	-
Mastocitoma moderadamente diferenciado	3	7,89	-	-	-	-	-	-
Mastocitoma pouco diferenciado	6	15,79	1	2,63	1	2,63	1	2,63
Mastocitoma pleomórfico	3	7,89	-	-	-	-	-	-
Total Geral	29	76,32	6	15,79	2	5,26	1	2,63

Foi observada infiltração linfocitária perivascular em 24 casos (63,16%) (Figura 3-A) e 2 casos de erosão epitelial, um deles com diâmetro superior a 2 cm e outro entre os 0,5 e 1 cm. Relativamente à organização dos mastócitos nos tecidos, os tumores eram maioritariamente compactos (n=33; 86,4%) (Tabela 8 e Figura 3).

Tabela 8 - Tipos de mastocitoma e organização compacta ou difusa dos mastócitos nos tecidos

Tipo	Compacto		Difuso	
	n	%	n	%
Mastocitoma bem diferenciado	22	57,89	1	2,63
Mastocitoma moderadamente diferenciado	3	7,89		-
Mastocitoma pouco diferenciado	5	13,16	4	10,53
Mastocitoma pleomórfico	3	7,89		-
Total Geral	33	86,84	5	13,16

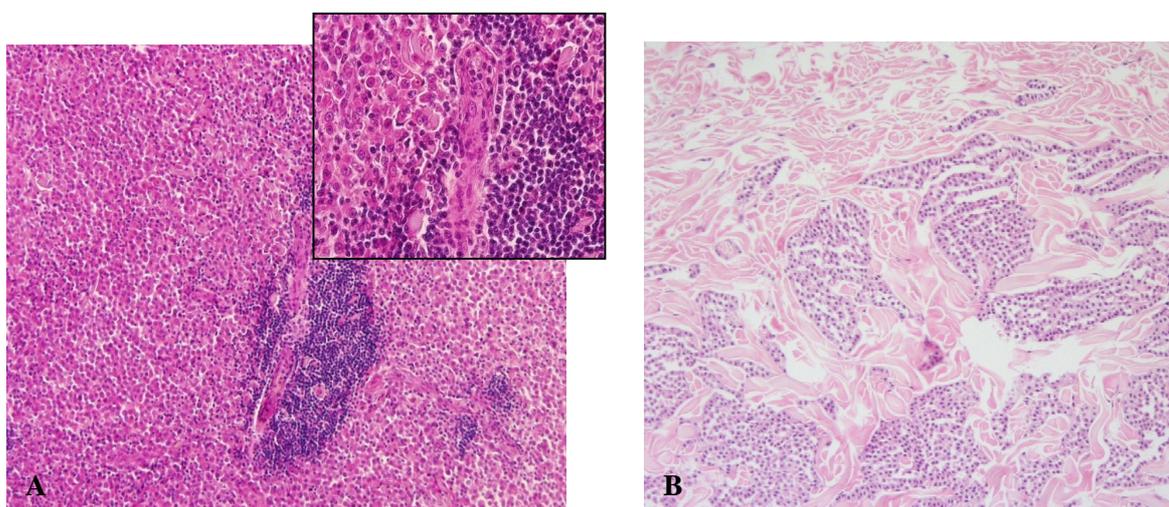


Figura 3 - A - Mastocitoma com distribuição compacta, HE, x 40 (detalhe ampliado de pormenor de infiltração linfóide perivascular, HE, x 100); B - Mastocitoma com distribuição difusa, HE, x 40.

Observou-se que o número de células em apoptose, avaliado pela picnose nuclear, era irrelevante em 50% dos casos, sendo muito elevado em casos esporádicos independentemente do grau de diferenciação (Tabela 9).

Tabela 9 - Relação entre o tipo de mastocitoma e a apoptose (de ausente (-) a muito elevada (+++))

Tipo	-		+		N	++		+++	
	n	%	n	%		n	%	n	%
Mastocitoma bem diferenciado	13	34,21	4	10,53	5	13,16	1	2,63	
Mastocitoma moderadamente diferenciado	1	2,63	1	2,63		-	1	2,63	
Mastocitoma pouco diferenciado	4	10,53	2	5,26	1	2,63	2	5,26	
Mastocitoma pleomórfico	1	2,63		-	1	2,63	1	2,63	
Total Geral	19	50,00	7	18,42	7	18,42	5	13,16	

O número de mitoses revelou-se, frequentemente, como sendo irrelevante (n=26, 68,4%). O único caso em que se observou 20 mitoses por cada 10 campos em maior ampliação (x400) dizia respeito a um mastocitoma pouco diferenciado (Tabela 10 e gráfico 1).

Tabela 10 - Relação entre o tipo de mastocitoma e o índice mitótico

Tipo	Nº de mitoses por cada 10 campos em grande ampliação (x400)			
	<1	1-5	6-10	>10
Mastocitoma bem diferenciado	16	4	3	
Mastocitoma moderadamente diferenciado	1	2		
Mastocitoma pouco diferenciado	6	2		1
Mastocitoma pleomórfico	3			
Total Geral	26	8	3	1

Relativamente à distribuição das células neoplásicas pelas diferentes camadas da pele, verificou-se que, em 86,8% dos casos existia invasão da derme superficial, em 68,4% no caso da derme média, em 81,5% na derme profunda. 34,2% dos casos apresentam células neoplásicas na hipoderme e apenas 5,2% exibiam comprometimento do panículo muscular. A epiderme surge infiltrada em 2 casos (5,2%), ambos dizendo respeito a mastocitomas moderadamente diferenciados (Figura 4).

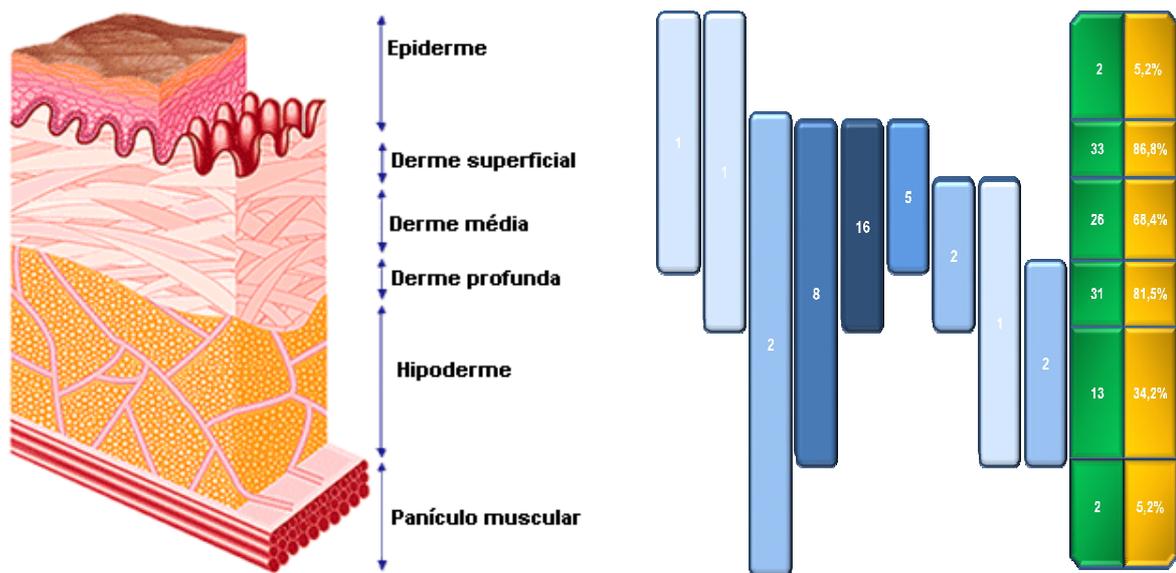
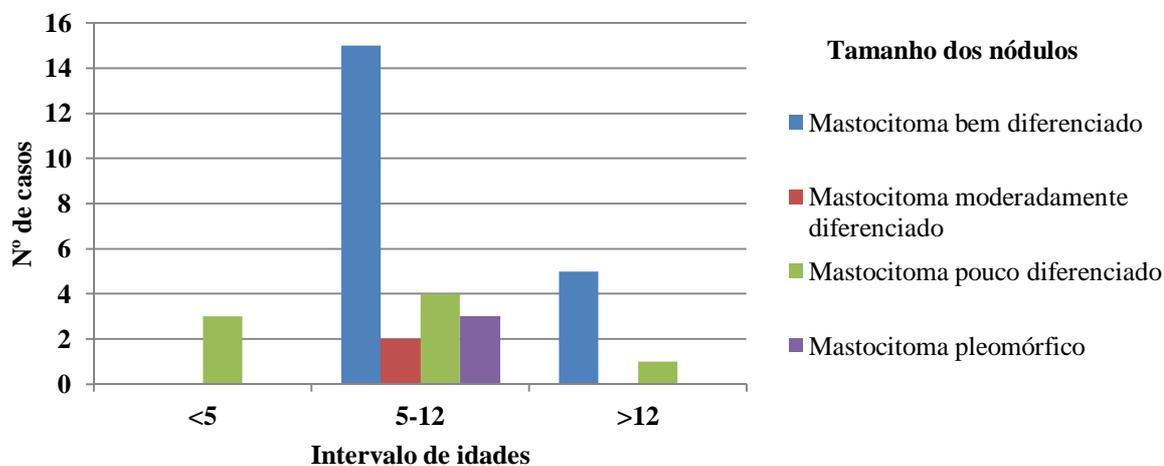


Figura 4 - Distribuição das células neoplásicas pelas diferentes camadas da pele. A intensidade da cor azul nas barras à direita é proporcional ao número de casos identificados.
Imagem adaptada de [http:// www.urgomedical.es147-la-piel](http://www.urgomedical.es147-la-piel).

Observou-se que em gatos juvenis (com menos de 5 anos de idade), os 3 tumores registados diziam respeito a mastocitomas pouco diferenciados. Dentro destes três, encontrava-se um Siamês com 2 anos, sendo que os outros 2 animais desta raça ou cruzados apresentavam mastocitomas bem diferenciados e eram gatos idosos (> 12 anos). Estes casos pouco diferenciados em gatos juvenis representavam 37,5% do total de mastocitomas pouco diferenciados registados. Todos os casos de mastocitoma pleomórfico e mastocitoma moderadamente diferenciado foram observados em gatos de meia-idade (5 a 12 anos) e a grande maioria dos mastocitomas bem diferenciados registou-se em gatos de meia-idade (n=15, 75%) (Gráfico 1).

Gráfico 1- Distribuição da idade e o tipo de mastocitoma cutâneo



5.2. Mastocitose cutânea

Dentro deste grupo foram diagnosticados 5 casos, isto é 10% dos 50 casos submetidos (Tabela 1).

5.2.1. Avaliação dos dados clínicos e epidemiológicos

a) Idade

A idade dos animais afectados por esta forma da doença, nos 4 casos em que este dado se encontrava disponível e na altura do diagnóstico, variou entre 3 e 14 anos de idade, com média de $7,5 \pm 4,8$ anos.

Verificou-se que nos machos esta forma da doença surgia em animais mais jovens, sendo que a média era de 4 anos, enquanto que nas fêmeas a média era de 11 anos.

b) Sexo

Verificou-se ligeira predominância desta forma da doença nos machos (n=3; 60%) relativamente às fêmeas (n=2; 40%).

c) Raça

À semelhança do que acontece com o mastocitoma cutâneo, verificou-se que a raça mais representada era indeterminada com 4 animais (80%). Observou-se ainda um caso de mastocitose cutânea num Persa.

d) Localização anatómica

Na amostra estudada, a localização mais comum foi o pavilhão auricular (n=3; 60%). Os outros dois casos localizavam-se um no abdómen e outro na região peitoral (Figura 5).

e) Tamanho das lesões

Em 3 (60%) dos casos, as lesões tinham uma dimensão superior a 2 cm, em um caso era de 1,5 cm e no restante 1 cm.

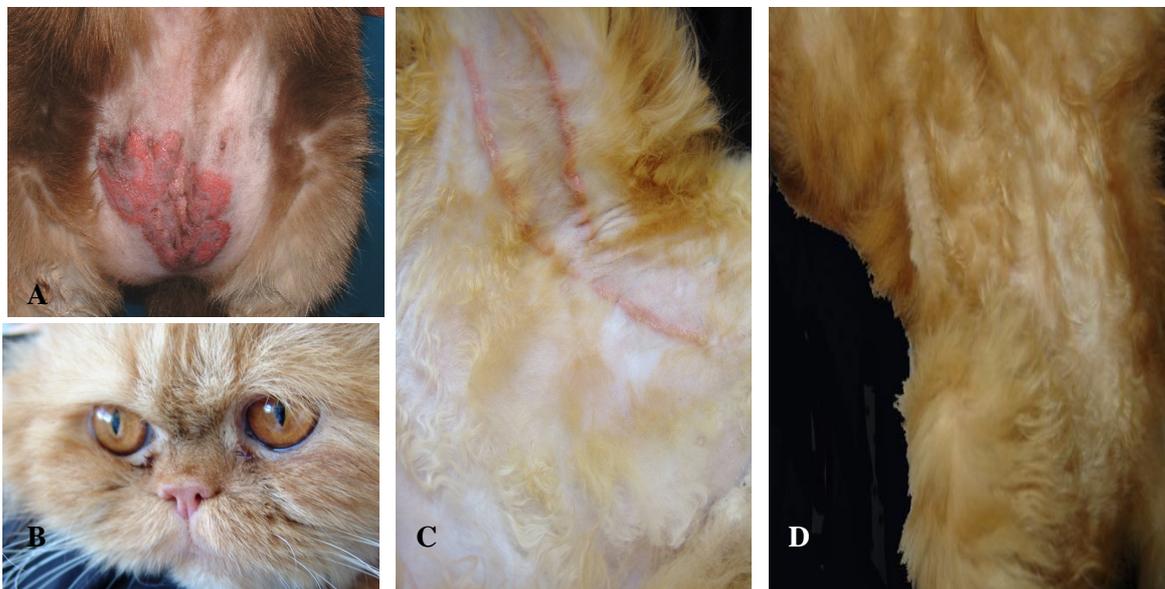


Figura 5 - Casos de mastocitose cutânea. A - Placa prurítica eritomatosa na região peitoral em felino de raça indeterminada; B, C, D - Mastocitose cutânea na parede abdominal em gato persa. Lesão linear na parede abdominal (C). Pele do abdómen após quimioterapia (D).

Foto A cedida por Dra. Ana Margarida Santos da Clínica Veterinária João XXI – Algés.

Fotos B, C e D cedidas por Marta Elias, aluna da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Técnica de Lisboa.

5.2.2. Avaliação histopatológica

Neste tipo de lesões, verificou-se heterogeneidade da população de mastócitos em 4 (80%) dos 5 casos recebidos. Relativamente à dispersão das células, todos os casos apresentaram invasão da derme superficial e média, sendo que em 3 (60%) casos se verificou invasão da derme profunda (Figura 6). A infiltração por eosinófilos parece ligeiramente mais comum que nos mastocitomas cutâneos, estando presente em 2 dos casos (40%), sendo ligeira num deles (20%) e elevada noutro caso (20%). Só se verificou erosão epitelial num dos casos. 3 dos casos (60%) apresentavam intensa reacção inflamatória, outro caso demonstrava infiltração por neutrófilos. O índice mitótico e a apoptose não se mostraram relevantes em nenhum dos casos.

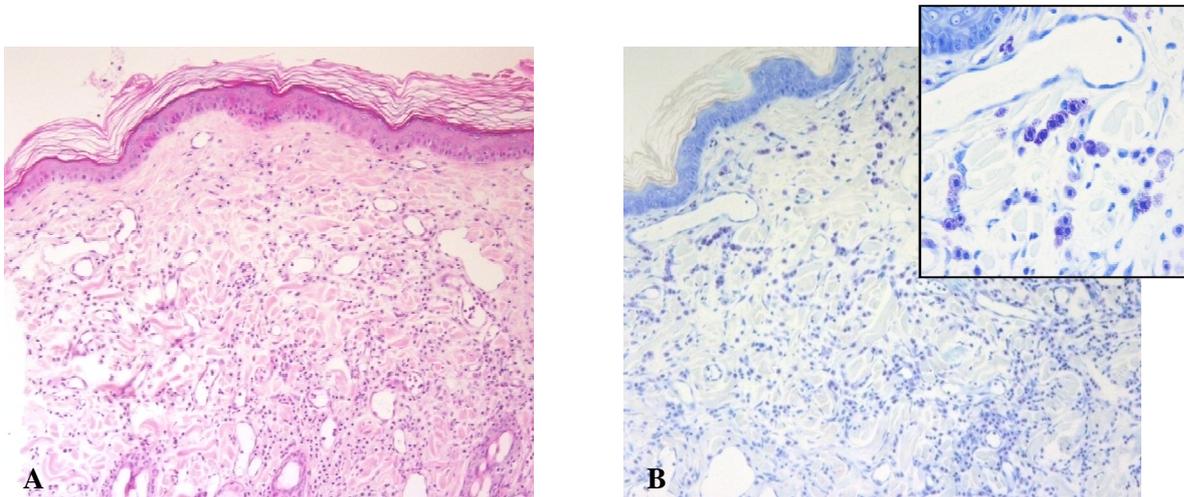


Figura 6 - Mastocitose cutânea. A - HE, x 100; B - AT, x 100 (detalhe ampliado, AT, x 400).

5.3. Mastocitoma extracutâneo

Foram observados 5 casos de mastocitoma extracutâneo, representando 10% dos 50 casos recebidos (Tabela 1).

5.3.1. Avaliação dos dados clínicos e epidemiológicos

a) Idade

A idade dos animais afectados por mastocitoma com localização extracutânea, em 4 dos 5 casos onde foi possível obter essa informação, na altura do diagnóstico, variou entre 4 e 14 anos de idade, sendo a média de idades de $10,5 \pm 4,5$ anos.

Verificou-se que nos machos esta forma da doença surgia em animais mais jovens, sendo que a média era de 4 anos e nas fêmeas a média era de 11 anos.

b) Sexo

Verificou-se que o sexo feminino se apresentava muito mais representado com 4 (80%) dos 5 casos recebidos de mastocitoma extracutâneo.

c) Raça

À excepção de um caso para o qual não havia informação disponível sobre este dado, todos os animais eram de raça indeterminada.

d) Localização Anatômica

Não foi possível definir qualquer tipo de padrão, atendendo à variabilidade na localização. Dois dos casos ocorrem na mucosa oral, um deles na língua e o outro no lábio (Figura 7-A). Os outros casos eram de mastocitomas do mesentério, de vulva e de parede gástrica (Figura 7-B).

e) Tamanho das lesões

As lesões de menores dimensões diziam respeito à mucosa oral, sendo que a massa da língua tinha entre 1 a 2 cm e a do lábio tinha menos de 0,5 cm. As restantes lesões tinham acima de 2 cm.

5.3.2. Avaliação histopatológica

De entre os 5 casos observados, apenas num se observou homogeneidade das células neoplásicas. Observou-se uma leve infiltração por eosinófilos num dos casos, sendo que em todos os outros estes estavam ausentes. Num dos casos observou-se infiltração por linfócitos, num outro observou-se um infiltrado inflamatório com células mono e polimorfonucleadas e noutro caso observou-se uma reacção fibromatosa exuberante com mastócitos neoplásicos dispersos. O número de células em apoptose foi irrelevante para todos os casos bem como o número de mitoses, à excepção de um caso que apresentava 5 mitoses por cada 10 campos (x400). Nos dois casos referentes à mucosa oral, observou-se invasão epitelial (Figura 7-A). No que diz respeito à diferenciação, observaram-se 2 casos de mastocitoma bem diferenciado, ambos na mucosa oral, um caso de mastocitoma indiferenciado, que dizia respeito à massa mesentérica, e dois casos de mastocitoma pouco diferenciado. Observou-se que estes tumores tinham semelhante representação de casos com distribuição compacta e difusa das suas células (Tabela 11).

Tabela 11 - Relação entre o tipo de mastocitoma e sua organização compacta ou difusa nos tecidos

Tipo	Compacto	Difuso	Total
Mastocitoma bem diferenciado	1	1	2
Mastocitoma pouco diferenciado	1	1	2
Mastocitoma indiferenciado		1	1
Total Geral	2	3	5

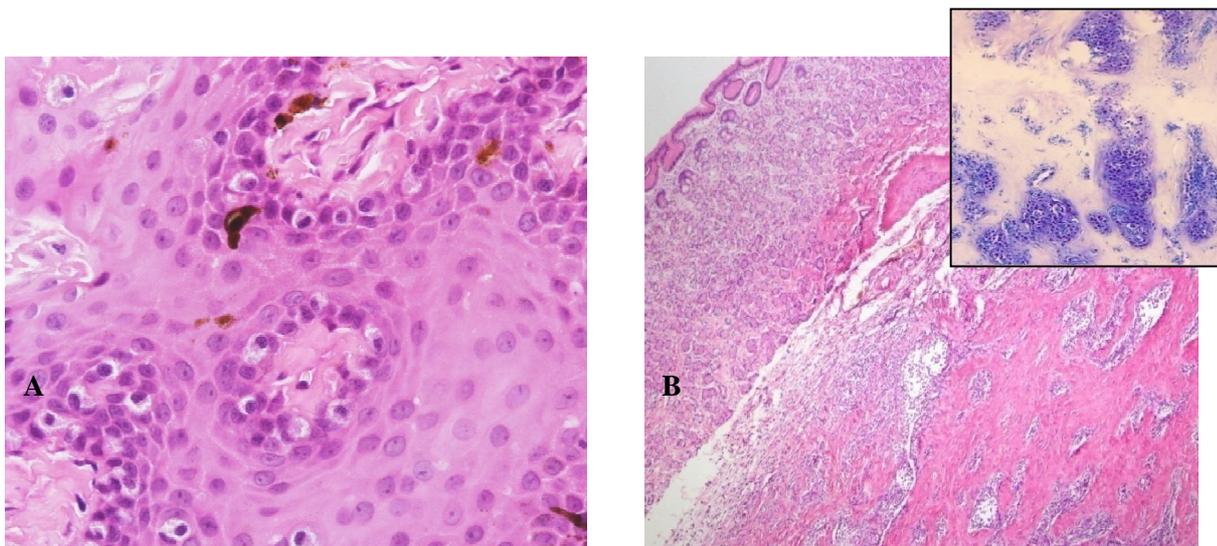


Figura 7 - Mastocitoma extracutâneo. A – Infiltração por mastócitos da lâmina própria do lábio com invasão do epitélio, HE, x 400; B - Invasão da submucosa do estômago por mastócitos, HE, x 40 (detalhe ampliado, AT, x 100).

5.4. Mastocitose sistêmica

De entre todos os tipos observados, este foi o menos representado na nossa amostra perfazendo apenas 2 dos 50 casos, o que perfaz 4% da mesma (Tabela 1).

5.4.1. Avaliação dos dados clínicos e epidemiológicos

Um dos casos era em macho e outro em fêmea, tendo o primeiro 12 anos e o segundo 15. Ambos os animais eram de raça indeterminada. Em ambos os casos estava presente invasão generalizada do baço, sendo que no segundo caso havia também infiltração focal e difusa do fígado e invasão dos linfonodos (Figura 8).

5.4.2. Avaliação histopatológica

Ambos os tumores eram compostos por uma população homogênea de mastócitos neoplásicos, com índice mitótico irrelevante e ausência de infiltração por eosinófilos ou linfócitos. Um dos casos dizia respeito a um tumor bem diferenciado, contendo elevado número de granulações e com um número irrelevante de células em apoptose. O outro caso tratava-se de um mastocitoma muito pouco diferenciado, com granulações citoplasmáticas quase ausentes e reduzido número de células em apoptose.

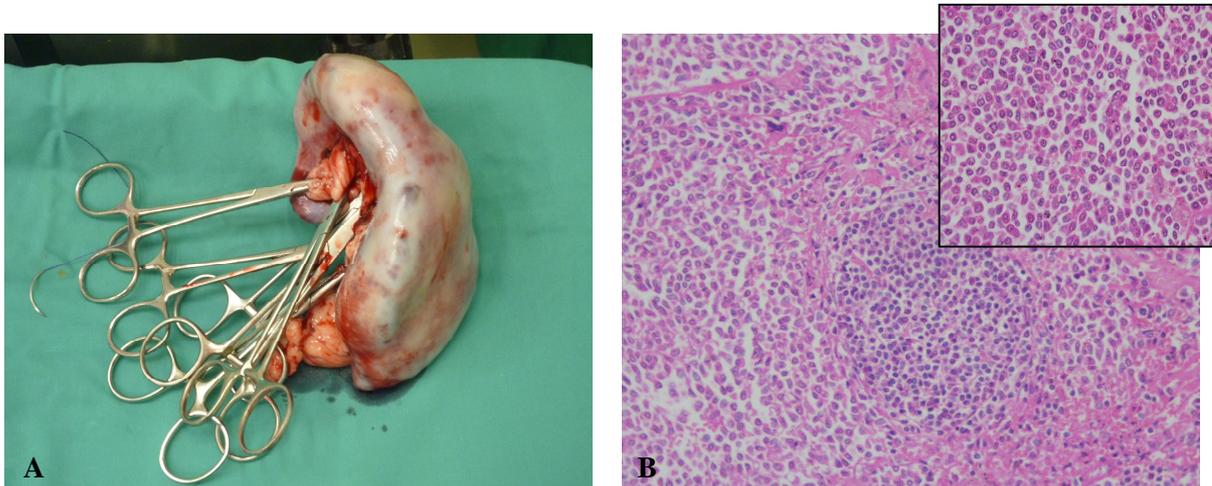


Figura 8 - Mastocitoma sistêmico. A - Baço hipertrofiado e com espessamento da cápsula; B - Infiltração difusa por mastócitos do baço representado em A. Ao centro folículo linfóide preservado, HE, x 40 (detalhe ampliado, HE, x 100).

5.5. Avaliação imunohistoquímica

5.5.1. C-kit

Foram submetidos 38 casos a marcação imunohistoquímica, dos quais 28 eram de mastocitoma cutâneo, 5 de mastocitoma extracutâneo, 4 de mastocitose cutânea e 1 de mastocitose sistêmica. Dos 28 casos de mastocitoma cutâneo, apenas um teve resultado negativo (3,6%). Todos os casos de mastocitoma extracutâneo apresentaram resultados negativos, bem como os casos de mastocitose cutânea (Figura 9-D, E, F, G). O caso de mastocitose sistêmica marcou positivamente para c-kit, tendo sido observado o padrão III (citoplasmático difuso) e marcação moderada (++)

Relativamente ao padrão de expressão dos casos de mastocitoma cutâneo, observou-se uma predominância do padrão III, representando 18 dos 27 casos com marcação positiva (66,7%). O padrão I (membranar) foi observado em 5 casos (18,5%) e o padrão II (citoplasmático perinuclear) em 4 casos (14,8%) (Tabela 12) (Figura 9-A, B, C).

Tabela 12 - Padrão de marcação do CD117 dos diferentes tipos de mastocitoma cutâneo

Tipo	Padrão I	Padrão II	Padrão III
Mastocitoma bem diferenciado	4	2	12
Mastocitoma pouco ou moderadamente diferenciado		2	6
Mastocitoma pleomórfico	1		
Total Geral	5	4	18

A intensidade de marcação foi maioritariamente moderada (n=10, 37%), sendo que a maioria destes casos dizia respeito a mastocitomas bem diferenciados (n=10, 83,3%).

Tanto o caso de mastocitose cutânea que marcou positivamente como o de mastocitose sistêmica apresentaram um padrão II e marcação moderada (++) (Tabela 13).

Tabela 13 - Intensidade da marcação do CD117 dos diferentes tipos de mastocitoma cutâneo

Tipo	Intensidade de marcação				
	-	+	++	+++	++++
Mastocitoma bem diferenciado	1	3	10	4	1
Mastocitoma pouco ou moderadamente diferenciado		2	2	2	2
Mastocitoma pleomórfico		1			
Total Geral	1	6	12	6	3

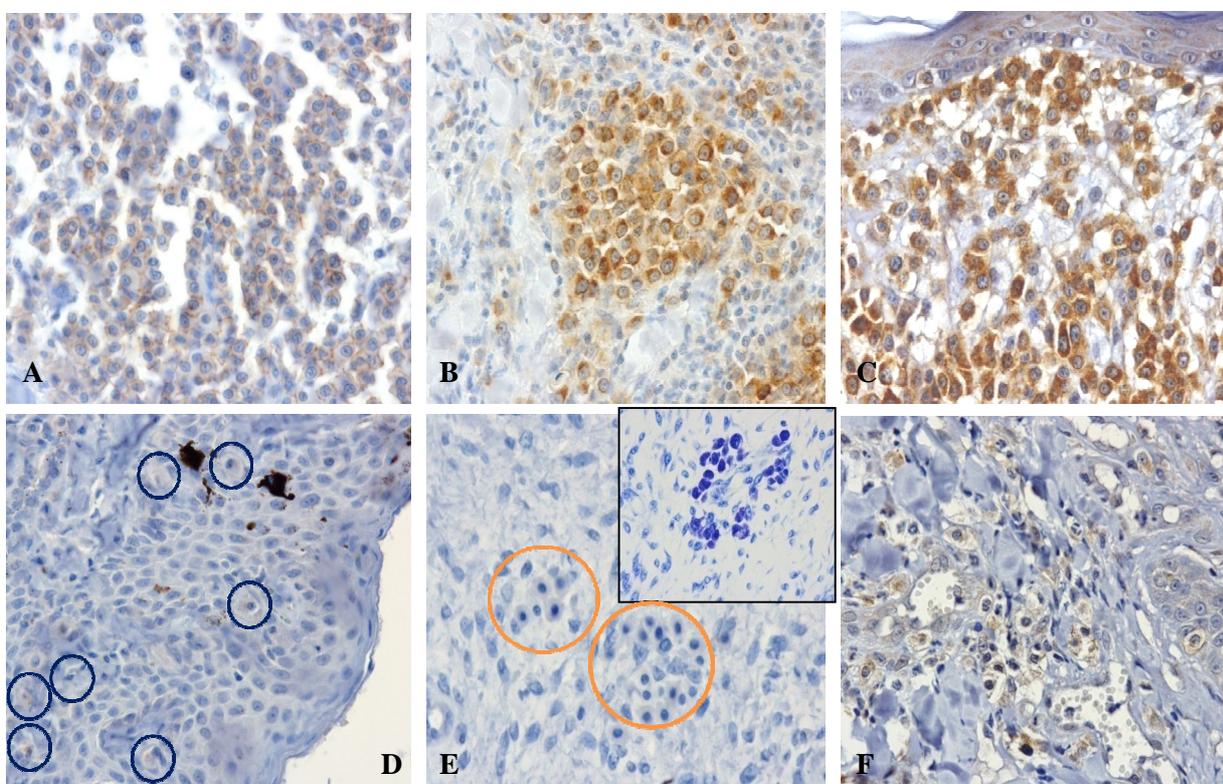


Figura 9 - A, B, C - Padrões de marcação do CD117 em mastocitomas cutâneos. Padrão I - membranar (A); Padrão II - citoplasmático perinuclear (B); Padrão III - citoplasmático difuso (C); D e E - Marcação negativa em mastocitomas extracutâneos, do lábio (D) e vulva (E). No detalhe inserido em cima em E, os mastócitos da mesma lesão podem ser identificados pelo AT. F - Marcação negativa para o CD117 em mastocitose cutânea. (CD117, Envision, Hematoxilina de Harris, x400).

5.5.2. MMP-9

Dos 38 casos testados para MMP-9, 28 eram de mastocitoma cutâneo, 4 de mastocitoma extracutâneo, 5 de mastocitose cutânea e 1 de mastocitose sistêmica. No geral, as marcações para o MMP-9 dos mastocitomas cutâneos foram muito intensas (++++) com 12 dos 28 casos a dar este resultado (Figura 10). Os mastocitomas extracutâneos tiveram sobretudo marcação intensa (+++) em 3 dos 4 casos (75%) (Tabela 14 e Figura 11).

Tabela 14 - Intensidade da marcação do MMP-9 dos mastocitomas cutâneos e extracutâneos

Tipo	-	+	++	+++	++++
Mastocitoma cutâneo	1	2	6	6	12
Bem diferenciado		1	5	4	8
Pouco ou moderadamente diferenciado	1	1	1	2	3
Pleomórfico					1
Mastocitoma extracutâneo				3	1
Bem diferenciado				1	
Pouco ou moderadamente diferenciado				2	
Indiferenciado					1
Total Geral	1	2	6	9	13

Verificou-se que nos mastocitomas cutâneos, os que demonstraram organização compacta tinham sobretudo marcação muito intensa (n=12, 42,9%). Os tumores com organização difusa apresentaram marcações intensas (n= 2, 40%) e muito intensas (n=3, 60%) (Tabela 15).

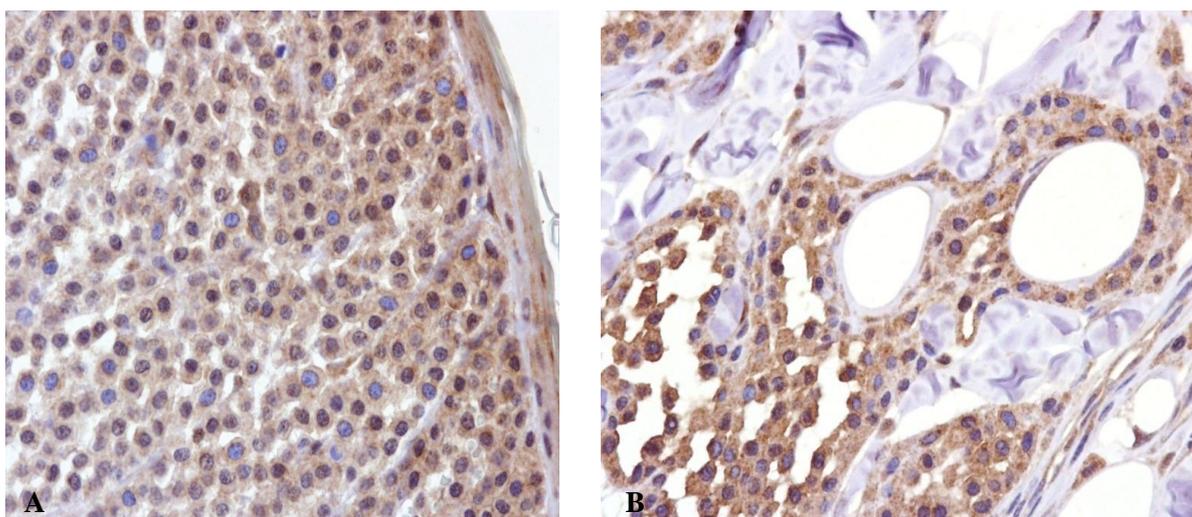


Figura 10 - A e B – Marcação para o MMP-9 em mastocitoma cutâneo. Marcação citoplasmática difusa, sendo igualmente visíveis alguns núcleos marcados. (MMP-9, Envision, Harris Haematoxylin, x400).

Os mastocitomas extracutâneos com organização compacta tiveram igual representação de marcações intensas e muito intensas com um caso de cada. Ambos os casos de mastocitoma extracutâneo com organização difusa tiveram marcação intensa.

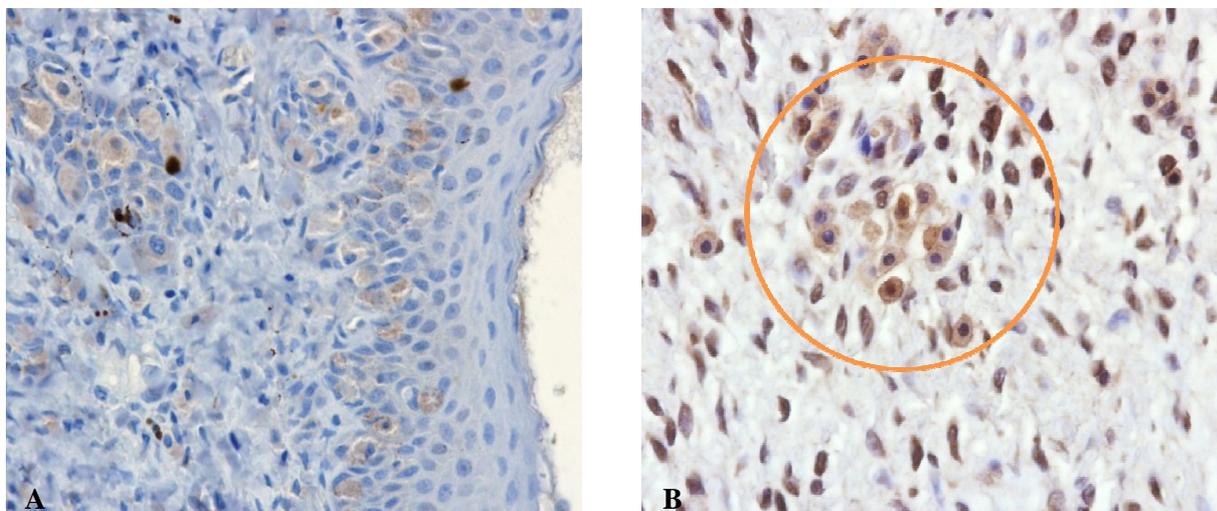


Figura 11 – Marcação de MMP-9 em mastocitoma extracutâneo. A - Marcação ténue de mastócitos na lâmina própria do lábio com invasão do epitélio; B - Forte marcação citoplasmática dos mastócitos e fibroblastos da vulva. (MMP-9, Envision, Harris Haematoxylin, x400).

Tabela 15 - Relação da intensidade da marcação para MMP-9 e organização difusa ou compacta das células tumorais

Tipo	-	+	++	+++	++++
Mastocitoma cutâneo	1	2	6	6	12
Compacto	1	2	6	4	9
Difuso				2	3
Mastocitoma extracutâneo				3	1
Compacto				1	1
Difuso				2	
Total Geral	1	2	6	9	13

Dos casos de mastocitose cutânea submetidos a marcação para MMP-9, um teve resultado negativo (20%), outro marcou intensamente (20%) e os restantes 3 marcaram muito intensamente (60%) (Figura 12). O único caso de mastocitose sistémico estudado para a presença desta enzima marcou de forma moderada (Tabela 16). Adicionalmente, observou-se, em diferentes tecidos, marcação citoplasmática intensa de eosinófilos e fibrócitos (Figuras 11-B e 12-B).

Tabela 16 - Intensidade da marcação para MMP-9 para os casos de mastocitose

Tipo	-	+	++	+++	++++
Mastocitose cutânea	1			1	3
Mastocitose sistémica			1		

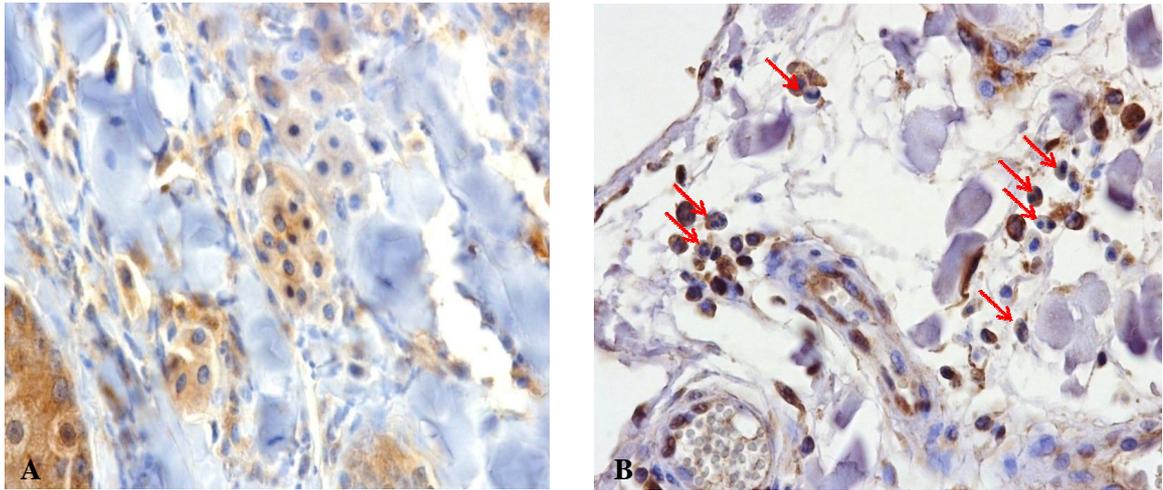


Figura 12 – Marcação de MMP-9 de casos de mastocitose cutânea. A - Mastócitos positivos na derme. No canto inferior esquerdo identifica-se uma glândula sebácea com marcação positiva; B - Eosinófilos também marcados para o MMP-9 conjuntamente com mastócitos (setas). (MMP-9, Envision, Harris Haematoxylin, x400).

Quanto à relação entre a intensidade de marcação e o grau de infiltração tecidual, observou-se que os casos de mastocitoma cutânea com infiltração profunda dos tecidos, atingindo a hipoderme, apresentaram, no geral, marcação leve a moderada (n=4, 80%), sendo que o único caso em que se observou também invasão do panículo muscular apresentou marcação muito intensa. A maioria dos casos em que havia apenas invasão de todas as camadas da derme (n=15, 71,4%) apresentou marcação intensa a muito intensa. Quanto aos 2 casos de invasão da epiderme, verificou-se que um deles tinha marcação muito intensa, mas o restante correspondeu ao único caso com marcação negativa (Figura 13).

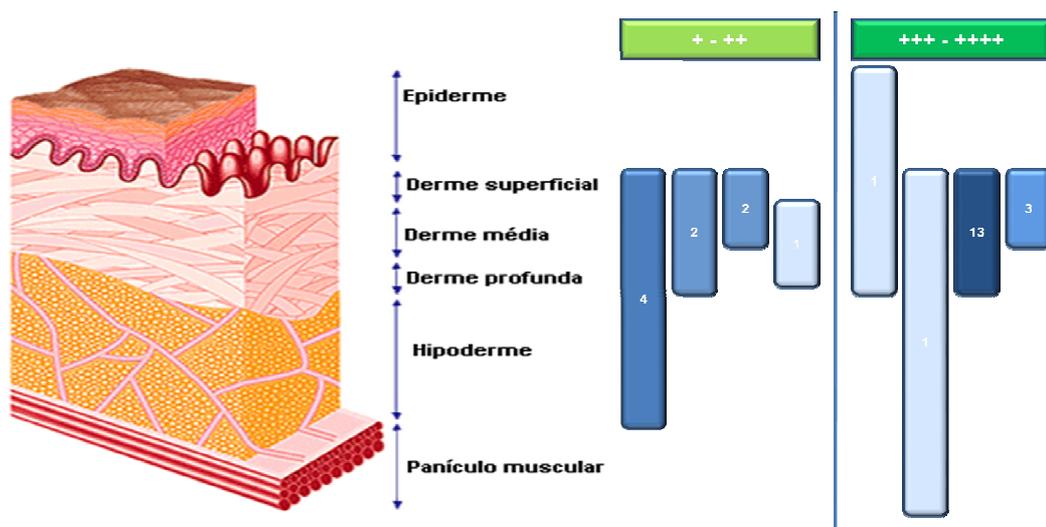


Figura 13 - Distribuição das células neoplásicas pelas diferentes camadas de pele e sua marcação para MMP-9. A intensidade da cor azul nas barras à direita é proporcional ao número de casos identificados.

Imagem adaptada de [http:// www.urgomedical.es147-la-piel](http://www.urgomedical.es147-la-piel).

Ainda quanto ao grau de infiltração dos mastócitos, todos os casos de mastocitose cutânea apresentavam apenas invasão dos planos da derme e a sua marcação foi sempre intensa a muito intensa, tirando o caso que não marcou.

5.6. Evolução clínica

a) Mastocitoma cutâneo

Dos 25 casos em que foi possível conhecer a evolução clínica, 12 (48%) não apresentaram recidiva e 7 (28%) morreram devido ao mastocitoma. Em cinco destes sete casos (71,4%) tinha sido diagnosticado mastocitoma bem diferenciado (Tabela 17).

Tabela 17 - Evolução clínica por tipo de mastocitoma

Mastocitoma bem diferenciado	14
Morte devida a mastocitoma	5
Morte devida a outra causa	3
Não recidivou	5
Recidivou	1
Mastocitoma moderadamente diferenciado	1
Não recidivou	1
Mastocitoma pouco diferenciado	7
Morte devida a mastocitoma	2
Não recidivou	5
Mastocitoma pleomórfico	3
Morte devida a outra causa	2
Não recidivou	1
Total Geral	25

Nos animais que morreram devido ao mastocitoma, um dos casos possuía o maior índice mitótico registado (20 células em mitose por cada 10 campos em grande ampliação), 4 (57,1%) não tinham um índice mitótico relevante, um caso tinha 3 células em mitose por cada 10 campos e um outro tinha 6.

A maior parte dos mastocitomas em que o número de mitoses não mostrou ser relevante (n=12; 70,6%) não recidivou ou os felinos afectados morreram por causa não associada ao mastocitoma (Tabela 18).

Tabela 18 - Relação entre a evolução clínica e o índice mitótico

Evolução clínica	Nº de mitoses por cada 10 campos em grande ampliação (x400)							Total Geral
	>1	1	3	4	6	8	20	
Morte devida a mastocitoma	4	1		1			1	7
Morte devida a outra causa	4	1						5
Não recidivou	8		1	1	1	1		12
Recidivou	1							1
Total Geral	17	1	2	1	2	1	1	25

b) Mastocitose cutânea

Nos 3 casos (60%) de mastocitose cutânea em que foi possível saber a evolução clínica, um dos animais não tinha tido recidiva, um segundo recidivou e respondeu bem a novo tratamento e num outro havia tido igualmente uma recidiva, mas desconhece-se se seria do mastocitoma ou do fibrossarcoma que também havia sido diagnosticado nesse animal.

c) Mastocitoma extracutâneo

Apenas se obtiveram informações referentes a 3 casos, sendo que 2 haviam morrido devido a outra causa, e o terceiro animal, que apresentava o mastocitoma a nível do lábio, não havia apresentado recidiva.

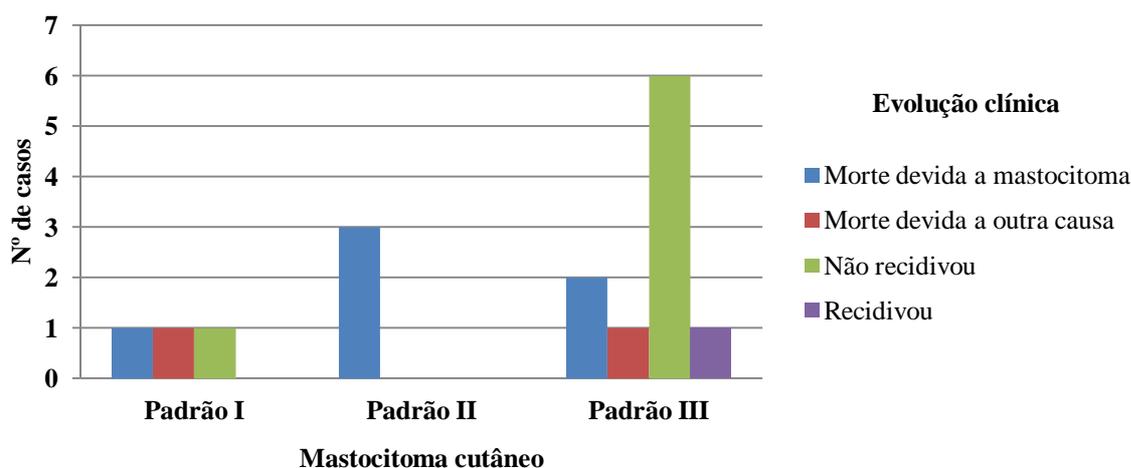
d) Mastocitose sistémica

Um dos animais foi eutanasiado pois, além de mastocitose sistémica, tinha ainda um carcinoma da mama com metástases no fígado. O outro animal realizou esplenectomia e fez quimioterapia, não tendo, até à data de edição do presente trabalho, apresentado progressão da doença.

e) Distribuição do padrão de expressão do CD117 e a evolução clínica do mastocitoma cutâneo

Verificou-se, no padrão I, um caso de morte devida a mastocitoma, bem como um outro sem recidivas. No padrão II, todos os 3 animais morreram devido ao mastocitoma. No caso do padrão III, 6 dos animais (60%) não apresentaram recidivas (Gráfico 2). No caso em que não houve marcação, o animal não voltou a ter recidiva.

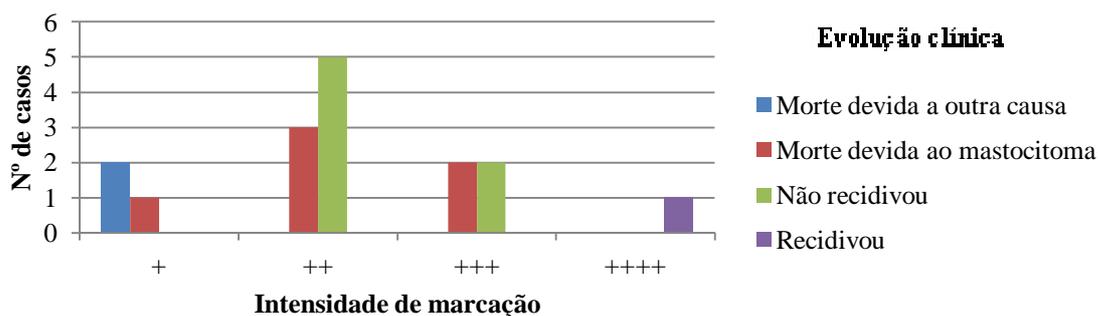
Gráfico 2- Relação entre a evolução clínica e o padrão de expressão do CD117 em casos de mastocitoma cutâneo



f) Distribuição da intensidade de marcação do CD117 e a evolução clínica

Relativamente à intensidade de marcação, verificou-se que 71,4% dos casos em que não houve recidivas marcaram de forma moderada, sendo que os restantes marcaram de forma intensa. Quanto aos casos em que se verificou recidiva, com ou sem a morte do animal, uma grande parte dos casos marcou de forma moderada (n=3, 42,85%). Todos os casos em que a morte se deveu a outra causa marcaram de forma ligeira (Gráfico 3).

Gráfico 3- Distribuição da intensidade da marcação do CD117 e a evolução clínica



g) Intensidade da marcação para MMP-9 dos casos de mastocitoma cutâneo relativamente à evolução clínica dos mesmos

A maioria dos casos que não apresentou recidivas (n=5, 71,43%) apresentou uma marcação muito intensa. Quanto aos casos que recidivaram, com ou sem a morte do animal, apresentaram maioritariamente uma intensidade moderada (n=3, 42, 86%) (Tabela 19).

Tabela 19 - Intensidade de marcação para MMP-9 dos casos de mastocitoma cutâneo relativamente à evolução clínica dos mesmos

Evolução clínica	++	+++	++++	Total Geral
Morte devida a outra causa		1	1	2
Morte devida ao mastocitoma	3	1	2	6
Não recidivou	1	1	5	7
Recidivou		1		1
Total Geral	4	4	8	16

Apenas há conhecimento da evolução clínica de um dos casos de mastocitoma extracutâneos testados para MMP-9 sendo que se tratava de um tumor que não recidivou e que marcou de forma intensa.

Nos casos de mastocitose cutânea, o caso com resultado negativo não recidivou, bem como 2 casos com marcação muito intensa. Um terceiro caso com marcação intensa recidivou mas nunca se chegou a saber se seria o mastocitoma ou um fibrossarcoma que também havia sido extirpado desse animal. Nos restantes dois casos desconhece-se a evolução clínica dos casos.

O caso de mastocitose sistémica testado para MMP-9, marcou de forma moderada e acabou por ser eutanasiado embora, além da mastocitose sistémica, tivesse também metastização de um carcinoma mamário no fígado, o que condicionou esta decisão.

6. Discussão

A proliferação anormal de mastócitos no gato tem sido estudada por diversos autores (Wilcock et al., 1986; Buerger & Scott, 1987; Chastain et al., 1988; Brown & Chalmers, 1990; Barr et al., 1993; Johnson et al., 2002; Noli et al., 2004; Lamm et al., 2009, Rodriguez-Cariño et al., 2009), sem que, no entanto tenha sido possível definir, como no cão (Patnaik, et al., 1984), um sistema de gradação histopatológico indicativo de prognóstico ou tempos de sobrevivência. Certo é que muito destes tumores, em especial os cutâneos, são, regra geral, benignos no gato. Os mastocitomas têm sido classificados de acordo com os órgãos que afectam, bem como com as suas características histopatológicas, tendo sido respeitada, o quanto possível, essa classificação, exceptuando o caso do mastocitoma gastrointestinal (Tamm & Vail, 2007; Rogers, 2009). Neste caso, optou-se pela classificação usada em medicina humana, que considera a existência do mastocitoma extracutâneo (Valent et al., 2001b). Embora não se tenha classificado nenhum dos casos estudados como atípico ou histiocítico (Wilcock et al., 1986; Buerger & Scott, 1987; Chastain et al., 1988), verificou-se a existência de diversos tumores pouco diferenciados, pelo que os dados correspondentes a estes foram comparados com o que está descrito para o mastocitoma cutâneo atípico.

No presente trabalho, relativamente aos casos de mastocitoma cutâneo, verificou-se que a média de idades para os nossos gatos era de 9 anos, tanto para machos como para fêmeas, o que coincide com o descrito na bibliografia (Goldshmidt & Hendrick, 2002; Gross et al., 2005). O mastocitoma atípico está descrito em animais jovens, com idades compreendidas entre as 6 semanas e os 4 anos (Wilcock et al., 1986). A média de idades dos casos de mastocitoma cutâneo pouco diferenciado estudados foi de 7 anos, tendo-se verificado uma maior proporção de gatos jovens, com idades compreendidas entre os 2 e 4 anos (37,5%), reforçando a predisposição para esta forma da doença. Os tumores caracterizados como pleomórficos foram 3 e tendo sido observados em gatos com idades compreendidas entre os 6 e 11 anos, sendo a média de 9,3 anos, um pouco menos que o descrito (6 a 19 anos, média 11,5 anos) (Johnson et al., 2002).

Também na predisposição sexual não se observaram divergências quanto à bibliografia, sendo que ambos os sexos se apresentavam igualmente representados.

A raça indeterminada foi a mais registada, seguida do Persa, o que se deve, com certeza, à sua representação na região de Lisboa e Vale do Tejo.

No caso dos mastocitomas atípicos, está descrita uma predisposição da raça Siamesa (Wilcock et al., 1986). Contudo, na presente casuística, só se registou um gato desta raça com a forma pouco diferenciada de mastocitoma cutâneo, o qual tinha menos de 4 anos como a maioria dos

animais descritos (Wilcock et al., 1986). Deve ser tido em conta que apenas 3 dos 38 gatos estudados eram Siameses, o que impede a emissão de qualquer conclusão quanto a esse facto. Verificou-se que a cabeça era o local maioritariamente afectado (39,47% dos casos) seguido do tronco (28,95%) e pescoço (10,53%), o que se encontra também descrito por outros autores (Buerger & Scott, 1987; Macy & Reynolds, 1981). A proporção de tumores múltiplos encontrada foi de 21,05%, menos que o referido noutros trabalhos (25,93 a 43%) (Buerger & Scott, 1987; Rodriguez-Cariño et al., 2009) e tinham, na sua maioria (63,16%), menos de 2 cm. Isto está de acordo com os poucos milímetros a 2 cm de diâmetro que a maioria da bibliografia refere (Buerger & Scott, 1987; Barr et al., 1993; Gross et al., 2005), embora Wilcock e associados (1986) refiram no seu estudo dimensões de 2 a 3 cm.

A infiltração por eosinófilos estava ausente na maioria dos casos (76,32%), observando-se, no entanto, uma maior proporção de casos positivos e com maior número de eosinófilos nos casos de mastocitoma pouco diferenciado (observáveis em 33,3% dos casos). Estes dados coincidem com o que está descrito para os casos de mastocitoma cutâneo histiocítico. A presença marcada de eosinófilos e o comportamento benigno desta forma (Buerger & Scott, 1987; Chastain et al., 1988; Wilcock et al., 1986), levou alguns autores a sugerir que se pudesse tratar, não de uma neoplasia, mas de uma reacção hiperplásica (Wilcock et al., 1986; Gross et al., 2005). Os linfócitos em infiltração focal, por outro lado, foram observados numa maior proporção de casos (63,16%). Isto é reportado por vários autores (Wilcock et al., 1986; Chastain et al., 1988; Gross et al., 2005), sendo que em alguns relatos se observaram 35,7% de casos com infiltração focal de linfócitos (Buerger & Scott, 1987) e noutros 80% (Johnson et al., 2002).

Os tumores observados apresentavam, na sua maioria (86,4%) uma organização compacta das suas células, o que confirma o que vem referido na bibliografia, que descreve os mastocitomas cutâneos como massas bem circunscritas e não encapsuladas (Wilcock et al., 1986; Gross et al., 2005).

A apoptose foi irrelevante em 50% dos casos e o índice mitótico foi baixo ou irrelevante na maioria dos casos (89,47%). Isto era de esperar, excepto nos casos de mastocitoma pleomórfico nos quais a actividade mitótica está descrita como sendo moderada a alta (Gross et al., 2005). No entanto, nenhum dos casos com maior índice mitótico dizia respeito a este tipo de tumor.

O mastocitoma cutâneo, na generalidade dos casos, afecta apenas a derme. Contudo, observou-se invasão da epiderme em 2 dos casos de mastocitoma moderadamente diferenciado, o que, embora raro, está descrito noutros trabalhos (Buerger & Scott, 1987; Lamm et al., 2009). Nos casos de mastocitoma pleomórfico, observou-se uma proporção

superior de invasão da hipoderme, relativamente aos restantes casos (66,6%), o que é de esperar, sendo que estes tumores estão descritos como sendo mais invasivos (Gross et al., 2005).

Apenas se verificou presença de recidivas em 32% dos casos, sendo que 75% correspondiam a mastocitomas bem diferenciados, pelo que parece não ser possível definir o prognóstico com base nas características histopatológicas destes tumores tal como outros autores afirmaram (Buerger e Scott, 1987; Molander-McCrary et al., 1998; Johnson et al., 2002). Mesmo o índice mitótico não pareceu auxiliar nesta tentativa de definir a malignidade destes tumores ao contrário do que foi descrito por Johnson e co-autores (2002). Dos casos em que se observou invasão da epiderme, apenas se obteve informações da evolução clínica de um deles, sendo que este não recidivou, contrariamente ao que foi descrito recentemente num outro caso de epiteliotropismo, no qual o autor considerou que o prognóstico deveria ser reservado devido à ausência de resposta à terapêutica por parte desse animal (Lamm et al., 2009). Contudo, esse animal apresentava também disseminação sistémica, o que terá com certeza influenciado o prognóstico mais do que o facto de os mastócitos invadirem o epitélio. Quanto à mastocitose cutânea, foi descrita a forma difusa num único caso (Brown & Chalmers, 1990) e a forma maculopapular em outros (Davis et al., 1992; Vitale et al., 1996), sendo que, no presente estudo, apenas a forma maculopapular de mastocitose cutânea foi encontrada em 5 animais.

Verificou-se que a idade dos animais estava compreendida entre os 3 e 14 anos, sendo a média de 7,5 anos. A literatura, embora escassa no que diz respeito a esta forma da doença, refere animais juvenis, com idades inferiores a 3 anos (Vitale et al., 1996; Noli et al., 2004). Não se pode considerar que haja predisposição sexual, embora se tenha registado a doença em maior número de machos (60%).

Foi posta a hipótese de que as raças hipotricóticas ou sem pêlo estariam predispostas para a mastocitose cutânea ou que a doença passaria despercebida em casos assintomáticos e sem prurido, uma vez que apenas foi descrita em gatos Esfinge e Devon Rex (Noli et al., 2004). Contudo, no presente estudo, observou-se que afectava maioritariamente gatos de raça indeterminada e, contrariando uma vez mais esta teoria, observou-se a sua presença num Persa, sob a forma de pápulas lineares de grandes dimensões ao longo do ventre, impossíveis de subdiagnosticar.

O local mais afectado foi o pavilhão auricular (60% dos casos), sendo que apenas em dois gatos se observaram lesões em locais referidos na bibliografia (ventre e região ventral do pescoço) (Vitale et al., 1996; Noli et al., 2004). As lesões apresentavam-se, na maioria dos casos (60%), com diâmetro superior a 2 cm.

Estavam presentes eosinófilos em 40% dos casos e em 80% verificava-se intensa reacção inflamatória. Estes dados levam a crer que a hipótese de que esta doença se poderá tratar de reacção de hipersensibilidade esteja correcta (Noli et al., 2004). A evolução clínica da mastocitose cutânea, demonstrou-se, regra geral, favorável, sendo que o único caso que recidivou, voltou a responder bem ao tratamento quimioterápico, que tinha no seu protocolo glucocorticóides associados, o que apoia esta teoria.

Nos 5 casos de tumores extracutâneos, sem disseminação sistémica, a localização foi bastante variada, sendo que um deles se encontrava na parede do estômago, outro na vulva, outro no mesentério e dois na mucosa oral. A idade média dos animais afectados por estes tumores foi de 10,5 anos (inferior aos 13 anos referidos para o mastocitoma gastrointestinal descrito em gato por Laurensen (2011)).

Apesar de se ter verificado maior proporção de fêmeas afectadas por mastocitoma extracutâneo (80%), devemos ter em conta que o reduzido tamanho da amostra não é representativo. A raça indeterminada era a única representada. Verificou-se que a presença de eosinófilos era rara e por vezes havia infiltrado inflamatório. Um caso demonstrou reacção fibromatosa o que coincide com o que por vezes é observado na forma gastrointestinal (Alroy et al., 1975 citado por Carpenter et al., 1987). Apenas os tumores afectando a mucosa oral eram bem diferenciados e é interessante observar que ambos apresentavam invasão epitelial, embora a causa seja desconhecida. Também foram os únicos tumores para os quais se obteve informações sobre a evolução clínica, sendo que um não teve recidivas e o outro morreu por outra causa, pelo que se pode verificar que, ao contrário do mastocitoma gastrointestinal que se apresenta como um tumor pouco diferenciado e de carácter maligno (Rogers, 2009), os mastocitomas que afectam a mucosa oral parecem ser tumores benignos e bem diferenciados.

A mastocitose sistémica está representada neste estudo apenas por dois casos. Ambos dizem respeito a animais de idade avançada (12 e 15 anos), sendo um macho e uma fêmea, ambos de raça indeterminada. Estes dados não se afastam muito do que está descrito na literatura, sendo a idade média descrita de 10 anos e não havendo predisposição racial ou sexual (Tamm & Vail, 2007; Rogers, 2009; Carpenter et al., 1987). Um destes tumores era pouco diferenciado ao passo que o outro era bem diferenciado, sendo que na literatura ambas as formas estão descritas (Carpenter et al., 1987). Não se observaram eosinófilos ou linfócitos. Num dos casos os folículos linfóides do baço apresentavam-se preservados, mas no outro havia atrofia dos mesmos. A bibliografia consultada descreve que normalmente estes se encontram preservados (Carpenter et al., 1987). Apenas um dos casos tinha, além do baço, invasão hepática, sendo que a bibliografia afirma que isto ocorre em 90% dos casos (Carpenter et al., 1987). O animal que apresentou células tumorais pouco diferenciadas encontra-se a fazer quimioterapia e

apresentou melhoria dos sintomas após esplenectomia, o que se encontra descrito na bibliografia (Tamm & Vail, 2007). O outro caso acabou por ser eutanasiado devido a outra causa.

Tal como referido noutros estudos (Webster et al., 2004; Gil da Costa et al., 2007; Oliveira, 2008; Rodriguez-Cariño et al., 2009), identificam-se três padrões de expressão para o c-kit (CD117): um padrão membranar (padrão I), um padrão perinuclear (padrão II) e um padrão citoplasmático difuso (padrão III).

De entre os 28 casos de mastocitoma cutâneo testados, apenas um não apresentou marcação, comprovando que a expressão de c-kit se mantém nas células deste tipo de tumor. No que diz respeito aos casos de mastocitoma extracutâneo e de mastocitose cutânea, para os quais não há estudos prévios, pelo menos do conhecimento do autor, o mesmo não se pode concluir, sendo que todos os casos testados foram negativos. O único caso de mastocitose sistémica avaliado apresentou uma marcação moderada. É possível que o caso de mastocitoma cutâneo com resultado negativo se deva a má preservação dos tecidos, e não se pode descartar a mesma hipótese nos restantes casos, já que o número destes pode não ser representativo (5 casos de mastocitoma extracutâneo e 3 de mastocitose cutânea).

No geral, observou-se sobretudo o padrão citoplasmático difuso nos casos de mastocitoma cutâneo (66,7%), seguido do padrão membranar (18,5%). Nos tumores bem diferenciados verificou-se que a marcação era principalmente do tipo citoplasmático difuso, seguido do membranar. No caso dos tumores pouco ou moderadamente diferenciados, verificou-se predominantemente um padrão citoplasmático difuso (75%), seguido do padrão perinuclear (25%), o que está em concordância com o observado num estudo anterior (Rodriguez-Cariño et al., 2009). O caso de mastocitoma pleomórfico submetido a imunohistoquímica demonstrou uma marcação membranar. Não há dados relativamente a este tipo de mastocitoma no gato com os quais se possa comparar.

Nos casos de mastocitoma cutâneo bem diferenciado observou-se principalmente uma marcação moderada (35,55%), enquanto que nos tumores pouco ou moderadamente diferenciados verificou-se igual predominância de todas as intensidades de marcação. Seria de esperar que estes tumores tivessem uma marcação intensa (Morini et al., 2004). Contudo, este não é um parâmetro tão objectivo quanto o padrão de expressão, podendo ser afectado pela opinião dos observadores, bem como as diferenças nos procedimentos de fixação (Preziosi et al., 2004).

Verificou-se que os animais cujos mastocitomas cutâneos apresentavam um padrão de expressão citoplasmático perinuclear acabaram por morrer da doença, ao passo que apenas 30% dos casos com um padrão difuso apresentaram recidivas. Isto entra em concordância

com um estudo prévio no cão (Preziosi et al., 2004), no qual se verificou que um padrão citoplasmático perinuclear estava associado a tumores de grau III, os quais têm pior prognóstico. Outro estudo, também em cão, associa um padrão citoplasmático a um comportamento mais agressivo, com maior risco de recidiva e menor tempo de sobrevida (Webster et al., 2004). Contudo, há estudos que afirmam que um padrão difuso está relacionado com a malignidade tumoral, sendo que, nesse estudo (Oliveira, 2008), os mastocitomas cutâneos caninos de grau I estavam associados a um padrão membranar, os de grau III a um padrão citoplasmático difuso e os de grau II, que têm maior variação nas taxas de sobrevivência, apresentavam um padrão mais heterogêneo. No entanto, o padrão difuso e perinuclear, podem reflectir alterações celulares semelhantes, com acumulação progressiva do c-kit que, ao longo do tempo, passa de perinuclear a difusa, pelo que é de questionar a relevância da sua distinção no contexto da avaliação da sobrevida (Gil da Costa et al., 2007; Oliveira, 2008). O único estudo disponível em gatos (Rodríguez-Cariño et al., 2009) não chegou a fazer uma ligação entre o prognóstico e o padrão de expressão de c-kit nestes tumores.

Quanto à intensidade da marcação, não se obtiveram resultados conclusivos no que diz respeito à sua ligação com o prognóstico, sendo que, tanto os casos em que a morte se deveu ao mastocitoma cutâneo, como aqueles que não recidivaram, apresentaram principalmente uma marcação moderada. Um estudo em cão concluiu que a intensidade de marcação tinha uma correlação inversa com o grau de diferenciação (Reguera et al., 2000) mas, como já foi anteriormente referido, este é um critério muito subjectivo e sujeito a falhas. Os casos com invasão epitelial demonstraram, um deles, marcação muito intensa, e o outro, moderada, ambos com um padrão citoplasmático difuso. Existe apenas um caso descrito de mastocitoma felino com invasão da epiderme que foi submetido a imunomarcação do CD117 (Lamm et al., 2009) e, embora não esteja descrita a intensidade da marcação, esta tinha também um padrão citoplasmático difuso. Nesse trabalho, também realizaram estudos por RT-PCR e observou-se 100% de homologia do RNA mensageiro do *c-kit* com o publicado em estudos com tecidos fetais de gato, pelo que mutações do mesmo não explicam este fenómeno. Uma hipótese colocada pelo autor, foi de que citocinas libertadas regionalmente poderiam estar na origem da infiltração da epiderme pelos mastócitos tumorais.

No cão, a actividade da MMP-9 está descrita como estando relacionada com o grau histológico de malignidade tumoral, encontrando-se dramaticamente aumentada em tumores de grau III quando comparados com tumores de grau II (Leibman et al., 2000). No presente estudo, a generalidade dos casos marcou de forma muito intensa, tornando muito difícil tirar qualquer conclusão sobre a sua expressão, sendo que os mastocitomas cutâneos não

recidivantes marcaram maioritariamente de forma muito intensa, ao passo que os que recidivaram marcaram mais de forma moderada. Nos mastocitomas extracutâneos temos apenas um caso que não recidivou e marcou de forma muito intensa. Quanto à mastocitose cutânea, embora um caso não recidivante tenha tido resultado negativo, novamente se deve ter em conta que pode ter sido por má preservação dos tecidos, sendo que os outros casos não recidivantes tiveram uma marcação muito intensa. O caso que recidivou, embora não se saiba se a recidiva foi da mastocitose ou do fibrossarcoma anteriormente extirpado, mostrou marcação muito intensa, pelo que novamente não se podem tirar conclusões. O caso de mastocitose sistémica, curiosamente teve uma marcação moderada, sendo que se esperava que um tumor com capacidade de se propagar a nível sistémico tivesse maior expressão desta enzima, já que ela tem um papel muito importante na fuga ao sistema imunológico, na circulação e na extravasão para os tecidos, o que possibilita a disseminação sistémica (Yoon et al., 2002).

Quanto à invasão dos tecidos, verificou-se que a maioria dos casos com invasão de todas as camadas da derme tinha marcação muito intensa. Contudo, os tumores com marcação leve a moderada tinham maior representação na hipoderme (n=4, 80%), embora o caso com invasão do pânículo muscular tivesse marcação muito intensa. Torna-se algo inesperado que os tumores com infiltração de maior número de camadas da pele apresentem menor expressão desta enzima, já que a MMP-9 é importante na invasão dos tecidos e crescimento tumoral. Pode, no entanto, significar que as células tumorais libertaram a enzima para os tecidos envolventes com perda de expressão celular da mesma. Os casos com invasão da epiderme foram igualmente ambíguos: um marcou de forma muito intensa e o outro não marcou de todo.

7. Conclusão

O estudo efectuado a um grupo significativo de casos de proliferação de mastócitos em felinos, permite extrair alguns dados para auxiliar no diagnóstico e na avaliação do prognóstico, tal como indicado nos objectivos, infelizmente menos que o desejável, atendendo à falta de seguimento clínico em muitos dos casos, que impediu que se fizesse um estudo mais completo do tempo de sobrevivência dos animais afectados.

Contudo, foi possível concluir o seguinte:

1. Os mastocitomas em felinos apresentam-se como lesões benignas na generalidade dos casos, quando a proliferação é exclusivamente cutânea. A casuística dos mastocitomas extracutâneos foi escassa, não permitindo avaliar o respectivo prognóstico. Contudo, atendendo à localização das lesões, parece estar frequentemente associado a prognóstico reservado, especialmente por perda de função dos órgãos atingidos. Excepção será o mastocitoma do lábio ou da língua que estiveram persistentemente associados a evolução benigna na nossa casuística.
2. O mastocitoma cutâneo é geralmente uma lesão única, mas a apresentação múltipla não significa necessariamente pior prognóstico.
3. Não se verifica predisposição rácica ou sexual para qualquer dos mastocitomas.
4. Os animais afectados são, na generalidade dos casos, adultos, ainda que casos de mastocitoma cutâneo pouco diferenciado se observem em animais de idade jovem. Os casos de mastocitose sistémica parecem ser mais frequentes em animais com idade avançada (12 e 15 anos).
5. A localização dos mastocitomas cutâneos e da mastocitose cutânea é frequentemente a cabeça, com particular importância para os pavilhões auriculares.
6. O grau de diferenciação nos mastocitomas cutâneos nem sempre corresponde ao prognóstico, não sendo viável uma classificação baseada na morfologia celular, como sucede no cão.
7. A presença de mitoses, à excepção dos casos em que estas são muito numerosas, não traz valor acrescentado ao prognóstico. O mesmo se pode dizer do número de células em apoptose ou quanto à infiltração por eosinófilos ou linfócitos.
8. A mastocitose cutânea continua a ser uma entidade que necessita de ser estudada na perspectiva da sua caracterização mais detalhada, em especial no que se refere ao diagnóstico diferencial relativamente a lesões de hipersensibilidade. Isto deve-se ao facto de a maioria dos casos afectados por esta forma da doença se caracterizarem por intensa reacção inflamatória e pela presença de numerosos eosinófilos.

9. Verificou-se, na presente casuística, que a mastocitose cutânea não mostrava predileção por raças hipotricóticas nem por animais juvenis como chegou a ser postulado.
10. O padrão de marcação para CD117 parece ser útil no prognóstico do mastocitoma cutâneo, embora nas outras formas de proliferação anormal de mastócitos não tenha sido possível chegar à mesma conclusão.
11. O padrão membranar, com ou sem marcação citoplasmática difusa, tal como no cão, está ligado a maior diferenciação celular.
12. Não se verificou qualquer ligação entre a intensidade de marcação para o CD117 e o comportamento biológico dos mastocitomas.
13. O facto de, nas lesões proliferativas de mastócitos, muitas células inflamatórias e do estroma expressarem MMP-9 indica que o comportamento invasivo pode não depender exclusivamente da produção de metaloproteinases por parte dos mastócitos. A produção de outras proteínas de matriz deve ser estudada antes de se poder tirar qualquer conclusão.
14. Os casos de mastocitose cutânea, bem como alguns casos de mastocitoma cutâneo pouco diferenciado, poderiam beneficiar de estudos moleculares para se averiguar a presença de mutações na proteína membranar c-kit. Isto seria particularmente importante naqueles casos em que se põe em dúvida a sua natureza neoplásica, uma vez que algumas lesões adquirem características típicas de reacções de hipersensibilidade.

8. Bibliografia

- Akin, C., Fumo, G. Yavuz, A. S., Lipsky, P. E., Neckers, L. & Metcalfe, D. D. (2004). A novel form of mastocytosis associated with a transmembrane c-kit mutation and response to imatinib. *Blood*, 103(8), 3222-3225.
- Archer, R. K. (1980). The mast cell. *Journal of the Royal Society of Medicine* 73(5): 318-319.
- Arm, J. P. & Lee, T. H. (1993). Sulphidopeptide leukotrienes in asthma. *Clinical Science (London)*, 84(5), 501-510.
- Arock, M. (2004). Similarities and differences between mast cells and basophil. *Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique*, 44, 23-36.
- Ashman, L. K. (1999). The biology of stem cell factor and its receptor C-kit. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 31(10), 1037-1051.
- Barr, M. C., Butt, M. T., Anderson, K. L., Lin, D. S., Kelleher, T. F. & Scott, F. W. (1993). Spinal lymphosarcoma and disseminated mastocytoma associated with feline immunodeficiency virus infection in a cat. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 202(12), 1978-1980.
- Beningo, K. E., Scott, D. W., & Erb, H. N. (2000). Subepidermal linear alignment of mast cells in inflammatory dermatoses of the dog. *Veterinary Dermatology*, 11(1), 13-16.
- Bergers, G., Brekken, R., McMahon, G., Vu, T. H., Itoh, T., Tamaki, K., Tanzawa, K., Thorpe, P., Itohara, S., Werb, Z. & Hanahan, D. (2000). Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nature Cell Biology*, 2(10), 737-744.
- Besmer, P., Murphy, J. E., George, P. C., Qui, F., Bergold, P. J., Lederman, L., Snyder, H. W., Jr, Brodeur, D., Zuckerman, E. E. & Hardy, W. D. (1986). A new acute transforming feline retrovirus and relationship of its oncogene v-kit with the protein kinase gene family. *Nature*, 320(6061), 415-421.
- Boissan, M., Feger, F., Guillosson, J. J. & Arock, M. (2000). c-Kit and c-kit mutations in mastocytosis and other hematological diseases. *Journal of Leukocyte Biology*, 67(2), 135-148.
- Bortnowski, H. B. & Rosenthal, R. C. (1992). Gastrointestinal mast cell tumors and eosinophilia in two cats. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 28, 271-275.
- Boyce, A. B. (2010). Mast cells as sentinels of inflammation. In C.N. Serhan, P.A. Ward & D.W. Gilroy (Eds.), *Fundamentals of inflammation*. (pp. 65-73). Cambridge: Cambridge University Press.
- Braga, T., Grujic, M., Lukinius, A., Hellman, L., Åbrink, M., & Pejler, G. (2007). Serglycin proteoglycan is required for secretory granule integrity in mucosal mast cells. *Biochemical Journal*, 403(1), 49-57.

- Brockow, K., Akin, C., Huber, M., Scott, L. M., Schwartz, L. B. & Metcalfe, D. D. (2002). Levels of mast-cell growth factors in plasma and in suction skin blister fluid in adults with mastocytosis: correlation with dermal mast-cell numbers and mast-cell tryptase. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 109(1), 82-88.
- Brockow, K., Akin, C., Huber, M. & Metcalfe, D. D. (2005). IL-6 levels predict disease variant and extent of organ involvement in patients with mastocytosis. *Clinical Immunology*, 115(2), 216-223.
- Brown, C. A. & Chalmers, S. A. (1990). Diffuse Cutaneous Mastocytosis in a Cat. *Veterinary Pathology Online*, 27(5), 366-369.
- Brown, J. K., Tyler, C. L., Jones, C. A., Ruoss, S. J., Hartmann, T. & Caughey, G. H. (1995). Tryptase, the dominant secretory granular protein in human mast cells, is a potent mitogen for cultured dog tracheal smooth muscle cells. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 13(2), 227-236.
- Buerger, R. G. & Scott, D. W. (1987). Cutaneous mast cell neoplasia in cats: 14 cases (1975-1985). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 190(11), 1440-1444.
- Cairns, J. A. and Walls, A. F. (1996). Mast cell tryptase is a mitogen for epithelial cells. Stimulation of IL-8 production and intercellular adhesion molecule-1 expression. *Journal of Immunology*, 156(1), 275-283.
- Carpenter, J. L., Andrews, L. K., Holzworth, J. (1987). Tumors and tumor-like lesions. In J. Holzworth (Ed.), *Diseases of the cat: medicine & surgery*. (pp. 406- 596). Philadelphia: WB Saunders.
- Carter, M. C. & Metcalfe, D. D. (2007). Biology of mast cells and the mastocytosis syndrome. In K. Wolff, L. A. Goldsmith, S. I. Katz, B. A. Gilchrest, A. S. Paller & D. J. Leffell, *Fitzpatrick's Dermatology In General Medicine*. (7th ed.). (pp. 1434- 1443). New York: McGraw-Hill Companies, Inc.
- Caughey, G. H., Raymond, W. W., Wolters, P. J. (2000). Angiotensin II generation by mast cell alpha- and beta-chymases. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1480(1-2), 245-257.
- Chang, C. & Werb, Z. (2001). The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis. *Trends in Cell Biology*, 11(11), S37-S43.
- Chastain, C. B., Turk, M. A. & O'Brien, D. (1988). Benign cutaneous mastocytomas in two litters of Siamese kittens. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 193(8), 959-960.
- Chung, K. F. & Barnes, P. J. (1991). Role for platelet-activating factor in asthma. *Lipids*, 26(12), 1277-1279.
- Daly, M., Sheppard, S., Cohen, N., Nabity, M., Moussy, A., Hermine, O. & Wilson, H. (2011). Safety of Masitinib Mesylate in Healthy Cats. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 25(2), 297-302.
- Davis, B. J., Page, R., Sannes, P. L. & Meuten, D. J. (1992). Cutaneous mastocytosis in a dog. *Veterinary Pathology*, 29(4), 363-365.

- Dayton, E. T., Pharr, P., Ogawa, M., Serafin, W. E., Austen, K. F., Levi-Schaffer, F. & Stevens, R. L. (1988). 3T3 fibroblasts induce cloned interleukin 3-dependent mouse mast cells to resemble connective tissue mast cells in granular constituency. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(2), 569-572.
- Dunford, P. J., O'Donnell, N., Riley, J. P., Williams, K. N., Karlsson, C. & Thurmond, R. C. (2006). The histamine H4 receptor mediates allergic airway inflammation by regulating the activation of CD4⁺ T cells. *The Journal of Immunology*, 176(11), 7062-7070.
- Durand, B., Migliaccio, G., Yee, N. S., Eddleman, K., Huima-Byron, T., Migliaccio, A. R. & Adamson, J. W. (1994). Long-term generation of human mast cells in serum-free cultures of CD34+ cord blood cells stimulated with stem cell factor and interleukin-3. *Blood*, 84(11), 3667-3674.
- Egeblad, M. & Werb, Z. (2002). New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nature Reviews Cancer*, 2(3), 161-174.
- Enerbäck, L. & G. B. Löwhagen (1979). Long term increase of mucosal mast cells in the rat induced by administration of compound 48/80. *Cell and Tissue Research*, 198(2), 209-215.
- Fang, K. C., Raymond, W. W., Lazarus, S. C. & Caughey, G. H. (1996). Dog mastocytoma cells secrete a 92-kD gelatinase activated extracellularly by mast cell chymase. *The Journal of Clinical Investigation*, 97(7), 1589-1596.
- Fiore, E., Fusco, C., Romero, P. & Stamenkovic, I. (2002). Matrix metalloproteinase 9 (MMP-9/gelatinase B) proteolytically cleaves ICAM-1 and participates in tumor cell resistance to natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Oncogene*, 21(34), 5213-5223.
- Foster, A. P. (1994). A Study of the Number and Distribution of Cutaneous Mast Cells in Cats with Disease not Affecting the Skin. *Veterinary Dermatology*, 5(1), 17-20.
- Furitsu, T., Tsujimura, T., Tono, T., Ikeda, H., Kitayama, H., Koshimizu, U., Sugahara, H., Butterfield, J. H., Ashman, L. K. & Kanayama, Y. (1993). Identification of mutations in the coding sequence of the proto-oncogene c-kit in a human mast cell leukemia cell line causing ligand-independent activation of c-kit product. *Journal of Clinical Investigation*, 92(4), 1736-1744.
- Gantz, I., Schaffer, M., DelValle, J., Logsdon, C., Campbell, V., Uhler, M. & Yamada, T. (1991). Molecular cloning of a gene encoding the histamine H2 receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(2), 429-433.
- Gibson, P. C. & Cooper, K. (2002). CD117 (KIT): A Diverse Protein With Selective Applications in Surgical Pathology. *Advances in Anatomic Pathology*, 9(1), 65-69.
- Gibson, S. & Miller, H. R. P. (1986). Mast cell subsets in the rat distinguished immunohistochemically by their content in serine proteinases. *Immunology*, 58(1), 101 - 104.

- Gil da Costa, Matos, R., 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(1), 19.
- Goldshmidt, M. H. & Hendrick, M. J. (2002) Tumors of the skin and soft tissues. In D. J. Meuten (Ed.), *Tumors in domestic animals* (4th ed). (pp. 105- 109). Iowa: Iowa State University Press.
- Goldstein, S. M., Kaempfer, C. E., Kealey, J. T. & Wintroub, B. U. (1989). Human mast cell carboxypeptidase. Purification and characterization. *Journal of Clinical Investigation*, 83(5), 1630-1636.
- Gordon, S. S. N., McClaran, J. K., Bergman, P. J. & Liu, S. M. (2010). Outcome following splenectomy in cats. *Journal of Feline Medicine & Surgery*, 12(4), 256-261.
- Gorelik, L. & Flavell, R. A. (2001). Immune-mediated eradication of tumors through the blockade of transforming growth factor-beta signaling in T cells. *Nature Medicine*, 7(10), 1118-1122.
- Govier, S. M. (2003). Principles of treatment for mast cell tumors. *Clinical Techniques in Small Animal Practice*, 18(2), 103-106.
- Gross, T. L., Ihrke, P. J., Walder, E. J. & Affolter, V. K. (2005). Mast cell tumors. In *Skin diseases of the dog and cat: clinical and histopathologic diagnosis*. (2nd ed.). (pp. 853- 865). Oxford: Blackwell Science.
- Hadzijušufovic, E., Peter, B., Rebutzi, L., Baumgartner, C., Gleixner, K. V., Gruze, A., Thaiwong, T., Pickl, W.F., Yuzbasiyan-Gurkan, Y., Willmann, M. & Valent, P. (2009). Growth-inhibitory effects of four tyrosine kinase inhibitors on neoplastic feline mast cells exhibiting a Kit exon 8 ITD mutation. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 132(2-4), 243-250.
- Haig, D. M., McMenamin, C., Redmond, J., Young, I. G., Cohen, S. D. & Hapel, A. J. (1988). Rat IL-3 stimulates the growth of rat mucosal mast cells in culture. *Immunology*, 65(2), 205-211.
- Hanson, J. A., Papageorges, M., Girard, E., Menard, M. & Hebert, P. (2001). Ultrasonographic appearance of splenic disease in 101 cats. *Veterinary Radiology & Ultrasound*, 42(5), 441-445.
- Hasler, U. C. & van den Ingh, T. S. (1978). Malignant mastocytosis and duodenal ulceration in a cat. *Schweiz Arch Tierheilkd*, 120(5), 263-268.
- Hill, S. J., Ganellin, C. R., Timmerman, H., Schwartz, J. C., Shankley, N. P., Young J. M., Schunack, W., Levi, R. & Haas, H. L. (1997). International Union of Pharmacology. XIII. Classification of Histamine Receptors. *Pharmacological Reviews*, 49(3), 253-278.
- Hill, P. B. & Martin, R. J. (1998). A review of mast cell biology. *Veterinary Dermatology*, 9(3), 145-166.

- Howl, J. H. & Petersen, M. G. (1995). Intestinal mast cell tumor in a cat: presentation as eosinophilic enteritis. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 31(6), 457-461.
- Huang, E. J., Nocka, K. H., Buck, J. & Besmer, P. (1992). Differential expression and processing of two cell associated forms of the kit-ligand: KL-1 and KL-2. *Molecular Biology of the Cell*, 3(3), 349-362.
- Isotani, M., Tamura, K., Yagihara, H., Ono, K., Washizu, T. & Bonkobara, M. (2006). Identification of a c-kit exon 8 internal tandem duplication in a feline mast cell tumor case and its favorable response to the tyrosine kinase inhibitor imatinib mesylate. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 114(1-2), 168-172.
- Jilka, R. L., Hangoc, G., Girasole, G., Passeri, G., Williams, D. C., Abrams, J. S., Boyce, B., Broxmeyer, H. & Manolagas, S. C. (1992). Increased osteoclast development after estrogen loss: mediation by interleukin-6. *Science*, 257(5066), 88-91.
- Johnsen, M., Lund, L. R., Rømer, J., Almholt, K. & Danø, K. (1998). Cancer invasion and tissue remodeling: common themes in proteolytic matrix degradation. *Current Opinion in Cell Biology*, 10(5), 667-671.
- Johnson, T. O., Schulman, F. Y., Lipscomb, T. P., Yantis, L. D. (2002). Histopathology and Biologic Behavior of Pleomorphic Cutaneous Mast Cell Tumors in Fifteen Cats. *Veterinary Pathology Online*, 39(4), 452-457.
- Joris, I., Majno, G., Corey, E. J. & Lewis, R. A. (1987). The mechanism of vascular leakage induced by leukotriene E4. Endothelial contraction. *American Journal of Pathology*, 126(1), 19-24.
- Kahari, V. M. & Saarialho-Kere, U. (1997). Matrix metalloproteinases in skin. *Experimental Dermatology*, 6(5), 199-213.
- Kaliner, M. A. (1979). The Mast Cell — A Fascinating Riddle. *New England Journal of Medicine* 301(9), 498-499.
- Kerkela, E. & Saarialho-Kere, U. (2003). Matrix metalloproteinases in tumor progression: focus on basal and squamous cell skin cancer. *Experimental Dermatology*, 12(2), 109-125.
- 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.
- Kitamura, Y., Kanakura, Y., Fujita, J. & Nakano, T. (1987). Differentiation and Transdifferentiation of Mast Cells; a Unique Member of the Hematopoietic Cell Family. *The International Journal of Cell Cloning*, 5(2), 108-121.
- Kitamura, Y., Nakano, T. & Kanakura, Y. (1986). Transdifferentiation between Mast Cell Subpopulations. *Development, Growth & Differentiation*, 28(4), 321-325.

- Kulka, M. & Metcalfe, D. D. (2005). High-resolution tracking of cell division demonstrates differential effects of TH1 and TH2 cytokines on SCF-dependent human mast cell production in vitro: correlation with apoptosis and Kit expression. *Blood*, 105(2), 592-599.
- Lamm, C. G., Stern, A. W., Smith, A. J., Cooper, E. J., Ullom, S. W. & Campbell, G. A. (2009). Disseminated cutaneous mast cell tumors with epitheliotropism and systemic mastocytosis in a domestic cat. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 21(5), 710-715.
- Laurenson, M. P., Skorupski, K. A., Moore, P. F. & Zwingenberger, A. L. (2011). Ultrasonography of intestinal mast cell tumors in the cat. *Veterinary Radiology & Ultrasound*, 52(3), 330-334.
- Leibman, N. F., Lana, S. E., Hansen, R. A., Powers, B. E., Fettman, M. J., Withrow, S. J. & Ogilvie, G. K. (2000). Identification of Matrix Metalloproteinases in Canine Cutaneous Mast Cell Tumors. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 14(6), 583-586.
- Lin, T. J., Garduno, R., Boudreau, R. T., & Issekutz, A. C. (2002). Pseudomonas aeruginosa activates human mast cells to induce neutrophil transendothelial migration via mast cell-derived IL-1 alpha and beta. *Journal of Immunology*, 169(8), 4522-4530.
- Liu, C., Ma, X., Jiang, X., Wilson, S. J., Hofstra, C. L., Blevitt, J., Pyati, J., Li, X., Chai, W., Carruthers, N. & Lovenberg, T. W. (2001). Cloning and pharmacological characterization of a fourth histamine receptor (H₄) expressed in bone marrow. *Molecular Pharmacology*, 59(3), 420-426.
- Lohi, J., Harvima, I. & Keski-Oja, J. (1992). Pericellular substrates of human mast cell tryptase: 72,000 dalton gelatinase and fibronectin. *Journal of Cellular Biochemistry*, 50(4), 337-349.
- London, C., Galli, S., Yuuki, T., Hu, Z. Q., Helfand, S. C. & Geissler, E. N. (1999). Spontaneous canine mast cell tumours express tandem duplication in the proto-oncogene c-KIT. *Experimental Hematology*, 27, 689 - 697.
- London, C. A. & Seguin, B. (2003). Mast cell tumors in the dog. *Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice*, 33(3), 473-489, v.
- Longley, B. J., Jr., Morganroth, G. S., Tyrrel, L., Ding, T. G., Andersen, D. M., Williams, D. E. & Halaban, R. (1993). Altered metabolism of mast-cell growth factor (c-kit ligand) in cutaneous mastocytosis. *The New England Journal of Medicine*, 328(18), 1302-1307.
- Longley, B. J., Tyrrell, L., Lu, S. Z., Ma, Y. S., Langley, K., Ding, T. G., Duffy, T., Jacobs, P., Tang, L. H. & Modlin, I. (1996). Somatic c-KIT activating mutation in urticaria pigmentosa and aggressive mastocytosis: establishment of clonality in a human mast cell neoplasm. *Nature Genetics*, 12(3), 312-314.
- Longley, B. J., Tyrrell, L., Ma, Y., Williams, D. A., Halaban, R., Langley, K., Lu, H. S. & Schechter, N. M. (1997). Chymase cleavage of stem cell factor yields a bioactive, soluble product. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(17), 9017-9021.

- Longley, B. J. & Metcalfe, D. D. (2000). A proposed classification of mastocytosis incorporating molecular genetics. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, 14(3), 697-701, viii.
- Lovenberg, T. W., Roland, B. L., Wilson, S. J., Jiang, X., Pyati, J., Huvar, A., Jackson, M. R. & Erlander, M. G. (1999). Cloning and functional expression of the human histamine H3 receptor. *Molecular Pharmacology*, 55(6), 1101-1107.
- Lukacs, N. W., Strieter, R. M., Lincoln, P.M., Brownell, E., Pullen, D. M., Schock, H. J., Chensue, S. W., Taub, D. D. & Kunkel, S. L. (1996). Stem cell factor (c-kit ligand) influences eosinophil recruitment and histamine levels in allergic airway inflammation. *The Journal of Immunology*, 156(10), 3945-3951.
- Lutzelschwab, C., Lunderius, C., Enerbäck, L. & Hellman, L. (1998). A kinetic analysis of the expression of mast cell protease mRNA in the intestines of *Nippostrongylus brasiliensis*-infected rats. *European Journal of Immunology*, 28(11), 3730-3737.
- Ma, Y., Longley, B., 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 Investigativ Dermatology*, 112, 165 - 170.
- Macy, D. W. & Reynolds, H. A. (1981). *The incidence, characteristics and clinical management of skin tumors of cats*. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 17, 1026-1034.
- Madewell, B. R., Gunn, C. & Gribble, D. H. (1983). Mast Cell Phagocytosis of Red Blood Cells in a Cat. *Veterinary Pathology Online*, 20(5), 638-640.
- Madewell, B. R., Munn, R. J. & Philips, L. P. (1987). Endocytosis of erythrocytes in vivo and particulate substances in vitro by feline neoplastic mast cells. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 51(4), 517-520.
- Marcos, R., Santos, M., Pissarra, H. & Peleteiro, M. C.(2011). Pele, seus anexos e tecido subcutâneo. In Peleteiro, M. C., Matos, R., Santos, M., Correia, J., Pissarra, H., Carvalho, T., Atlas de Citologia Veterinária. (pp. 45-100). Lisboa: Lidel - Edições Técnicas, lda.
- Maxwell, D. L., Atkinson, B. A., Spur, B. W., Lessof, M. F. & Lee, T. H. (1990). Skin responses to intradermal histamine and leukotrienes C4, D4, and E4 in patients with chronic idiopathic urticaria and in normal subjects. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 86(5), 759-765.
- Mayrhofer, G. & Fisher, R. (1979). Mast cells in severely T-cell depleted rats and the response to infestation with *Nippostrongylus brasiliensis*. *Immunology*, 37(1), 145-155.
- McCawley, L. J. & Matrisian, L. M. (2001). Matrix metalloproteinases: they're not just for matrix anymore! *Current Opinion in Cell Biology*, 13(5), 534-540.
- Mehta, P. (1984). Potential role of platelets in the pathogenesis of tumor metastasis. *Blood*, 63(1), 55-63.

- Mellblom, L. (1980). A quantitative cytochemical study of the growth of individual mast cells. *Cell and Tissue Research*, 208(3), 485-497.
- Metcalf, D. D., Baram, D. & Mekori, Y. A. (1997). Mast cells. *Physiological Reviews*, 77(4), 1033-1079.
- Metcalf, D. D., Mekori, J. A. & Rottem, M. (1995). Mast cell ontogeny and apoptosis. *Experimental Dermatology*, 4(4 Pt 2), 227-230.
- Miller, M. A., Nelson, S. L., Turk, J. R., Pace, L. W., Brown, T. P., Shaw, D. P., Fischer, J. R. & Gosser, H. S. (1991). Cutaneous Neoplasia in 340 Cats. *Veterinary Pathology Online*, 28(5), 389-395.
- Miller, H. R. P. (1996). Mucosal mast cells and the allergic response against nematode parasites. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 54(1-4), 331-336.
- Miyazawa, K., Williams, D. A., Gotoh, A., Nishimaki, J., Broxmeyer, H. E. & Toyama, K. (1995). Membrane-bound Steel factor induces more persistent tyrosine kinase activation and longer life span of c-kit gene-encoded protein than its soluble form. *Blood*, 85(3), 641-649.
- Molander-McCrary, H., Henry, C. J., Potter, K., Tyler, J. W. & Buss, M. S. (1998). Cutaneous mast cell tumors in cats: 32 cases (1991-1994). *Journal of the American Animal Hospital Association*, 34(4), 281-284.
- 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.
- Nagata, H., Worobec, A. S., Oh, C. K., Chowdhury, B. A., Tannenbaum, S., Suzuki, Y. & Metcalf, D. D. (1995). Identification of a point mutation in the catalytic domain of the protooncogene c-kit in peripheral blood mononuclear cells of patients who have mastocytosis with an associated hematologic disorder. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(23), 10560-10564.
- Nilsson, G., Forsberg, G., K., Bodger, M. P., Ashman, L. K., Zsebo, K. M., Ishizaka, T., Irani, A. M. & Schwartz, L. B. (1993). Phenotypic characterization of stem cell factor-dependent human foetal liver-derived mast cells. *Immunology*, 79(2), 325-330.
- Nilsson, G., Metcalf, D. D. & Taub, D. D. (2000). Demonstration that platelet-activating factor is capable of activating mast cells and inducing a chemotactic response. *Immunology*, 99(2), 314-319.
- Noli, C., Colombo, S., Abramo, F. & Scarpella, F. (2004). Papular eosinophilic/mastocytic dermatitis (feline urticaria pigmentosa) in Devon Rex cats: A distinct disease entity or a histopathological reaction pattern? *Veterinary Dermatology*, 15(4), 253-259.
- Noli, C. & Miolo, A. (2001). The mast cell in wound healing. *Veterinary Dermatology*, 12(6), 303-313.
- Noli, C., Welle, M., Scarpella, F. & Abramo, F. (2003). Quantitative analysis of tryptase- and chymase-containing mast cells in eosinophilic conditions of cats. *Veterinary Pathology*, 40(2), 219-221.

- Noviana, D., Kono, F., Nagakui, Y., Shimizu, H., Mamba, K., Makimura, S. & Horii, Y. (2001). Distribution and enzyme histochemical characterisation of mast cells in cats. *Histochemistry Journal*, 33(11-12), 597-603.
- 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.
- Oliveira, S. H. P., Taub, D. D., Nagel, J., Smith, R., Hogaboam, C. M., Berlin, A. & Lukacs, N. W. (2002). Stem cell factor induces eosinophil activation and degranulation: mediator release and gene array analysis. *Blood*, 100(13), 4291-4297.
- Oliveira, J. M. P. (2008). *Aspectos patológicos do mastocitoma cutâneo canino: Relação com características epidemiológicas e clínicas*. Dissertação de candidatura ao grau de Doutor em Ciências Veterinárias. Vila Real: Universidade de Trás os Montes e Alto Douro.
- 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, 469-474.
- Peaston, A. E. & Griffey, S. M. (1994). Visceral mast cell tumour with eosinophilia and eosinophilic peritoneal and pleural effusions in a cat. *Australian Veterinary Journal*, 71(7), 215-217.
- Philippe, C., Philippe, B., Fouqueray, B., Perez, J., Leuret, M. & Baud, L. (1993). Protection from tumor necrosis factor-mediated cytolysis by platelets. *American Journal of Pathology*, 143(6), 1713-1723.
- Preziosi, R., Morini, M. & Sarli, G. (2004). Expression of the KIT protein (CD117) in primary cutaneous mast cell tumors of the dog. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 16(6), 554-561.
- Rassnick, K. M., Bailey, D. B., Flory, A. B., Balkman, C. E., Kiselow, M. A., Intile, J. L. & Autio, K. (2008). Efficacy of Vinblastine for Treatment of Canine Mast Cell Tumors. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 22(6), 1390-1396.
- Reber, L., Da Silva, C. A. & Frossard, N. (2006). Stem cell factor and its receptor c-Kit as targets for inflammatory diseases. *European Journal of Pharmacology*, 533(1-3), 327-340.
- Reguera, M., Rabanal, R., Puigdemont, A. & Ferrer, L. (2000). Canine mast cell tumors express stem cell factor receptor. *American Journal of Dermatopathology*, 22, 49 - 54.
- Rodriguez-Cariño, Fondevila, C., D., Segalés, J. & Rabanal, R. M. (2009). Expression of KIT Receptor in Feline Cutaneous Mast Cell Tumors. *Veterinary Pathology Online*, 46(5), 878-883.
- Rogers, K. S. (2009). Mast cell disease. In S. J. Ettinger & E. C. Feldman, *Veterinary Internal Medicine*. (7th ed.). (pp. 2193-2199). Missouri: Elsevier - Health Sciences Division.
- Ronnstrand, L. (2004). Signal transduction via the stem cell factor receptor/c-kit. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 61, 2535 - 2548.

- Ruoss, S. J., Hartmann, T. & Caughey, G. H. (1991). Mast cell tryptase is a mitogen for cultured fibroblasts. *The Journal of Clinical Investigation*, 88(2), 493-499.
- Sawicki, G., Salas, E., Murat, J., Miszta-Lane, H. & Radomski, M. W. (1997). Release of gelatinase A during platelet activation mediates aggregation. *Nature*, 386(6625), 616-619.
- Schechter, N., Irani, A. M., Sprows, J. L., Abernethy, J., Wintroub, B. & Schwartz, L. B. (1990). Identification of a cathepsin G-like proteinase in the MCTC type of human mast cell. *The Journal of Immunology*, 145(8), 2652-2661.
- Schwartz, L. B., Yunginger, J. W., Miller, J., Bokhari, R. & Dull, D. (1989). Time course of appearance and disappearance of human mast cell tryptase in the circulation after anaphylaxis. *The Journal of Clinical Investigation* 83(5), 1551-1555.
- Scott, D. W., Rothstein, E., Beningo, K. E. & Miller, Jr, W. H. (1998). Observations on the use of cyproheptadine hydrochloride as an antipruritic agent in allergic cats. *The Canadian Veterinary Journal*, 39(10), 634-637.
- Seawright, A. A. & Grono, L. R. (1964). Malignant mast cell tumour in a cat with perforating duodenal ulcer. *The Journal of Pathology and Bacteriology*, 87(1), 107-111.
- Shaw, J. O., Pinckard, R. N., Ferrigni, K. S., McManus, L. M. & Hanahan, D. J. (1981). Activation of human neutrophils with 1-O-hexadecyl/octadecyl-2-acetyl-sn-glycerol-3-phosphorylcholine (platelet activating factor). *Journal of Immunology*, 127(3), 1250-1255.
- Sheu, B.C., Hsu, S.M., Ho, H. N., Lien, H. C., Huang, S. C. & Lin, R. H. (2001). A Novel Role of Metalloproteinase in Cancer-mediated Immunosuppression. *Cancer Research*, 61(1), 237-242.
- Spangler, W. L. & Culbertson, M. R. (1992). Prevalence and type of splenic diseases in cats: 455 cases (1985-1991). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 201(5), 773-776.
- Sternlicht, M. D. & Werb, Z. (2001). How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 17, 463-516.
- Tam, E. K. & Caughey, G. H. (1990). Degradation of airway neuropeptides by human lung tryptase. *American Journal of Respirator Cellular and Molecular Biology*, 3(1), 27-32.
- Tamm, D. H. & Vail, D. M. (2007). Mast cell tumors. In S. J. Withrow & D. M. Vail, *Withrow and MacEwen's small animal clinical oncology*. (4th ed.). (pp. 402- 425). Missouri: Saunders Elsevier.
- Tanaka, A., Arai, K., Kitamura, Y. & Matsuda, H. (1999). Matrix Metalloproteinase-9 Production, a Newly Identified Function of Mast Cell Progenitors, Is Downregulated by c-kit Receptor Activation. *Blood*, 94(7), 2390-2395.
- Tharp, M. D. (1998). Mastocytosis. *Current Problems in Dermatology*, 10(5), 177-210.

- Theoharides, T. C., Boucher, W. & Spear, K. (2002). Serum interleukin-6 reflects disease severity and osteoporosis in mastocytosis patients. *International Archives of Allergy and Immunology*, 128(4), 344-350.
- Turrel, J. M., Farrelly, J., Page, R. L. & McEntee, M. C. (2006). Evaluation of strontium 90 irradiation in treatment of cutaneous mast cell tumors in cats: 35 cases (1992-2002). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 228(6), 898-901.
- Valent, P., Horny, H. P., Escribano, L., Longley, B. J., Li, C. Y., Schwartz, L. B., Marone, G., Nuñez, R., Akin, C., Sotlar, K., Sperr, W. R., Wolff, K., Brunning, R. D., Parwaresch, R. M., Austen, K. F., Lennert, K., Metcalfe, D. D., Vardiman, J. W. & Bennett, J. M. (2001a). Diagnostic criteria and classification of mastocytosis: a consensus proposal. *Leukemia Research*, 25(7), 603-625.
- Valent, P., Horny, H. P., Li, C. Y., Longley, B. J., Metcalfe, D. D., Parwaresch, R. M. & Bennett, J. M. (2001b). Mastocytosis (mast cell disease). In E. S. Jaffe, N. L. Harris, H. Stein, J. W. Vardiman (Eds.), *World Health Organization Classification of Tumors: Tumors of the Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. (pp. 291- 304). Lyon: International Agency for Research on Cancer (IARC)
- Valent, P., Akin, C., Horny, H. P., Arock, M., Lechner, K., Bennet, J. M. & Metcalfe, D. D. (2003). Diagnosis and treatment of systemic mastocytosis: state of the art. *British Journal of Haematology*, 122(5), 695-717.
- Vitale, C. B., Ihrke, P. J., Olivry, T. & Stannard, A. A. (1996). Feline urticaria pigmentosa in three related Sphinx cats. *Veterinary Dermatology*, 7(4), 227-233.
- Walls, A. F., Bennett, A. R., Sueiras-Diaz, J. & Olsson, H. (1992). The kininogenase activity of human mast cell tryptase. *Biochemical Society Transactions*, 20(3), 260S.
- Ward, J. M. & Hurvitz, A. I. (1972). Ultrastructure of Normal and Neoplastic Mast Cells of the Cat. *Veterinary Pathology Online*, 9(3), 202-211.
- Webster, J., Kiupel, M., Kaneene, J. B., Miller, R. & Yuzbasiyan-Gurkan, Y. (2004). The use of KIT and tryptase expression patterns as prognostic tools for canine mast cell tumors. *Veterinary Pathology*, 41, 371 - 377.
- 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 Online*, 44(3), 298-308.
- 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(3), 233-245.
- Weller, R. E. (1978). Systemic mastocytosis and mastocytemia in a cat. *Modern Veterinary Practice*, 59(1), 41-43.
- Westermarck, J. & Kähäri, V.-M. (1999). Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. *The FASEB Journal*, 13(8), 781-792.

- Wilcock, B. P., Yager, J. A. & Zink, M. C. (1986). The Morphology and Behavior of Feline Cutaneous Mastocytomas. *Veterinary Pathology Online*, 23(3), 320-324.
- Wolff, K., Komar, M. & Petzelbauer, P. (2001). Clinical and histopathological aspects of cutaneous mastocytosis. *Leukemia Research*, 25(7), 519-528.
- Yarden, Y., Kuang, W. J., Yang-Feng, T., Coussens, L., Munemitsu, S., Dull, T. J., Chen, E., Schlessinger, J., Francke, U. & Ullrich, A. (1987). Human proto-oncogene c-kit: a new cell surface receptor tyrosine kinase for an unidentified ligand. *The EMBO Journal*, 6(11), 3341-3351.
- Yarden, Y. & Ullrich, A. (1988). Molecular analysis of signal transduction by growth factors. *Biochemistry*, 27(9), 3113-3119.
- Yoon, S. O., Park, S. J., Yun, C. H. & Chung, A. S. (2003). Roles of matrix metalloproteinases in tumor metastasis and angiogenesis. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 36(1), 128-137.
- Yu, Q. & Stamenkovic, I. (2000). Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes & Development*, 14(2), 163-176.
- Zorn, T. M. T. (2004). Tecido conjuntivo. In J. Carneiro & L.C.U. Junqueira, *Histologia básica*. (10th ed.). (pp. 92- 124). Rio de Janeiro: Guanabara.
- Zsebo, K. M., Williams, D. A., Martin, F. H., Atkins, H. L., Hsu, R., Birkett, N. C., Okino, K. H., Murdock, D. C., Jacobsen, F. W., Langley, K. E., Smith, K. A., Takeish, T., Cattanch, B. M., Galli, S. J. & Suggs, S. V. (1990). Stem cell factor is encoded at the *SI locus* of the mouse and is the ligand for the c-kit tyrosine kinase receptor. *Cell*, 63(1), 213-224.

Anexo I - Processamento histológico automático em processador de tecidos LEICA TP 1020[®]

- A. Formol Tamponado 10%, 1 hora.**
- B. Álcool etílico 70°, 1 hora.**
- C. Álcool etílico 95°, 1 hora e 30 minutos.**
- D. Álcool etílico 95°, 1 hora e 30 minutos.**
- E. Álcool etílico absoluto, 1 hora.**
- F. Álcool etílico absoluto, 1 hora e 30 minutos.**
- G. Álcool etílico absoluto, 1 hora e 30 minutos.**
- H. Xilol, 1 hora.**
- I. Xilol, 1 hora.**
- J. Xilol, 1 hora.**
- K. Inclusão em Histosec Merck[®] a 65°C, 2 horas.**
- L. Inclusão em Histosec Merck[®] a 65°C, 2 horas.**

Anexo II - Coloração de Hematoxilina e Eosina (HE) (manual)

- A. Xilol, 5 minutos.**
- B. Álcool etílico absoluto, 1 minuto.**
- C. Álcool etílico 90°, 1 minuto.**
- D. Álcool etílico 70°, 1 minuto.**
- E. Água destilada, lavar bem.**
- F. Hematoxilina de Gill2, 30 segundos.**
- G. Água destilada, uma passagem.**
- H. Água corrente morna (Azular), cerca de 1 minuto.**
- I. Eosina-Floxina, 1 minuto.**
- J. Álcool 70°, 1 minuto.**
- K. Álcool etílico 96°, 1 minuto.**
- L. Álcool etílico absoluto, 1 minuto.**
- M. Xilol, 5 minutos.**
- N. Montagem em resina sintética (Entellan[®]).**

Anexo III - Coloração de Azul Toluidina (AT) (manual)

- A. Xilol, 5 minutos.**
- B. Álcool etílico absoluto, 1 minuto.**
- C. Álcool etílico 90°, 1 minuto.**
- D. Álcool etílico 70°, 1 minuto.**
- E. Água destilada, lavar bem.**
- F. Azul Toluidina, 30 segundos.**
- G. Lavar em água corrente (rápida).**
- H. Álcool 70°, 1 minuto.**
- I. Álcool etílico 96°, 1 minuto.**
- J. Álcool etílico absoluto, 1 minuto.**
- K. Xilol, 5 minutos.**
- L. Montagem em resina sintética (Entellan®).**

