

Daniela Sofia Ramos Paiva

**APLICAÇÃO DE TÉCNICAS DE DETEÇÃO DE APOPTOSE VERSUS  
PROLIFERAÇÃO CELULAR NO ESTUDO DO MASTOCITOMA CANINO**

**Trabalho de Projeto**

Mestrado em Enfermagem Veterinária de Animais de Companhia

Trabalho efetuado sob orientação de

Helena Vala



Agosto, 2014

(O Orientador)

---

(Professora Doutora Helena Vala)

”As doutrinas expressas neste trabalho são da exclusiva responsabilidade do  
autor”

(Este trabalho foi realizado segundo as regras do novo acordo ortográfico)

***“Only one who devotes himself to a cause with his whole strength and soul can be a true master. For this reason mastery demands all of a person.”***

Albert Einstein



## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço à Professora Helena Vala por ter sido a minha orientadora e me ter desafiado a fazer este trabalho. Obrigada por trabalhar tanto por mim e todos nós.

Agradeço também à Professora Carla Santos, co-orientadora, e a todos os professores que de alguma maneira contribuíram para me ajudar.

À Engenheira Carla Garcia pela ajuda que me disponibilizou no laboratório e pela boa disposição que sempre conseguia transmitir.

Agradeço aos meus pais por terem permitido continuar o meu percurso escolar e em especial à minha mãe pela ajuda preciosa que me deu ao longo deste trabalho. Obrigada pelo apoio, pela motivação e carinho. Não teria feito este trabalho sem ti.

5566.

Obrigada à Ana por toda a compreensão, amizade e entusiasmo.

Obrigada ao Mário. Há coisas que não mudam e nós somos uma delas.

Obrigada à Carolina e à Ritinha pelos bons tempos e pela amizade.

Obrigada a todos.

## **ABREVIATURAS**

<b>ADN</b>	Ácido Desoxirribonucleico
<b>IA</b>	Índice Apoptótico
<b>HS</b>	High-score
<b>TNF</b>	Fator de Necrose Tumoral
<b>FADD</b>	Fas-Associated protein with Death Domain
<b>TRADD</b>	Tumor necrosis factor receptor type 1-associated death domain protein
<b>DISC</b>	Complexo de sinalização indutor de morte
<b>IAP</b>	Proteínas inibidoras da apoptose
<b>TS</b>	Trans-sialidase
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>SCF</b>	Stem Cell Factor
<b>FNA</b>	Fine Needle Aspiration
<b>CVP</b>	Ciclofosfamida, Vinblastina e Prednisona
<b>TKI</b>	Tirosina quinase
<b>TUNEL</b>	Terminal Dupt Nick End-Labeling
<b>PCNA</b>	Proliferating cell nuclear antigen
<b>HPV</b>	Vírus do Papiloma Humano
<b>TBS</b>	Tris-Buffered Saline
<b>QS</b>	Quickscore

## Resumo

A apoptose é um mecanismo de morte celular programada que ocorre naturalmente nos tecidos. Alterações neste mecanismo podem resultar na formação de neoplasias.

O mastocitoma é uma das neoplasias cutâneas mais frequente em canídeos. O fator de prognóstico mais utilizado é o grau histológico. Porém, devido à imprevisibilidade desta neoplasia é necessário um melhor conhecimento do comportamento da mesma para se melhorarem competências em oncologia.

Neste projeto foram estudados 23 amostras de mastocitomas caninos de variadas idades, raça e sexo, que foram submetidas à técnica de imunohistoquímica de modo a analisar a expressão de dois marcadores pró-apoptóticos (TUNEL e Bax), um marcador anti-apoptótico (Bcl-2) e um marcador proliferativo (Ki-67).

A expressão de TUNEL, Bcl-2 e Ki-67 aumentou do grau I para o grau III do mastocitoma e a de Bax diminuiu. Houve também uma diminuição na expressão de Bax e Bcl-2 no mastocitomas de grau II e um ligeiro aumento na expressão de Ki-67 na mesma classe tumoral.

Observou-se assim maior atividade anti-apoptótica e aumento da proliferação celular, associados a um ao prolongamento na sobrevivência das células neoplásicas e, conseqüentemente, a um pior prognóstico, no grau de malignidade mais severo o grau III.

**Palavras-chave:** Apoptose, mastocitoma, prognóstico, imunohistoquímica, marcadores pró-apoptóticos, marcador anti-apoptótico.

## **Abstract**

Apoptosis is a mechanism of programmed cell death that occurs normally in tissues. Alterations in this mechanism can result in the formation of tumours.

The mastocytoma is one of the most frequent skin tumours in dogs. The most used prognostic factor is the histologic grading. However, due to the unpredictability of this neoplasia it is necessary to have a better understanding of its behaviour to improve skills in oncology.

In this project 23 samples of canine mastocytoma of various ages, race and sex, underwent immunohistochemical technique in order to analyze the expression of two pro-apoptotic markers (TUNEL and Bax), one anti-apoptotic marker (Bcl-2) and a proliferative marker (Ki-67).

The expression of TUNEL, Bcl-2 and Ki-67 increased from grade I to grade III in mastocytomas and in Bax that expression decreased. There was also a decrease in the expression of Bax and Bcl-2 in grade II mastocytomas and a minor increase in Ki-67 expression in the same tumour class.

It was observed a greater anti-apoptotic activity and increase in cell proliferation which is associated with an extension in the survival of neoplastic cells and, thereafter, a worse prognosis in a more severe degree of malignancy, grade III.

**Keyword:** Apoptosis, mastocytoma, prognosis, immunohistochemistry, pro-apoptotic markers, anti-apoptotic marker.

## ÍNDICE GERAL

<b>AGRADECIMENTOS.....</b>	<b>V</b>
<b>ABREVIATURAS.....</b>	<b>VI</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>VII</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>VIII</b>
<b>ÍNDICE GERAL.....</b>	<b>IX</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS.....</b>	<b>XI</b>
<b>INDICE DE QUADROS.....</b>	<b>XVIII</b>
<b>1.INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>3</b>
2.1.Apoptose.....	3
2.1.1.Apresentação morfológica.....	3
2.1.2.Apoptose vs necrose.....	4
2.1.3.Irreversibilidade.....	5
2.1.4.Mecanismos da apoptose.....	6
2.1.4.1. Caspases.....	6
2.1.4.2. Vias de sinalização.....	7
2.1.5.Apoptose na fisiologia.....	11
2.1.6. Apoptose nas diferentes patologias.....	11
2.2. Mastocitoma.....	14
2.2.1. Etiologia.....	17
2.2.2. Patogénese.....	18
2.2.3. Diagnóstico.....	20
2.2.4. Prognóstico.....	24
2.2.5. Tratamento.....	26
2.3. Apoptose vs oncologia.....	29
2.3.1. A apoptose nas diferentes neoplasias.....	30
2.3.2. A apoptose no mastocitoma.....	33
2.4. Marcadores de deteção da apoptose e proliferação celular.....	35
2.4.1. Marcadores apoptóticos.....	35
2.4.1.1. TUNEL.....	35
2.4.1.2. Família Bcl-2.....	36
2.4.2. Marcador de proliferação celular.....	37

2.4.2.1. Ki-67.....	37
<b>3.COMPONENTE PRÁTICA.....</b>	<b>40</b>
3.1.Objetivos.....	40
3.2.Material e Métodos.....	40
3.2.1. Casuística.....	40
3.2.2. Avaliação histopatológica.....	40
3.2.3. Imunohistoquímica.....	41
3.2.4. Avaliação da imunomarcação.....	44
3.3.Resultados.....	45
3.3.1. Casuística.....	45
3.3.2. TUNEL.....	49
3.3.3. Bax.....	52
3.3.4. Bcl-2.....	57
3.3.5. Razão Bcl-2/Bax.....	62
3.3.6. Ki-67.....	62
3.3.7. Iconografia.....	67
3.3.7.1. TUNEL.....	67
3.3.7.2. Bax.....	69
3.3.7.3. Bcl-2.....	74
3.3.7.4. Ki-67.....	79
3.4. Discussão.....	85
3.4.1. Casuística.....	86
3.4.2. TUNEL.....	86
3.4.3. Bax.....	87
3.4.4. Bcl-2.....	89
3.4.5. Razão Bcl-2/Bax.....	91
3.4.6. Ki-67.....	91
<b>4. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>93</b>
<b>5. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>94</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Esquema das vias de sinalização da apoptose.....	10
<b>Figura 2.</b> Mastocitoma de grau I, retirado do membro posterior de um Serra da Estrela fêmea de 8 anos (Foto gentilmente cedida pelo Laboratório de Anatomia Patológica da ESAV).....	15
<b>Figura 3.</b> Mastocitoma de grau I, retirado do membro posterior de um Basset Hound macho de 11 anos (Foto gentilmente cedida pelo Laboratório de Anatomia Patológica da ESAV).....	16
<b>Figura 4.</b> FNA de um mastocitoma, com numerosos grânulos. Coloração de Wright (adaptado de Withrow & Vail, 2007).....	21
<b>Figura 5.</b> FNA de um linfonodo de um canídeo com mastocitoma metastásico, sem grânulos no interior da célula tumoral. Coloração Diff-Quik (adaptado de Withrow & Vail, 2007).....	22
<b>Figura 6.</b> Aspirado de um linfonodo de um canídeo com mastocitoma cutâneo, com agregados de mastócitos (adaptado de Withrow & Vail, 2007).....	22
<b>Figura 7.</b> Remoção cirúrgica de um mastocitoma. <b>A</b> , Margens cirúrgicas planeadas. <b>B</b> , Após a excisão com margens alargadas e plano fascial profundo para alcançar a remoção completa (adaptado de Withrow & Vail, 2007).....	27
<b>Figura 8.</b> HS, imunomarcador TUNEL.....	50
<b>Figura 9.</b> Índices apoptóticos, imunomarcador TUNEL.....	51
<b>Figura 10.</b> HS, imunomarcador Bax.....	54
<b>Figura 11.</b> Média HS, imunomarcador Bax.....	55
<b>Figura 12.</b> Índices apoptóticos, imunomarcador Bax.....	56
<b>Figura 13.</b> Média dos índices apoptóticos, imunomarcador Bax.....	56
<b>Figura 14.</b> HS, imunomarcador Bcl-2.....	59
<b>Figura 15.</b> Média HS, imunomarcador Bcl-2.....	60
<b>Figura 16.</b> Índices apoptóticos, imunomarcador Bcl-2.....	61
<b>Figura 17.</b> Médias dos índices apoptóticos, imunomarcador Bcl-2.....	61
<b>Figura 18.</b> HS, imunomarcador Ki-67.....	64
<b>Figura 19.</b> Média HS, imunomarcador Ki-67.....	65
<b>Figura 20.</b> Índices proliferativos, imunomarcador Ki-67.....	66

<b>Figura 21.</b> Média dos índices proliferativos, Ki-67.....	66
<b>Figura 22.</b> Mastocitoma GI. Reação positiva moderada (++) . Caso nº 1.....	67
<b>Figura 23.</b> Mastocitoma GI. Reação positiva moderada (++) . Caso nº 1.....	67
<b>Figura 24.</b> Mastocitoma GI. Reação positiva moderada (++) . Caso nº 1.....	67
<b>Figura 25.</b> Mastocitoma GII. Reação positiva intensa (+++) . Caso nº 12.....	67
<b>Figura 26.</b> Mastocitoma GII. Reação positiva intensa (+++) . Caso nº 12.....	67
<b>Figura 27.</b> Mastocitoma GII. Reação positiva intensa (+++) . Caso nº 12.....	67
<b>Figura 28.</b> Mastocitoma GII. Reação positiva intensa (+++) . Caso nº 12.....	68
<b>Figura 29.</b> Mastocitoma GII. Reação positiva intensa (+++) . Caso nº 12.....	68
<b>Figura 30.</b> Mastocitoma GII. Reação positiva intensa (+++) . Caso nº 12.....	68
<b>Figura 31.</b> Mastocitoma GII. Reação positiva intensa (+++) . Caso nº 12.....	68
<b>Figura 32.</b> Mastocitoma GIII. Reação positiva muito intensa (++++). Caso nº 14.....	68
<b>Figura 33.</b> Mastocitoma GIII. Reação positiva muito intensa (++++). Caso nº 14.....	68
<b>Figura 34.</b> Mastocitoma GIII. Reação positiva muito intensa (++++). Caso nº 14.....	69
<b>Figura 35.</b> Mastocitoma GIII. Reação positiva muito intensa (++++). Caso nº 14.....	69
<b>Figura 36.</b> Mastocitoma GI. Reação positiva muito intensa (++++). Caso nº 2.....	69
<b>Figura 37.</b> Mastocitoma GI. Reação positiva muito intensa (++++). Caso nº 3.....	69



<b>Figura 38.</b> Mastocitoma GI. Reação positiva muito intensa (++++). Caso nº 4.....	69
<b>Figura 39.</b> Mastocitoma GI. Reação positiva muito intensa (++++). Caso nº 5.....	69
<b>Figura 40.</b> Mastocitoma GI. Reação positiva muito intensa (++++). Caso nº 5.....	70
<b>Figura 41.</b> Mastocitoma GII. Reação positiva moderada (++) . Caso nº 8.....	70
<b>Figura 42.</b> Mastocitoma GII. Reação positiva moderada (++) . Caso nº 8.....	70
<b>Figura 43.</b> Mastocitoma GII. Reação positiva moderada (++) . Caso nº 8.....	70
<b>Figura 44.</b> Mastocitoma GII. Reação positiva intensa (+++). Caso nº 9...70	
<b>Figura 45.</b> Mastocitoma GII. Reação positiva intensa (+++). Caso nº 9...70	
<b>Figura 46.</b> Mastocitoma GII. Reação positiva intensa (+++). Caso nº 9...71	
<b>Figura 47.</b> Mastocitoma GII. Reação positiva intensa (+++). Caso nº 10.71	
<b>Figura 48.</b> Mastocitoma GII. Reação positiva intensa (+++). Caso nº 10.71	
<b>Figura 49.</b> Mastocitoma GII. Reação positiva intensa (+++). Caso nº 10.71	
<b>Figura 50.</b> Mastocitoma GII. Reação positiva intensa (+++). Caso nº 11.71	
<b>Figura 51.</b> Mastocitoma GII. Reação positiva intensa (+++). Caso nº 11.71	
<b>Figura 52.</b> Mastocitoma GIII. Reação positiva muito intensa (++++). Caso nº 15.....	72
<b>Figura 53.</b> Mastocitoma GIII. Reação positiva muito intensa (++++). Caso nº 15.....	72
<b>Figura 54.</b> Mastocitoma GIII. Reação positiva muito intensa (++++). Caso nº 15.....	72
<b>Figura 55.</b> Mastocitoma GIII. Reação positiva muito intensa (++++). Caso nº 15.....	72
<b>Figura 56.</b> Mastocitoma GIII. Reação positiva intensa (+++). Caso nº 16.....	72
<b>Figura 57.</b> Mastocitoma GIII. Reação positiva intensa (+++). Caso nº 16.....	72
<b>Figura 58.</b> Mastocitoma GIII. Reação positiva intensa (+++). Caso nº 16.....	73

<b>Figura 59.</b> Mastocitoma GIII. Reação positiva intensa (+++). Caso nº 16.....	73
<b>Figura 60.</b> Mastocitoma GIII. Reação positiva moderada (++). Caso nº 17.....	73
<b>Figura 61.</b> Mastocitoma GIII. Reação positiva intensa (+++). Caso nº 18.....	73
<b>Figura 62.</b> Mastocitoma GIII. Reação positiva intensa (+++). Caso nº 18.....	73
<b>Figura 63.</b> Mastocitoma GIII. Reação positiva intensa (+++). Caso nº 18.....	73
<b>Figura 64.</b> Mastocitoma GI. Reação positiva débil (+). Caso nº 2.....	74
<b>Figura 65.</b> Mastocitoma GI. Reação positiva débil (+). Caso nº 2.....	74
<b>Figura 66.</b> Mastocitoma GI. Reação positiva débil (+). Caso nº 2.....	74
<b>Figura 67.</b> Mastocitoma GI. Reação positiva intensa (+++). Caso nº 3....	74
<b>Figura 68.</b> Mastocitoma GI. Reação positiva intensa (+++). Caso nº 4.....	74
<b>Figura 69.</b> Mastocitoma GI. Reação positiva intensa (+++). Caso nº 4.....	74
<b>Figura 70.</b> Mastocitoma GI. Reação positiva intensa (+++). Caso nº 4.....	75
<b>Figura 71.</b> Mastocitoma GI. Reação positiva moderada (++). Caso nº 5...75	
<b>Figura 72.</b> Mastocitoma GI. Reação positiva moderada (++). Caso nº 5...75	
<b>Figura 73.</b> Mastocitoma GII. Reação positiva débil (+). Caso nº 8.....	75
<b>Figura 74.</b> Mastocitoma GII. Reação positiva débil (+). Caso nº 8.....	75
<b>Figura 75.</b> Mastocitoma GII. Reação positiva débil (+). Caso nº 9.....	75
<b>Figura 76.</b> Mastocitoma GII. Reação positiva débil (+). Caso nº 9.....	76
<b>Figura 77.</b> Mastocitoma GII. Reação positiva débil (+). Caso nº 9.....	76
<b>Figura 78.</b> Mastocitoma GII. Reação positiva débil (+). Caso nº 10.....	76
<b>Figura 79.</b> Mastocitoma GII. Reação positiva débil (+). Caso nº 10.....	76
<b>Figura 80.</b> Mastocitoma GII. Reação positiva débil (+). Caso nº 10.....	76
<b>Figura 81.</b> Mastocitoma GII. Reação positiva débil (+). Caso nº 10.....	76
<b>Figura 82.</b> Mastocitoma GII. Reação positiva intensa (+++). Caso nº 11...77	
<b>Figura 83.</b> Mastocitoma GII. Reação positiva intensa (+++). Caso nº 11...77	
<b>Figura 84.</b> Mastocitoma GIII. Reação positiva intensa (+++). Caso nº 15..77	
<b>Figura 85.</b> Mastocitoma GIII. Reação positiva intensa (+++). Caso nº 15.....	77

<b>Figura 86.</b> Mastocitoma GIII. Reação positiva intensa (+++). Caso nº 15.....	77
<b>Figura 87.</b> Mastocitoma GIII. Reação positiva intensa (+++). Caso nº 15.....	77
<b>Figura 88.</b> Mastocitoma GIII. Reação positiva intensa (+++). Caso nº 15.....	78
<b>Figura 89.</b> Mastocitoma GIII. Reação positiva intensa (+++). Caso nº 16.....	78
<b>Figura 90.</b> Mastocitoma GIII. Reação positiva intensa (+++). Caso nº 16.....	78
<b>Figura 91.</b> Mastocitoma GIII. Reação positiva intensa (+++). Caso nº 16.....	78
<b>Figura 92.</b> Mastocitoma GIII. Reação positiva intensa (+++). Caso nº 17.....	78
<b>Figura 93.</b> Mastocitoma GIII. Reação positiva intensa (+++). Caso nº 17...78	
<b>Figura 94.</b> Mastocitoma GIII. Reação positiva débil (+). Caso nº 18.....	79
<b>Figura 95.</b> Mastocitoma GIII. Reação positiva débil (+). Caso nº 18.....	79
<b>Figura 96.</b> Mastocitoma GIII. Reação positiva débil (+). Caso nº 18.....	79
<b>Figura 97.</b> Mastocitoma GIII. Reação positiva débil (+). Caso nº 18.....	79
<b>Figura 98.</b> Mastocitoma GI. Reação positiva intensa (+++). Caso nº 5.....	79
<b>Figura 99.</b> Mastocitoma GI. Reação positiva intensa (+++). Caso nº 5.....	79
<b>Figura 100.</b> Mastocitoma GI. Reação positiva moderada (++). Caso nº 6.....	80
<b>Figura 101.</b> Mastocitoma GI. Reação positiva moderada (++). Caso nº 6.....	80
<b>Figura 102.</b> Mastocitoma GI. Reação positiva moderada (++). Caso nº 6.....	80
<b>Figura 103.</b> Mastocitoma GI. Reação positiva intensa (+++). Caso nº 22.....	80
<b>Figura 104.</b> Mastocitoma GI. Reação positiva intensa (+++). Caso nº 22.....	80
<b>Figura 105.</b> Mastocitoma GI. Reação positiva intensa (+++). Caso nº 23.....	80
<b>Figura 106.</b> Mastocitoma GI. Reação positiva intensa (+++). Caso nº 23.....	81
<b>Figura 107.</b> Mastocitoma GI. Reação positiva intensa (+++). Caso nº 23.....	81
<b>Figura 108.</b> Mastocitoma GI. Reação positiva intensa (+++). Caso nº 23.....	81
<b>Figura 109.</b> Mastocitoma GII. Reação positiva muito intensa (++++) . Caso nº 7.....	81
<b>Figura 110.</b> Mastocitoma GII. Reação positiva muito intensa (++++) . Caso nº 7.....	81

<b>Figura 111.</b> Mastocitoma GII. Reação positiva muito intensa (++++). Caso nº 7.....	81
<b>Figura 112.</b> Mastocitoma GII. Reação positiva débil (+). Caso nº 9...	82
<b>Figura 113.</b> Mastocitoma GII. Reação positiva moderada (++) . Caso nº 12.....	82
<b>Figura 114.</b> Mastocitoma GII. Reação positiva moderada (++) . Caso nº 12.....	82
<b>Figura 115.</b> Mastocitoma GII. Reação positiva moderada (++) . Caso nº 12.....	82
<b>Figura 116.</b> Mastocitoma GII. Reação positiva moderada (++) . Caso nº 12.....	82
<b>Figura 117.</b> Mastocitoma GII. Reação positiva moderada (++) . Caso nº 12.....	82
<b>Figura 118.</b> Mastocitoma GIII. Reação positiva muito intensa (++++). Caso nº 14.....	83
<b>Figura 119.</b> Mastocitoma GIII. Reação positiva muito intensa (++++). Caso nº 14.....	83
<b>Figura 120.</b> Mastocitoma GIII. Reação positiva muito intensa (++++). Caso nº 14.....	83
<b>Figura 121.</b> Mastocitoma GIII. Reação positiva muito intensa (++++). Caso nº 14.....	83
<b>Figura 122.</b> Mastocitoma GIII. Reação positiva muito intensa (++++). Caso nº 19.....	83
<b>Figura 123.</b> Mastocitoma GIII. Reação positiva muito intensa (++++). Caso nº 19.....	83
<b>Figura 124.</b> Mastocitoma GIII. Reação positiva muito intensa (++++). Caso nº 19.....	84
<b>Figura 125.</b> Mastocitoma GIII. Reação positiva moderada (++) . Caso nº 20.....	84
<b>Figura 126.</b> Mastocitoma GIII. Reação positiva moderada (++) . Caso nº 20.....	84
<b>Figura 127.</b> Mastocitoma GIII. Reação positiva moderada (++) . Caso nº 20.....	84

<b>Figura 128.</b> Mastocitoma GIII. Reação positiva muito intensa (++++).	
Caso nº 21.....	84
<b>Figura 129.</b> Mastocitoma GIII. Reação positiva muito intensa (++++).	
Caso nº 21.....	84
<b>Figura 130.</b> Mastocitoma GIII. Reação positiva muito intensa (++++).	
Caso nº 21.....	85
<b>Figura 131.</b> Mastocitoma GIII. Reação positiva muito intensa (++++).	
Caso nº 21.....	85

## ÍNDICE DE QUADROS

<b>Quadro 1.</b> Principais diferenças entre apoptose e necrose (adaptado de Elmore, 2007).....	5
<b>Quadro 2.</b> Raças mais predisponentes para o mastocitoma.....	14
<b>Quadro 3.</b> Classificação histológica do mastocitoma segundo Patnaik.....	24
<b>Quadro 4.</b> Epidemiologia e histopatologia referentes aos casos avaliados.....	46
<b>Quadro 5.</b> Reação imunohistoquímica obtida com marcador TUNEL.....	49
<b>Quadro 6.</b> Score final das amostras testadas com TUNEL.....	49
<b>Quadro 7.</b> Valores de HS referentes às amostras testadas com TUNEL....	50
<b>Quadro 8.</b> Índice apoptótico das amostras testadas com TUNEL.....	51
<b>Quadro 9.</b> Reação imunohistoquímica obtida com marcador Bax.....	52
<b>Quadro 10.</b> Score final das amostras testadas com Bax.....	53
<b>Quadro 11.</b> Valores de HS referentes às amostras testadas com Bax.....	54
<b>Quadro 12.</b> Índice apoptótico das amostras testadas com Bax.....	55
<b>Quadro 13.</b> Reação imunohistoquímica obtida com marcador Bcl-2.....	57
<b>Quadro 14.</b> Score final das amostras testadas com Bcl-2.....	58
<b>Quadro 15.</b> Valores de HS referentes às amostras testada com Bcl-2.....	59
<b>Quadro 16.</b> Índice apoptótico das amostras testadas com Bcl-2.....	60
<b>Quadro 17.</b> Razão Bcl-2/Bax, segundo IA.....	62
<b>Quadro 18.</b> Reação imunohistoquímica obtida com marcador Ki-67.....	63
<b>Quadro 19.</b> Score final das amostras testadas com Ki-67.....	63
<b>Quadro 20.</b> Valores de HS referentes às amostras testada com Ki-67.....	64
<b>Quadro 21.</b> Índice proliferativo das amostras testadas com Ki-67.....	65

## 1. INTRODUÇÃO

O mastocitoma é uma das neoplasias mais frequentes em canídeos, representando cerca de 16% a 21% de todos os tumores cutâneos e de 11% a 27% de todos os tumores malignos de pele (Navega, 2011).

Por apresentarem um comportamento biológico muito variável torna-se necessário encontrar parâmetros clínicos que possam ter utilidade diagnóstica e/ou prognóstica, sendo que o próprio grau histológico, pela classificação de Patnaik, é dos parâmetros mais utilizados. Este conhecimento torna-se mais importante nos mastocitomas de grau II (intermédio) já que neste grupo se encontram mastocitomas que partilham características dos tumores de grau I (diferenciados) e grau III (indiferenciados).

Este estudo teve como objetivo tentar obter mais informação acerca desta neoplasia, ao tentar correlacionar a apoptose e a proliferação com um prognóstico. Para tal, avaliou-se a expressão da apoptose com os marcadores pró-apoptóticos TUNEL e Bax, e o marcador anti-apoptótico Bcl-2, e a expressão da proliferação celular com o marcador Ki-67.

A razão Bcl-2/Bax foi avaliada já que é esta que determina o estado da apoptose nas células tumorais. Quando o nível de Bcl-2 é mais elevado que de Bax, a primeira forma um homodímero que irá suprimir a apoptose. Se os dois estiverem no mesmo nível podem formar um heterodímero que terminará o processo da apoptose. O homodímero formado por Bcl-2 pode estar relacionado com a carcinogénese nos estádios iniciais. Depois da formação da neoplasia, o heterodímero formado por Bcl-2 e Bax é relacionado com a baixa expressão de Bcl-2 (Sun *et al.*, 2002).

Estas proteínas coexistem nos tecidos, por isso, a avaliação da sua razão (Bcl-2/Bax) é importante, visto ser esta que determina a indução ou a inibição da apoptose. Quando esta razão é maior que 1 o sinal anti-apoptótico é predominante e quando é menor que 1 o mecanismo apoptótico ocorre (Porichi *et al.*, 2009).

Dado o fato de todos os mastocitomas serem potencialmente malignos, a sua frequência e o seu comportamento variável torna-se necessário conseguir prever a evolução desta neoplasia de modo a planejar o tratamento mais adequado.

Com o crescente desenvolvimento do papel do Enfermeiro Veterinário torna-se importante que este possua novos conhecimentos em várias áreas que possam vir a ser úteis no auxílio ao Médico Veterinário. O objetivo final deste projeto foi providenciar ao Enfermeiro Veterinário informação acerca desta neoplasia tão frequente para que melhore as suas competências em oncologia.



## **1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **1.1. APOPTOSE**

A apoptose é um mecanismo biológico de morte celular programada que evita que as células com ADN danificado sobrevivam e se dividam, propagando o dano somático às células-filha (Dogu & Díaz, 2009). Este termo surgiu em 1972 e foi usado por Kerr, Wyllie e Currie para descrever os aspetos morfológicos da morte celular.

O fenómeno apoptose ocorre normalmente durante o desenvolvimento e envelhecimento celular e atua como um mecanismo homeostático para manter a população celular nos tecidos (Kerr, 2002; Elmore, 2007). Também ocorre como um mecanismo de defesa, como é o caso das reações imunitárias ou quando as células são danificadas por doenças ou agentes nocivos (Cohen, 1997; Norbury & Hickson, 2001).

É um processo coordenado que pode despende de energia (ATP) o qual envolve a ativação de um grupo de proteases de cisteína, denominadas caspases, e uma complexa cascata de eventos (Elmore, 2007). De acordo com Cohen (1997), a apoptose divide-se em 2 fases, sendo a primeira um compromisso para a morte celular e a segunda caracterizada por modificações morfológicas e estereotipadas da estrutura celular, o que sugere um mecanismo de execução comum, nas diferentes células.

Apesar da apoptose ser frequentemente vista como um mecanismo de eliminação de células com danos irreparáveis, que podem ameaçar a saúde do organismo, o limite de dano necessário para desencadear esta função é altamente dependente do tipo de célula (Norbury & Hickson, 2001).

#### **1.1.1. APRESENTAÇÃO MORFOLÓGICA**

A apoptose provoca o encolhimento celular. Como consequência é possível observar a condensação e fragmentação da cromatina nuclear, compactação das organelas, a dilatação do retículo endoplasmático, a

diminuição do volume celular e a alteração na permeabilidade da membrana plasmática.

Durante as fases iniciais da apoptose é possível observar ao microscópio óptico encolhimento celular e picnose (Kerr *et al.*, 1972). Ao encolher a célula obriga todas as suas organelas a ficarem compactadas e o citoplasma a densificar, levando a cromatina a condensar (picnose).

De acordo com Elmore (2007) aparecem protuberâncias (blebs) na membrana plasmática, causadas pela dissociação entre o citoesqueleto e a membrana plasmática, seguidos de cariorréxis e separação de fragmentos celulares (blebbing), formando corpos apoptóticos. Os corpos apoptóticos são constituídos por uma porção de citoplasma, organelas (na íntegra) fortemente compactadas, e podem ter ou não fragmentos nucleares, envoltos em membrana plasmática intacta. De seguida, os corpos apoptóticos são fagocitados por macrófagos ou células do parênquima, ocorrendo a sua degradação dentro de fagolisossomas. Estes macrófagos são denominados “tingible body macrophages” e podem ser encontrados dentro de centros germinativos de folículos linfóides ou, ocasionalmente, dentro do córtex do timo.

### 1.1.2. APOPTOSE VS NECROSE

Existem mecanismos de controlo no organismo que detetam células que se encontram danificadas. A destruição das mesmas ajuda a minimizar a progressão maligna e pode ocorrer de duas vias distintas: necrose ou apoptose (Dogu & Díaz, 2009).

A necrose é uma forma de dano celular letal que, embora seja diferente da apoptose, partilha com esta uma rede bioquímica, que é descrita como “apoptosis-necrosis continuum” (Zeiss, 2003). As principais diferenças entre estes dois processos encontram-se descritas no Quadro 1.

A morte da célula, seja por apoptose ou por necrose vai depender da natureza do sinal da morte celular, do tipo de tecido, do estado de desenvolvimento deste último e do meio fisiológico. Estes dois processos podem ocorrer independente, sequencial ou simultaneamente, dependendo de fatores como a intensidade, a duração e o tipo de estímulo, a dimensão

da redução da disponibilidade de ATP (Zeiss, 2003; Elmore, 2007). A apoptose pode converter-se em necrose, caso haja, por exemplo, uma diminuição da disponibilidade de caspases e ATP intracelular. O dano da célula necrótica é mediado por 2 mecanismos principais: interferência com o abastecimento de energia celular e dano direto à membrana celular (Elmore, 2007), razão pela qual Majno & Joris (1995) defendem a teoria de que as células morrem, muito antes, de ser possível a visualização de alterações necróticas ao microscópio ótico.

**Quadro 1. Principais diferenças entre apoptose e necrose (adaptado de Elmore, 2007)**

	<b>APOPTOSE</b>	<b>NECROSE</b>
<b>ORGANIZAÇÃO CELULAR</b>	Células individuais ou pequenas aglomerações	Células contíguas, grandes aglomerações
<b>ASPETO CELULAR</b>	Encolhimento celular	Edema celular
<b>MEMBRANA CITOPLASMÁTICA</b>	Intacto	Sofrem rotura
<b>CITOPLASMA</b>		
<b>ORGANELAS</b>		
<b>PROCESSOS NUCLEARES</b>	Picnose e cariorréxis	Picnose, cariorréxis e cariólise
<b>INFLAMAÇÃO</b>	Não	Sim
<b>ENERGIA</b>	Dependente	Independente

### 1.1.3. IRREVERSIBILIDADE

Muitos dos genes responsáveis pelos processos de morte e absorção já foram identificados (Elmore, 2007). A apoptose era vista como um processo irreversível, porém, estudos feitos por Hoepfner *et al.* (2001) revelaram que, ao bloquear os genes de absorção em embriões de

*Caenorhabditis elegans*, a sobrevivência celular aumentava quando as células eram sujeitas a sinais pró-apoptóticos fracos.

#### 1.1.4. MECANISMOS DA APOPTOSE

Os mecanismos da apoptose são altamente complexos e sofisticados e envolvem uma cascata de eventos moleculares que dependem de energia (Elmore, 2007). Atualmente, encontram-se descritos dois caminhos ou vias principais, pelos quais a apoptose se pode desencadear: a via extrínseca ou citoplasmática e a via intrínseca ou mitocondrial. Apesar de serem dois caminhos inicialmente distintos estes cruzam-se numa fase comum que consiste na ativação da caspase 3.

As células que sofrem apoptose exibem várias modificações bioquímicas. A clivagem de proteínas, através das caspases, apresenta-se como uma das principais características bioquímicas das células apoptóticas. A origem deste nome está no facto de ser uma protease de cisteína, daí o “c”, e por clivar resíduos de ácido aspártico, daí “aspase” (Cohen, 1997; Norbury & Hickson, 2001).

Outra modificação importante é a ligação de proteínas, através de uma ligação covalente, de modo a torná-las numa única proteína mais estável na sua estrutura (Hayworth, s/d). Esta ligação é conseguida através da expressão e ativação da transglutaminase tecidual (Elmore, 2007).

Ocorre também o colapso do ADN por endonucleases, que dependem de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ , resultando em fragmentos de ADN de 180 a 200 pares de base (Bortner *et al.*, 1995).

Por último, há o reconhecimento prematuro de marcadores, presentes na superfície da célula, por parte das células vizinhas, de modo a que ocorra uma rápida fagocitose, sem comprometimento do tecido envolvente (Elmore, 2007).

##### 1.1.4.1. CASPASES

As caspases encontram-se primeiro numa forma inativa, na forma de proenzimas, pois são assim sintetizadas. Após a sua ativação, feita por

clivagem em locais específicos do aspartato, estas têm o poder de ativar outras caspases, de modo a criar a cascata de caspases que amplifica a via de sinalização apoptótica, levando a uma morte celular mais rápida. Algumas procaspases podem agregar-se e auto ativar-se (Elmore, 2007). As caspases têm uma atividade proteolítica que faz a clivagem de proteínas durante a cascata. Quando a cascata é ativada o processo torna-se irreversível, culminando na morte celular e formação de corpos apoptóticos. As principais caspases identificadas até hoje são as caspases iniciadoras (caspase 2, 8, 9, 10), as caspases executoras (caspase 3, 6, 7) e as caspases inflamatórias (caspase 1, 4, 5) (Cohen, 1997; Rai *et al.*, 2005), enquanto Cao *et al.* (2013) afirmam que existem apenas 2 classes de caspases envolvidas na apoptose que ocorre em mamíferos: as iniciadoras e as executoras. Em humanos, são as caspases 8 e 9 que têm um papel chave na cascata de caspases, enquanto outras têm um papel executor (Norbury & Hickson, 2001).

#### 2.1.4.2. VIAS DE SINALIZAÇÃO

##### **a) extrínseca**

A via extrínseca ou citoplasmática é mediada por recetores de morte que se localizam na superfície da membrana celular. Estes recetores de morte são membros da superfamília do gene recetor fator de necrose tumoral (TNF) que contém proteínas que estão envolvidas não só na apoptose, como também na proliferação e diferenciação celular (Norbury & Hickson, 2001; Suliman *et al.*, 2001, Elmore, 2007). Os ligandos e seus respetivos recetores melhor caracterizados até à data são FasL/FasR, TNF- $\alpha$ /TNFR1, Apo3L/DR3, Apo 2L/DR4, Apo2L/DR5 (Elmore, 2007). É através destes recetores que é transmitido o sinal da superfície para o interior da célula.

A sequência de eventos que define a fase extrínseca da apoptose é melhor caracterizada pelos modelos de FasL/FasR e TNF- $\alpha$ /TNFR1. Há uma agregação de recetores aos quais se ligam os respetivos ligandos. Esta união evoca as proteínas adaptadoras FADD, para a ligação

FasL/FasR, e TRADD, para a ligação TNF- $\alpha$ /TNFR1, que apresentam domínios de morte correspondentes que se ligam aos recetores. De seguida FADD associa-se com a procaspase-8 via dimerização do domínio efetor de morte. A esta altura forma-se o complexo de sinalização indutor de morte (DISC), que permite a aproximação de duas moléculas de procaspase-8, levando à ativação auto-catalítica da procaspase 8. O DISC também pode ativar a caspase 10 que também é uma caspase iniciadora (Kischkel *et al.*, 1995; Elmore, 2007).

Dogu & Díaz (2009) referem que existe também um outro tipo de via extrínseca que apresenta baixos níveis de caspase 8 ativada. Aqui, a amplificação do sinal ocorre por clivagem da proteína Bid pela caspase 8, originando tBid, que vai ser transportada para as proximidades da membrana mitocondrial, para atuar através da ativação de Bax; o citocromo c é libertado para o citoplasma, de modo a ativar a caspase 9.

Esta via de apoptose pode ser inibida por uma proteína denominada c-FLIP que, quando se liga a FADD e à caspase 8, os torna ineficazes (Kataoka *et al.*, 1998; Scaffidi, 1999). Segundo Elmore (2007), a apoptose via recetor Fas em células T pode ser bloqueada através de uma proteína denominada Toso que inibe a caspase 8.

Técnicas de marcação de afinidade revelaram que a caspase 8 ativa as caspases 3 e 7 e que, por sua vez, a caspase 3 pode ativar a caspase 6; ambas as caspases 6 e 3 clivam proteínas envolvidas na apoptose nuclear (Peter & Krammer, 1998).

## **b) intrínseca**

Ao contrário da via extrínseca, na via intrínseca ou mitocondrial, os estímulos não dependem de recetores e os sinais produzidos são iniciados na mitocôndria e atuam diretamente nos alvos do interior da célula. Os sinais produzidos podem ser negativos, como é o caso da ausência de fatores de crescimento, hormonas ou citocquinas que podem levar a uma falha na supressão da apoptose, ou positivos, como as radiações, as toxinas, a hipoxia, a hipertermia, as infeções virais, os radicais livres, entre outros. Todos estes estímulos causam modificações a nível da membrana

mitocondrial interior, que leva à alteração da permeabilidade da membrana, causando a libertação de dois grupos principais de proteínas pró-apoptóticas para o citosol (Elmore, 2007).

O primeiro grupo abrange o Citocromo-c, Smac/DIABLO e a protease de serina HtrA2/Omi que ativam a via mitocondrial, dependente de caspases. O Citocromo-c liga-se a APAF1 e à procaspase 9, formando o apoptossoma, que irá ativar a caspase 9. A ativação da caspase 9 vai, posteriormente, ativar a caspase 3 (Peter & Krammer, 1998).

Smac/DIABLO promovem a apoptose, através da inibição das proteínas inibidoras da apoptose (IAP).

O segundo grupo abarca a proteína AIF, a endonuclease G e a CAD, que são libertadas durante a apoptose apenas quando a célula já se encontra comprometida a morrer. Todas elas são transportadas para o núcleo da célula. A AIF faz a fragmentação do ADN e a condensação da cromatina nuclear periférica (fase I da condensação), a endonuclease G faz a clivagem da cromatina para produzir fragmentos de ADN oligonucleossómicos e a CAD, depois de clivada pela caspase 3, leva a fragmentação de ADN oligonucleossómica e a uma condensação da cromatina mais pronunciada e avançada (fase II da condensação).

O controlo e a regulação destes eventos apoptóticos mitocondriais ocorrem através de membros da família de proteínas Bcl-2 que fazem a regulação da permeabilidade da membrana mitocondrial e podem ser pró-apoptóticos, como Bcl-10, Bax, Bak, Bid, Bad, Bim, Bik e Blk, ou anti-apoptóticos, e incluem as seguintes proteínas: Bcl-2, Bcl-x, Bcl-XL, Bcl-XS, Bcl-w e BAG. São estas proteínas que determinam se a célula irá sofrer ou não apoptose, julgando-se que o seu mecanismo de ação é a regulação da libertação de Citocromo-c por alteração da permeabilidade da membrana mitocondrial (Elmore, 2007).

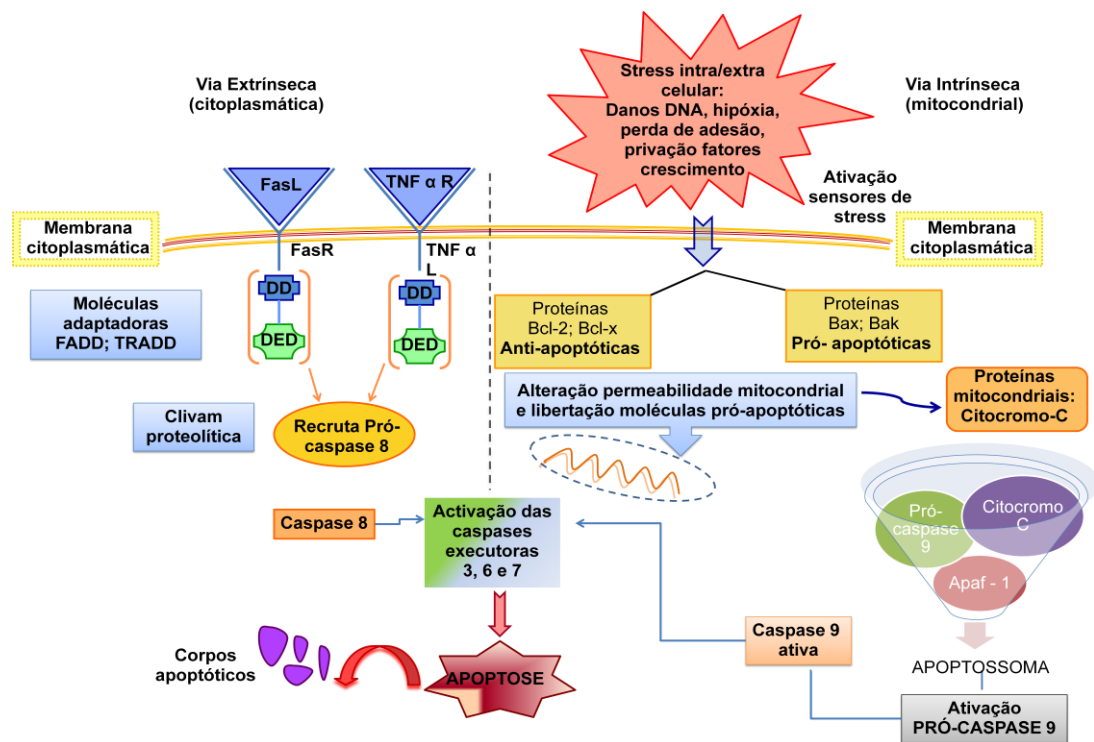
### **c) via executora**

A via extrínseca e a via intrínseca terminam quando as caspases executoras são ativadas de modo a iniciar a fase executora da apoptose, considerada a fase final da apoptose (Elmore, 2007). As caspases

executoras (caspases 3, 6 e 7) entram em ação, ativando endonucleases citoplasmáticas e proteinases para fracionar o material genético, as proteínas nucleares e as proteínas do citoesqueleto.

A caspase 3 é considerada a caspase executora mais importante e pode ser ativada por qualquer uma das caspase iniciadoras (caspase 8 – via extrínseca, 9 – via intrínseca ou 10). Esta caspase ativa a endonuclease CAD, através da clivagem da sua inibidora – ICAD, que irá posteriormente degradar o ADN cromossómico e causar a condensação da cromatina no núcleo. A caspase 3 também induz a reorganização do citoesqueleto e a desintegração da célula em corpos apoptóticos (Elmore, 2007).

Para finalizar esta fase, os corpos apoptóticos serão fagocitados por macrófagos. A assimetria fosfolipídica e a exteriorização da fosfatidilserina, na superfície das células apoptóticas, e os seus fragmentos são a “imagem de marca” desta fase (Elmore, 2007). A fosfatidilserina ajuda ao reconhecimento fagocítico, permitindo que a célula seja removida numa fase inicial (Fadok *et al.*, 2001), sem provocar uma reação inflamatória. Estes processos encontram-se resumidos na Figura 1.



**Figura 1.** Esquema das vias de sinalização da apoptose.



### 2.1.5. APOPTOSE NA FISILOGIA

O papel da apoptose nas funções fisiológicas é tão significativo como a mitose (Elmore, 2007). Ambos os fenômenos se complementam, criando um equilíbrio no organismo que permite a regulação e o desenvolvimento dos vários sistemas. Muitas proteínas desempenham um papel tanto no ciclo celular como na apoptose. Caso a célula sofra danos no ADN, a extensão dos mesmos e o nível dessas proteínas determinam se a célula progride para apoptose ou morte celular (Dogu & Díaz, 2009).

O corpo humano adulto perde, diariamente, muitas células por apoptose. Para reestabelecer este número são produzidas 10 bilhões de novas células, um número que pode aumentar em casos de doença ou de envelhecimento (Renehan *et al.*, 2001).

A apoptose é o mecanismo que o organismo utiliza para se livrar de células que se encontram afetadas por qualquer agente patogénico e é um componente vital para a cicatrização de feridas, fazendo a remoção de células inflamatórias e desenvolvendo o tecido de granulação (Greenhalgh, 1998). A desregulação da apoptose, durante a cicatrização de feridas, pode levar à fibrose excessiva ou cicatrizes (Elmore, 2007).

### 2.1.6. APOPTOSE NAS DIFERENTES PATOLOGIAS

Clarke & Tyler (2009) fizeram uma revisão de estudos realizados em modelos animais. Nestes estudos, foi analisada a apoptose em doenças induzidas por vírus *in vivo* no sistema nervoso central, no coração e no fígado. Foram detetadas células apoptóticas nestes três componentes, seguidos de infecção por diferentes vírus. Além da apoptose ter sido correlacionada com a severidade da doença em vários modelos animais, vários estudos mostraram que houve um decréscimo na gravidade das afeções quando seguidas de tratamento com agentes anti-apoptóticos, o que mostra que este fenômeno é um mecanismo importante em doenças induzidas por vírus. Os autores sugerem que a apoptose e as vias de sinalização apoptóticas podem proporcionar novos alvos para tratamento

destas patologias humanas. Contudo, também relembram que os vírus apresentam diferentes estratégias quer para beneficiar quer para evitar a apoptose, sendo por isso, necessário definir o papel exato deste mecanismo na patogénese de cada infeção viral individualmente, visto que alguns, ao inibir a apoptose, podem agravar a patologia.

Num estudo do tecido laminar de equinos, Laskoski (2009) estudou a imunoexpressão da apoptose utilizando os anticorpos anti-caspase 3 e anti-caspase 14. Para o primeiro, a marcação foi positiva no núcleo das células basais presentes na lâmina epidérmica secundária, tendo no entanto havido grande variabilidade na marcação. O segundo não apresentou imunomarcação no tecido laminar. O facto da caspase 3 apresentar grande variabilidade de imunomarcação mostra que, durante a fase inicial da lesão laminar, não ocorre ativação excessiva das caspases, o que sugere que a apoptose não está envolvida nas lesões laminares nas fases iniciais de desenvolvimento da doença.

Ferrington *et al.* (2006) estudaram a suscetibilidade do epitélio pigmentado da retina a duas vias apoptóticas (uma dependente de caspases e outra independente de caspases) quando submetidas a diferentes estímulos. Os resultados mostraram que esses estímulos suscitam a apoptose em culturas de epitélio pigmentado da retina, por ambas as vias. Por este mecanismo ser tão importante em várias patologias que causam cegueira, os autores sugerem que é necessário definir, com precisão, as vias envolvidas no processo patológico.

A apoptose nas células tubulares renais é um mecanismo importante na patogénese da insuficiência renal aguda. Para testar o papel que a proteína survivina possui na proteção da apoptose, Kindt *et al.* (2008) utilizaram ratos transgénicos com baixos níveis de survivina e conseguiram mostrar que esta proteína é necessária para proteger o rim da apoptose ao suprimir a expressão de p53 e melhorar a disfunção renal. Deste estudo conseguiu-se concluir que a survivina interfere na deterioração da função renal e preserva a integridade dos rins e das células tubulares renais ao inibir o processo apoptótico.

Mucci *et al.* (2002) investigaram a depleção de timócitos em infeções causadas por *Trypanosoma cruzi*, o qual produz uma enzima

denominada trans-sialidase (TS). A administração em ratos desta enzima recombinada induziu a redução da celularidade por meio da apoptose. Contudo, a administração de um neutralizador de TS evitou alterações no timo. Desta investigação concluiu-se que o TS é o fator de virulência de *Trypanosoma cruzi* responsável por alterações tímicas através da indução da apoptose, podendo ser revertido através da administração de um neutralizador.

Para testar os efeitos de bactérias em oócitos Pelzer *et al.* (2013) examinaram ADN no interior de oócitos de ratos após 12 horas de incubação com fluidos foliculares humanos colhidos de mulheres submetidas a fertilização *in vitro*. Cada amostra de fluido folicular foi posta em cultura para detetar a presença de bactérias. A técnica TUNEL foi usada para deteção de ADN fragmentado nos oócitos. Foram detetadas bactérias como *Streptococcus anginosus*, *Peptoniphilus spp.*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus gasseri*, *Enterococcus faecalis* e *Propionibacterium acnes*, porém não houve fragmentação de ADN em oócitos de ratos incubados com fluido folicular humanos contendo *Lactobacillus gasseri* e *Enterococcus faecalis*. Uma baixa taxa de fertilização em oócitos humanos foi associada a uma fragmentação extensiva em oócitos de ratos. Do estudo pode-se comprovar que a colonização de bactérias em fluido folicular humano *in vivo* pode causar fragmentação após 12 horas de incubação *in vitro*, levando a concluir que a presença de bactérias no fluido folicular pode resultar em oócitos de fraca qualidade e/ou embriões, conduzindo a fracos resultados de fertilização *in vitro*.

Piro *et al.* (2000) investigaram e quantificaram a presença de apoptose nos estádios iniciais de isquemia miocárdica em humanos. Para tal testaram os tecidos com TUNEL, Bax, Bcl-2, cyp32, FAS e FAS-L. Enquanto TUNEL foi positivo em 87,5% dos casos, os restantes anticorpos deram resultado negativo. Os autores demonstraram que a apoptose precede a necrose em humanos mas a deteção deste fenómeno não pode ser utilizada como uma ferramenta de diagnóstico visto que pode ser ativado por eventos não isquémicos

## 2.2. MASTOCITOMA

O mastocitoma é uma neoplasia descrita em todas as espécies mas, pela sua frequência e gravidade, assume maior importância no cão, onde a sua incidência está descrita como sendo de 16% a 21% de todos os tumores cutâneos e de 11% a 27% (Navega, 2011) de todos os tumores malignos de pele. Caracteriza-se por se apresentar como uma lesão única ou múltiplas, sendo estas compostas por mastócitos em quantidades anormais. Há ocorrência de mastocitomas múltiplos em 9% a 22% dos cães com mastocitomas. A Organização Mundial de Saúde (OMS) coloca a ocorrência de mastocitomas múltiplos na tabela de classificação histológica, como sendo de um estado avançado, denominado estado III (Jubb *et al.*, 1993; Withrow & Vail, 2007; Mackowiak *et al.* 2012).

Porém, é necessário ter em conta que existem acumulações de mastócitos em síndromes parasitárias, micóticas, alérgicas, inflamatórias ou idiopáticas e efetuar o diagnóstico diferencial com mastocitoma.

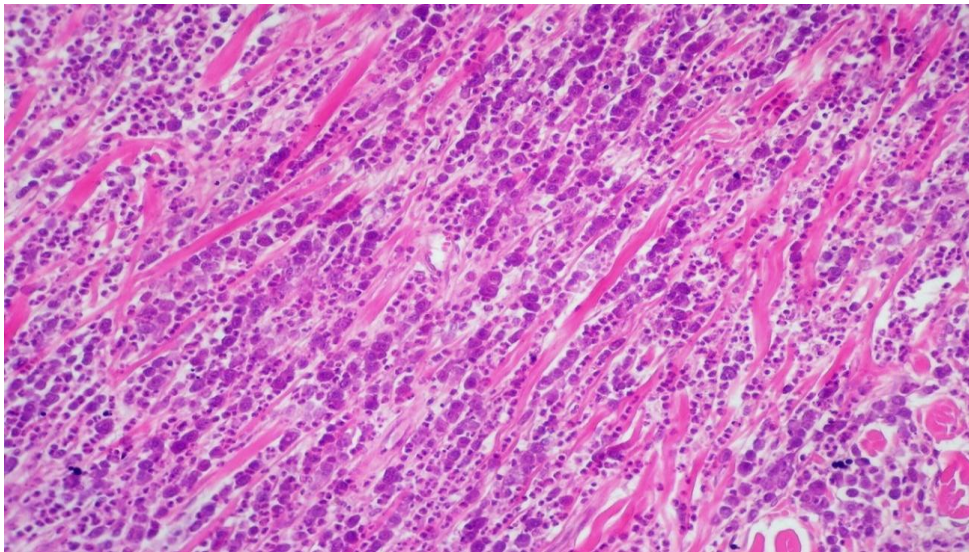
O mastocitoma é mais comum em cães mais velhos, com média de 8 a 9 anos de idade, dependendo dos autores. Apesar deste facto, Withrow & Vail (2007) afirmam que o mastocitoma pode ocorrer em cães entre as 3 semanas e os 19 anos de idade. Já quanto ao género, existe maior consenso entre os autores que afirmam que não existe predisposição sexual. O Boxer é uma das raças que maior prevalência de mastocitoma apresenta, entre muitas outras, que se encontram discriminadas no Quadro 2.

**Quadro 2. Raças mais predisponentes para o mastocitoma**

Boxer	Bull Terrier	Golden Retriever
Boston Terrier	Bullmastiff	Pug
Labrador Retriever	Sttafordshire Terrier	Shar Pei
Beagle	English Bulldog	Leão da Rodésia
Schnauzer	Dashunds	Weimaraner

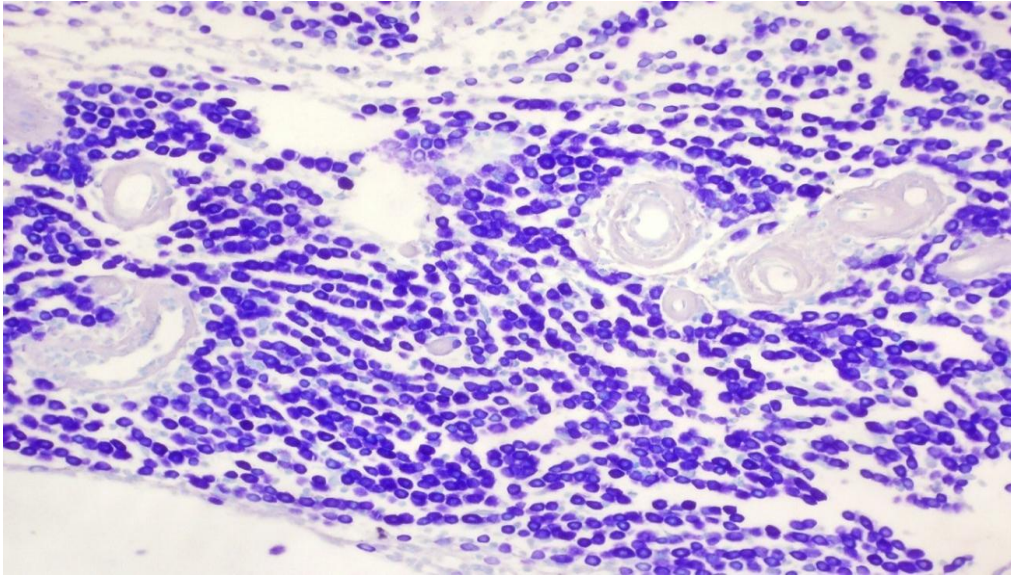
Os mastocitomas cutâneos têm origem nas células mastocitárias que se encontram na derme e no tecido subcutâneo. Os mastócitos possuem grânulos de histamina e heparina no seu citoplasma, os quais crescem à medida que a célula madura. A técnica azul de toluidina permite visualizar grânulos citoplasmáticos metacromáticos em mastócitos (Culling *et al.*, 1985).

Os mastocitomas apresentam-se como massas da derme e/ou subcutâneas, nodulares, não capsuladas, com textura semelhante a borracha e com cerca de 3 cm de diâmetro. Couto (2011) refere-se ao mastocitoma como uma entidade capaz de imitar qualquer lesão dérmica primária ou secundária, incluindo mácula, pápula, nódulo, tumor e crosta. Estas massas são compostas por células redondas com núcleos redondos e centrais, citoplasma abundante, granular e basofílico e membrana celular indistinta, que se encontram disseminadas ou dispostas em aglomerados de células, como se pode observar nas Figuras 2 e 3.



**Figura 2.** Mastocitoma de grau I, retirado do membro posterior de um Serra da Estrela fêmea de 8 anos (Foto gentilmente cedida pelo Laboratório de Anatomia Patológica da ESAV).





**Figura 3.** Mastocitoma de grau I, retirado do membro posterior de um Basset Hound macho de 11 anos (Foto gentilmente cedida pelo Laboratório de Anatomia Patológica da ESAV).

Raramente se deslocam para a junção derme-epiderme e não se vêem agregados de mastócitos na intraepiderme. A epiderme apresenta-se intacta quando ocorrem pequenas lesões mas quando as lesões são grandes, frequentemente apresenta-se ulcerada. A derme e o tecido subcutâneo podem apresentar edema severo que lembra inflamação (Jubb *et al.*, 1993). Apesar do mastocitoma poder ocorrer em qualquer parte do corpo, como na zona prepucial. Este é mais comumente observado na derme e no tecido subcutâneo de locais como o tronco (50% a 60%), extremidades (40%) e cabeça (10%). A cabeça e o pescoço são locais incomuns e existem casos, também menos frequentes, de mastocitomas em locais como a conjuntiva, glândulas salivares, nasofaringe, laringe, cavidade oral, trato gastrointestinal, ureter e coluna (Scott *et al.* 2001).

Uma forma subcutânea de mastocitoma, que se apresenta macio e carnudo à palpação, é frequentemente mal diagnosticado como lipoma (Withrow & Vail, 2007). De facto, aproximadamente 10% a 15% de todos os mastocitomas caninos são indistinguíveis de um lipoma subcutâneo comum (Couto, 2011). No mastocitoma é possível observar-se também focos de necrose tumoral, de necrose vascular, de mineralização e de granuloma de colagénio induzido. A presença de eosinófilos nestas neoplasias é comum,

podendo o número ser variável de poucos a numerosos, e tanto se podem encontrar dispersos pelo tecido, como em agregados.

### 2.2.1. ETIOLOGIA

A etiologia do mastocitoma é, em grande parte, desconhecida, porém pensa-se que este tumor seja de origem multifatorial. No passado, esta origem foi atribuída às inflamações crônicas ou à aplicação de irritantes da pele (Withrow & Vail, 2007; Mackowiak *et al.* 2012).

Scott *et al.* (2001) sugerem que este tumor pode ter uma causa viral, porém, só foram encontradas partículas virais ocasionalmente, em exames ultra estruturais. Pesquisas feitas mostraram que não existem partículas virais (como o C-type) nem evidências de transmissão horizontal, porém Scott *et al.* (2001) refere um estudo que revelou um fenômeno também descrito como comum em humanos, a fragilidade dos loci cromossômicos, em Boxers com mastocitomas, o que se julga predispor, geneticamente, para o desenvolvimento de certos tumores. Este fenômeno encontrava-se aumentado nestes animais, contudo, Withrow & Vail (2007) afirmam que nessa experiência, incluiu-se, como controlo, Boxers sem tumores e jovens, julgando-se, posteriormente, que a diferença de idade pode ter sido responsável pelo aumento da fragilidade dos loci cromossômicos.

A respeito da etiologia genética deste tumor pouco mais se sabe, apesar de algumas alterações genéticas terem sido detetadas na via supressora de tumor p53. Nos humanos existem também mutações neste gene associadas ao mastocitoma, cuja proteína codificada funciona como um regulador negativo para a proliferação celular, e a sua deteção, por métodos imunohistoquímicos, relaciona-se com o comportamento agressivo de algumas neoplasias (Gross *et al.*, 2005). Porém, o mesmo não acontece com os cães, pois nestes a deteção da proteína não tem sido útil para caracterizar a associação clínica entre as características citológicas e o tempo de vida ou ocorrência de recidivas (Streffezi, 2007). Alterações nas proteínas p21 e p27 foram também identificadas em mastocitomas (Withrow & Vail, 2007). Mais recentemente, descobriu-se uma ligação ao

SCF (stem cell factor), visto que ocorre expressão do c-kit, recetor tirosina quinase para o crescimento hematopoiético do SCF. Além de ajudar no crescimento de mastócitos normais, o SCF também se mostrou capaz de induzir a secreção de grânulos mastocitários, *in vivo* e *in vitro* (Withrow & Vail, 2007). Segundo este autor, há estudos que demonstram a presença de mutações na região da justamembrana do c-kit em 13% a 50% dos mastocitomas, sendo estes responsáveis pela ativação constitutiva na ausência de ligação a SCF; este fenómeno parece ser mais comum em mastocitomas de médio e alto grau, com comportamento biológico mais agressivo e pode estar associado a um mau prognóstico.

Os Boxers e Boston Terriers possuem oncogenes que são transmitidos à descendência, os quais combinados com uma vigilância imunodeficiente, geneticamente determinada, resultam numa maior incidência do mastocitoma nestas raças (Scott *et al.*, 2001).

Tal como nos humanos, os mastocitomas em cães foram associados a mutações do proto-oncogene c-kit, caracterizado por duplicações em “tandem”, o que leva à ativação constante do recetor tirosina quinase e subsequente proliferação mastocitária (Gross *et al.*, 2005).

### 2.2.2. PATOGÉNESE

Os animais que apresentam mastocitoma podem ter complicações relacionadas com a libertação de constituintes bioativos dos grânulos mastocitários, como a histamina e a heparina, cuja libertação está associado à palpação do tumor. Este fenómeno designa-se por “Darier’s sign” que resulta em edema local e inflamação, o qual, por sua vez, pode estar associado à rara ocorrência de rubor. Logo após exercício físico ou exposição ao frio, pode ocorrer tumefação dispersa (edema e inflamação em redor do tumor primário ou lesão metastática), eritema ou contusões da área afetada de uma forma aguda (Scott *et al.*, 2001; Withrow & Vail, 2007; Couto, 2011).

Podem ocorrer ulcerações gastrointestinais (observadas em 35% a 83% de necrópsias), das quais uma pequena percentagem pode levar a



perfuração. Pensa-se que a histamina libertada atua nas células parietais, via recetores H<sub>2</sub>, estimulando-os, resultando num aumento da secreção de ácido clorídrico e talvez isquemia local da mucosa. Este processo pode levar à ulceração e, por sua vez, originar hemorragias severas que podem chegar a ser fatais. Porém, raramente acontece shock hipotensivo devido a desgranulação massiva. Como a concentração da histamina se encontra aumentada em casos de mastocitoma, a monitorização deste parâmetro pode ser útil na monitorização da evolução da doença. Os cães com mastocitoma também apresentam baixa concentração de gastrina, que é normalmente libertada pelas células G do antro pilórico em resposta a uma concentração elevada de ácido clorídrico gástrico, atuando como um feedback negativo. Assim, pensa-se que esta será a causa da ulceração gástrica: aumento de ácido clorídrico em combinação com dano vascular. É assim aconselhável que todos os animais com mastocitoma sejam avaliados para pesquisa de sangue oculto nas fezes. Durante a excisão cirúrgica de um mastocitoma pode ocorrer desgranulação e consequente libertação de histamina, o que pode levar a uma situação de hipotensão, a qual pode pôr em risco a vida do animal. Devido à libertação de heparina dos grânulos dos mastócitos podem observar-se problemas de coagulação em cães com mastocitoma. Nestes casos também podem ocorrer complicações sérias durante a cirurgia, caso haja hemorragias localizadas, causadas por desgranulação, resultantes da manipulação do tumor; podem ocorrer complicações sérias, mesmo que os parâmetros de coagulação estejam normais antes da cirurgia (Withrow & Vail, 2007; Couto, 2011).

Poderá também ocorrer atraso na cicatrização do local de onde foi retirado o mastocitoma, devido aos efeitos locais das enzimas proteolíticas e aminas vasoativas libertadas pelo tumor. Estudos feitos em ratos sugerem que a histamina libertada do tumor liga-se aos recetores H<sub>1</sub> e H<sub>2</sub> nos macrófagos, resultando na libertação de um factor supressor fibroblástico que diminui a fibroplastia normal e atrasa a cicatrização (Withrow & Vail, 2007).

O comportamento biológico do mastocitoma é imprevisível. Por exemplo, os mastocitomas bem diferenciados são geralmente solitários e apresentam um potencial metastático e de disseminação baixos. Porém,

existem casos de vários mastocitomas que se encontram distribuídos pelo animal, apesar de, na sua avaliação histopatológica, serem considerados bem diferenciados (Couto, 2011).

Os mastocitomas são sempre considerados malignos mas o seu verdadeiro potencial metastático não é inteiramente conhecido (Vascellari *et al.*, 2012)

Podem ocorrer metástases, especialmente em tumores de grau III (indiferenciados), em primeiro lugar nos linfonodos regionais mais próximos. Contudo, podem ocorrer tumores que escapam à drenagem desses primeiros linfonodos e disseminam-se até aos restantes. Existem locais nos quais os tumores são mais agressivos e com maior potencial metastático, como a parte distal dos membros, as regiões perineal e inguinal, e os tumores extracutâneos (como na orofaringe e na região intranasal), quando comparado com outras regiões como, por exemplo o tronco ou o pescoço (Couto, 2011).

O mastocitoma pode tornar-se numa doença sistémica que usualmente ocorre em cães com história de excisão tumoral e se assemelha às malignidades hematopoiéticas, como o linfoma ou a leucemia.

Os mastócitos são atraídos para o local do tumor através da libertação de citocinas inflamatórias, podendo promover o seu crescimento, não só pelo número de células como também pelo fomento da angiogénese, resultando num prognóstico desfavorável (Theoharides & Conti, 2004; Maltby *et al.*, 2009, Mackowiak *et al.*, 2012).

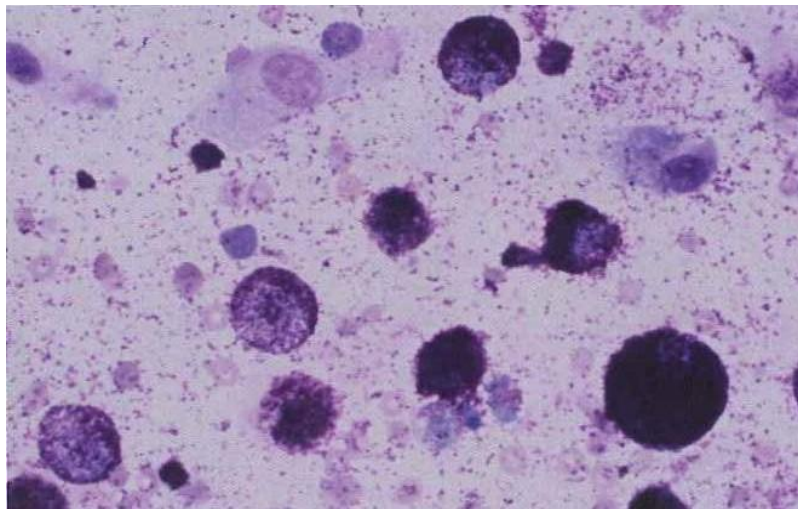
### 2.2.3. DIAGNÓSTICO

Os mastocitomas raramente apresentam uma aparência típica, pelo que muitas vezes o fenómeno Darier's sign, referido anteriormente, é uma ajuda para o estabelecimento do diagnóstico (Couto, 2011).

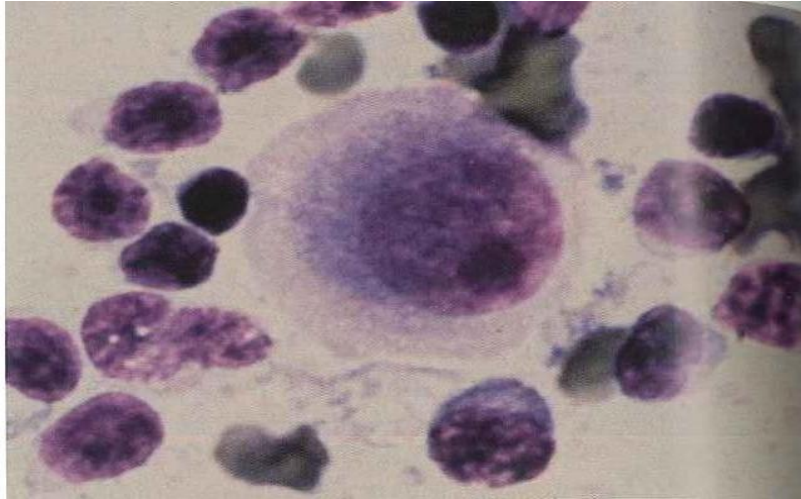
Quando os mastócitos estão presentes num grande número e, essencialmente, como uma população pura, é feito o diagnóstico de tumor mastocitário (mastocitoma). Alguns clínicos mais cuidadosos consideram este crescimento como mastocitose cutânea (neoplasia cutânea benigna),

até que a sua natureza neoplásica seja confirmada por crescimento invasivo ou evidência morfológica de anaplasia (Jubb *et al.*, 1993).

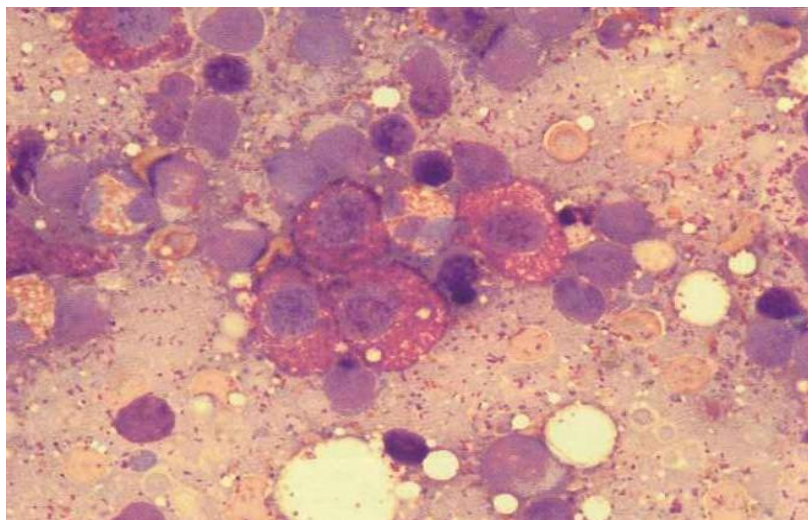
O diagnóstico do mastocitoma é feito através da citologia de uma amostra retirada, através do método de FNA (fine needle aspiration), como são exemplos as Figuras 4, 5 e 6. Após a recolha, a amostra pode ser corada pelo método de Romanowsky ou colorações hematológicas rápidas. Ao microscópio, podem observar-se células redondas de tamanho médio com grânulos citoplasmáticos abundantes, pequenos e uniformes que coram de vermelho arroxeadado. Nem todos os grânulos coram de imediato, por isso deve ser feita uma coloração com Wright-Giemsa que ajuda na revelação dos mesmos. Também é frequente a visualização de eosinófilos no esfregaço. Esta aspiração, apesar de ser conveniente para o diagnóstico, não é suficiente para determinar o grau histológico do tumor (Withrow & Vail, 2007).



**Figura 4.** FNA de um mastocitoma, com numerosos grânulos. Coloração de Wright, objetiva 1000x (adaptado de Withrow & Vail, 2007).



**Figura 5.** FNA de um linfonodo de um canídeo com mastocitoma metastásico, sem grânulos no interior da célula tumoral. Coloração Diff-Quik, objetiva 1000x (adaptado de Withrow & Vail, 2007).



**Figura 6.** Aspirado de um linfonodo de um canídeo com mastocitoma cutâneo, com agregados de mastócitos (adaptado de Withrow & Vail, 2007).

Os mastocitomas cutâneos têm uma variedade enorme de apresentações clínicas e, apesar da maioria destes tumores serem solitários, uma pequena percentagem (11% a 14%, segundo Withrow & Vail, 2007, e 10% a 15% segundo Gross *et al.*, 2005) dos animais apresenta múltiplas lesões multicêntricas. A aparência dos tumores está relacionada com o seu grau de diferenciação histológica; por exemplo, tumores bem diferenciados tendem a ser solitários, com 1 a 4 cm de

diâmetro, de crescimento lento, apresentam consistência do tipo borracha ao toque, estão presentes pelo menos por 6 meses, não são ulcerados, mas perdem o pelo adjacente; os tumores indiferenciados tendem a ter crescimento rápido, com lesões ulcerativas que causam irritação e atingem um tamanho grande. Os tecidos envolventes podem tornar-se inflamados e edematosos e pequenos nódulos podem desenvolver-se nesses tecidos. Os tumores de diferenciação intermédia apresentam-se macios e carnudos à palpação, confundindo-se muitas vezes com lipoma. O mastocitoma apresenta-se alopecico, eritematoso, com nódulos edematosos que variam de milímetros a centímetros (Withrow & Vail, 2007).

A classificação de Patnaik *et al* (1984) é bastante utilizada para a classificação do mastocitoma, relacionando o grau histológico e o comportamento biológico. Esta classificação tem em conta as características citológicas do tumor, depende da morfologia celular, do índice mitótico, da celularidade, do grau de granularidade e grau de anisocitose e classifica os mastocitomas bem diferenciados como grau I, os de diferenciação intermédia como grau II e os indiferenciados como grau III, relacionando cada um deles com um determinado tempo de sobrevivência (Patnaik *et al.*, 1984; Mackowiak *et al*, 2012). No Quadro 3 encontra-se um resumo destas características.

Num estudo recente Kiupel *et al.* (2011) conceberam um novo método de classificação que divide os mastocitomas em 2 graus: baixo grau e alto grau. Os autores deduziram, com este estudo, que o sistema de 2 graus elimina a ambiguidade da classificação intermediária (grau II), permitindo aos patologistas identificar mastocitomas biologicamente agressivos com maior consistência, constituindo uma ajuda mais fiável para predizer o tempo de sobrevivência do que o sistema de Patnaik. Assim, o sistema de 2 graus deve ser utilizado como uma ferramenta inicial aquando do exame histológico de rotina e diagnóstico de uma mastocitoma cutâneo (Kiupel *et al*, 2011; Mackowiak *et al.*, 2012; Takeuchi *et al.*, 2013).

**Quadro 3. Classificação histológica do mastocitoma segundo Patnaik**

GRAU		GRAU I (BEM DIFERENCIADO)	GRAU II (INTERMÉDIO)	GRAU III (INDIFERENCIADO)
<b>DESCRIÇÃO MICROSCÓPICA</b>	<b>Celularidade</b>	Pouco celular	Moderada a altamente celular	Muito celular
	<b>Padrão organizacional</b>	Fileiras ou agrupamentos	Aglomerados	Aglomerados
	<b>Aspetto celular</b>	Mastócitos monomórficos e bem diferenciado	Mastócitos moderadamente pleomórficos	Mastócitos pleomórficos
	<b>Aspetto nuclear</b>	Núcleo redondo	Núcleos de aspeto variável de redondo a recortado	Núcleo de tamanho e forma irregular 1 a vários nucléolos proeminentes
	<b>Granulação</b>	Muitos grânulos citoplasmáticos volumosos e visíveis	Citoplasma finamente granular	Poucos grânulos citoplasmáticos
	<b>Localização</b>	Derme	Derme, tecido subcutâneo e, ocasionalmente, aos tecidos mais profundos	Estendem-se até ao tecido subcutâneo e tecidos subjacentes, substituindo-os
	<b>Mitoses</b>	Figuras mitóticas raras	0 a 2 figuras mitóticas por campo de grande ampliação	3 a 6 figuras mitóticas por campo de alta potência
	<b>Outros</b>	Reação de necrose mínima no estroma	Algumas áreas apresentam edema, necrose e colagénio hialinizado	Apresenta áreas de hemorragia, edema, necrose e colagénio hialinizado
<b>METASTIZAÇÃO</b>	Fraco potencial (sobretudo se solitário)	Elevado potencial metastático	Elevado potencial metastático	
<b>SOBREVIDA</b>	90% sobrevivem por 3 anos	55% sobrevivem por 3 anos	10-15% sobrevivem por 3 anos	
<b>MALIGNIDADE</b>	Baixo grau	Grau moderado	Elevado grau	

#### 2.2.4. PROGNÓSTICO

Os fatores de prognóstico deste tumor ajudam a prever o comportamento biológico do mesmo. Estes ajudam também na realização de um diagnóstico mais correto, no sentido em que o conhecimento do grau de desenvolvimento do tumor permite decidir qual o melhor tratamento a realizar, sendo este o fator de prognóstico mais consistente (Mackowiak *et al*, 2012).

O local do tumor é também um fator de prognóstico descrito. Por exemplo, os tumores na região prepucial/área inguinal, região subungueal e outros locais mucocutâneos, incluindo cavidade oral e períneo, estão associados a um comportamento mais agressivo (Withrow & Vail, 2007). Porém, estudos mais recentes concluíram que não existe nenhuma diferença entre os tumores que se encontram nestes locais ou em locais cutâneos (Cahalane *et al.*, 2004; Sfiligoi *et al.*, 2005).

O grau clínico é outro fator de prognóstico descrito. Contudo existem estudos que sugerem que não há nenhuma diferença de resultado entre pacientes com um único tumor e pacientes com múltiplos tumores cutâneos. A proliferação celular descontrolada tem um papel importante no desenvolvimento deste tumor, visto que um crescimento rápido é sinal de um mau prognóstico e um crescimento lento (mais de 26 semanas) é sinal de bom prognóstico. Os cães que apresentam um mastocitoma de alto grau têm um tempo de sobrevivência de 18 semanas após o diagnóstico, enquanto que os que apresentam mastocitomas de grau intermédio e baixo grau têm um tempo de sobrevivência de 28 e 51 semanas, respetivamente. Na presença de um mastocitoma de grau intermédio, o prognóstico torna-se mais difícil dada a instabilidade deste grau, visto que estes mastocitomas tanto podem ter um comportamento benigno ou um comportamento de crescimento agressivo, recorrer e metastizar (Scott *et al.*, 2001; Gross *et al.*, 2005; Giantin *et al.*, 2012; Vascellari *et al.*, 2012).

O índice mitótico é também um fator de prognóstico. Os mastocitomas mais indiferenciados apresentam um maior número de mitoses. Dependendo do número de mitoses, é possível fazer a distinção entre os diferentes graus histológicos e, como já foi descrito, quanto mais indiferenciado for o mastocitoma, pior será o seu prognóstico (Couto, 2011).

Nenhum destes fatores, consegue, isoladamente, predizer com rigor o comportamento biológico ou a resposta ao tratamento em cães com mastocitoma; além disso, os fatores clínicos, incluindo tamanho do tumor, raça, sexo e estado clínico, podem influenciar o resultado (Vascellari *et al.*, 2012).

Quando o animal apresenta sinais sistêmicos como anorexia, vômito, melena, eritema generalizado e edema, associado a substâncias vasoativas derivadas da desgranulação dos mastócitos (sinais associados às formas viscerais de tumores mastocitários), o prognóstico é mais reservado. Um mau prognóstico foi também associado a ulceração local do tumor, eritema e prurido; por outro lado, o reaparecimento do tumor, após excisão cirúrgica, foi também associado a um prognóstico reservado. Considerando tudo isto, conclui-se que uma terapia apropriada e agressiva, o mais rápido possível, é a melhor abordagem, pois melhora o prognóstico dos pacientes (Scott *et al.*, 2001).

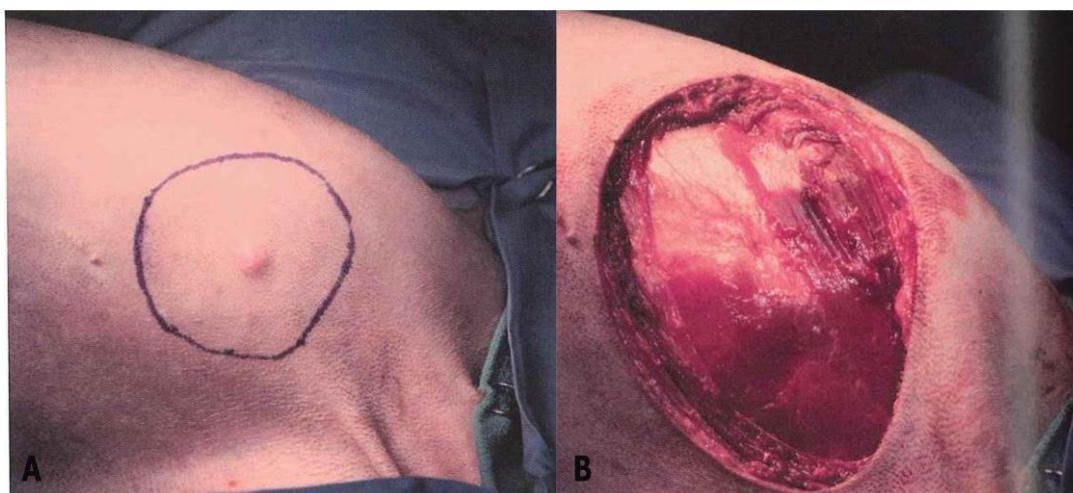
#### 2.2.5. TRATAMENTO

O tratamento do mastocitoma depende dos fatores de prognóstico e da fase clínica da doença. Os tratamentos de eleição para este tumor são a excisão cirúrgica e a radioterapia (Scott *et al.*, 2001).

Antes de realizar qualquer terapia deve ter-se em conta o local, a acessibilidade, o grau e as margens do tumor. Para tal, devem realizar-se exames como o RX, palpação, ecografia e tomografia computadorizada.

Idealmente, se os fatores de prognóstico forem favoráveis a tal, deve efetuar-se a excisão cirúrgica com margens alargadas (3 cm de tecido envolvente) e em profundidade, podendo ser necessária remoção de músculo (Figura 7). Posteriormente, os tecidos recolhidos durante a cirurgia devem ser analisados através de exame de diagnóstico histopatológico, para determinar o grau do tumor. Caso as margens se encontrem incompletas deverá optar-se por uma nova excisão de margens maiores (se for possível), ou radioterapia auxiliar. A quimioterapia também pode ser utilizada num curto período - 3 a 6 meses (Withrow & Vail, 2007; Strefezzi, 2007; Oliveira, 2008).





**Figura 7.** Remoção cirúrgica de um mastocitoma. **A,** Margens cirúrgicas planejadas. **B,** Após a excisão com margens alargadas e plano fascial profundo para alcançar a remoção completa (adaptado de Withrow & Vail, 2007).

Antes da cirurgia pode realizar-se um tratamento com glucocorticoides intralesionais ou sistêmicos, ou ambos, que poderão diminuir o volume do tumor, a tumefação e a inflamação local, ajudando à excisão mais adequada, o que também pode ser conseguido por radioterapia pré-cirúrgica e água desionizada intralesional. A redução pré-cirúrgica do tumor aumenta a probabilidade de obter margens completamente livres do mesmo (Scott *et al.*, 2001; Teng *et al.*, 2012).

Quando a excisão cirúrgica não é possível porque o tumor se encontra em locais de difícil acesso deve optar-se por um tratamento com radioterapia (Scott *et al.*, 2001; Withrow & Vail, 2007; Strefezzi, 2007; Oliveira, 2008).

Se o mastocitoma se encontrar na parte distal de uma extremidade pode realizar-se amputação, terapia de feixe externo ou uma combinação de cirurgia com radioterapia (Withrow & Vail, 2007).

Apesar de não terem sido completamente investigadas e não apresentarem um sucesso tão grande como a cirurgia e radioterapia, existem outras terapias locais alternativas como:

- braquiterapia intralesional,
- terapia fotodinâmica,
- corticosteroides intralesionais,
- crioterapia,

- água desionizada intralesional (Scott *et al.*, 2001; Strefezzi, 2007; Oliveira, 2008).

Nos casos de mastocitomas indiferenciados com metástases o tratamento cirúrgico não é suficiente e deve ser combinado com um tratamento sistêmico com corticosteroides (prednisona) e outros glucocorticoides, para diminuir a proliferação celular e induzir a apoptose. Em casos de tumores metastáticos, a terapia de eleição é a quimioterapia com terapia de suporte. Existem 2 protocolos de quimioterapia bastante utilizados que incluem a utilização de prednisona ou o CVP (ciclofosfamida, vinblastina e prednisona). Também se pode utilizar a lomustina que pode ser combinada com algumas das anteriores (Withrow & Vail, 2007).

Nos casos em que ocorre desgranulação também deve ser realizada uma terapia auxiliar para inibir a liberação de histamina: difenidramina, para recetores H1, e cimetidina ou ranitidina, para recetores H2 (Scott *et al.*, 2001; Strefezzi, 2007; Oliveira, 2008).

Concluindo a terapia definitiva, o animal deve ser reavaliado após um mês, depois a cada três meses, durante um ano e meio e, por último, a cada 6 meses. Estas reavaliações devem incluir um exame físico completo, uma avaliação do local do tumor e aspiração de novas massas cutâneas (Withrow & Vail, 2007).

### 2.3. APOPTOSE VS ONCOLOGIA

O excesso ou a escassez de apoptose podem levar a um desequilíbrio do organismo, podendo ser a origem de várias patologias, como é o caso do cancro que pode resultar tanto do aumento como da diminuição dos índices apoptóticos. Quando o estímulo que produz este desequilíbrio é removido, o processo que levou à criação de células cancerígenas é irreversível, ao contrário do que acontece no processo de hiperplasia, que é reversível (Elmore, 2007; Foster, 2008; Dogu & Díaz, 2009).

A célula cancerígena pode ser considerada como um estado dinâmico patológico de um sistema complexo de uma célula normal que surge devido a uma anomalia de um conjunto específico de proteínas que perdem o seu papel na homeostasia celular, incluindo a apoptose, levando a um funcionamento defeituoso de regulação do ciclo celular, permitindo a proliferação descontrolada e sobrevivência das células, possibilitando a acumulação de mutações (Foster, 2008; Dogu & Díaz, 2009). As mutações em genes supressores tumorais permitem que as células danificadas progridam pelo ciclo celular, dando origem ao desenvolvimento de novas células cancerígenas que acumulam essas mutações. Nesta situação, mudanças nos parâmetros do sistema dinâmico podem induzir um estado patológico muito resistente e difícil de reverter. As células que estão predispostas a lesões genéticas podem levar a malignidade, nas primeiras etapas da carcinogénese (Dogu & Díaz, 2009).

Os genes que participam na oncogénese controlam normalmente o ciclo celular, incluindo a reparação do ADN e a adesão celular mas quando sofrem alterações conduzem ao processo neoplásico. Essas alterações incluem a mutação de um gene supressor tumoral ou uma mutação num proto-oncogene que se converte, assim, num oncogene. O ciclo celular tem mecanismos de controlo de crescimento e desenvolvimento da célula. Mutações nestes mecanismos são evidentes em todos os tipos de cancro (Dogu & Díaz, 2009).

A supressão da apoptose, a reparação do ADN e a supressão tumoral da paragem de crescimento, durante a carcinogénese, têm um

papel central no desenvolvimento e progressão de potenciais tumores. Certos autores reforçam esta ideia ao declarar que as células tumorais têm mecanismos moleculares capazes de cessar a apoptose (Elmore *et al*, 2007).

Aqui voltam a entrar as proteínas pro e anti-apoptóticas da família Bcl-2. Estas proteínas entram em ação na presença de tumores e são estas que irão influenciar o seu desenvolvimento. A expressão destas duas proteínas é regulada pelo gene supressor tumoral p53, o qual pode ativar proteínas reparadoras e parar o ciclo da célula na fase G1/S, caso haja dano no ADN, bem como iniciar a apoptose, caso o dano celular seja irreparável (Elmore, 2007). Foster (2008) sugere que as células têm a capacidade de reconhecer se o dano que lhes foi infringido foi demasiado profundo para ser completamente reparado, desencadeando a apoptose, dependente de p53. Este gene tem um papel importante na proteção do genoma contra a proliferação das células mutadas. Contudo, quando o p53 não desempenha a sua função, as células danificadas irão continuar em mitose, acumulando mutações (Dogu & Díaz, 2009).

Assim, vias apoptóticas são amplamente estudadas para que se possam desenvolver novas estratégias para indução de morte nas células cancerígenas (Perik *et al.*, 2005), de modo a desenvolver terapias-alvo.

### 2.3.1. A APOPTOSE NAS DIFERENTES NEOPLASIAS

O estudo da apoptose tem vindo a ser utilizado para o aprofundamento do conhecimento das várias neoplasias e o seu eventual papel em terapias-alvo, tanto por medicação como por radioterapia.

Para estudar a quimio-sensibilidade da leucemia mieloide aguda a agentes apoptóticos, Ong *et al.* (2000) utilizaram marcadores de apoptose, Bcl-2 e Bax, para determinar se os pacientes se correlacionavam com a resposta à terapia citotóxica. A expressão de Bcl-2, Bax e a razão de Bcl-2/Bax foi mais elevada em pacientes com leucemia mieloide aguda, em comparação com indivíduos normais. Os pacientes que revelaram uma maior expressão de Bax no diagnóstico tinham um prognóstico

significativamente mais favorável e uma maior sobrevivência. Uma análise multivariada revelou que o Bax é um indicador de prognóstico independente na leucemia mieloide aguda e pode auxiliar a decisão terapêutica.

Com o objetivo de analisar a expressão do gene Bcl-2, em associação com as características biológicas de carcinoma pancreático humano ou prognóstico, Sun *et al.* (2002) conduziram um estudo que evidenciou sobreexpressão de Bcl-2 no carcinoma pancreático, em contraste com pacientes com pâncreas normal. Estes resultados sugeriram que esta proteína estava relacionada com a carcinogênese nos estádios iniciais e progressão do carcinoma pancreático, culminando na conclusão de que a utilização deste marcador poderia ser útil para estabelecer o prognóstico nos pacientes com esta neoplasia.

Num estudo em humanos, Hartmann *et al.* (2003) examinaram a expressão de marcadores de apoptose em mastócitos nas lesões cutâneas da mastocitose para um melhor entendimento da patogênese desta patologia. A reatividade ao marcador TUNEL foi baixa, especialmente no mastocitoma, o que sugeriu que a inibição deste processo faz parte da patogênese desta afeção.

Em 2003, Pereira *et al.* tentaram averiguar a relação entre a apoptose, o diagnóstico e o prognóstico em tumores mamários caninos, utilizando a técnica TUNEL. Verificaram que, quando havia mais de 30 células apoptóticas/10 campos de grande ampliação, o prognóstico era mais desfavorável. Deste estudo concluiu-se que o TUNEL era um marcador que pode ser usado como prognóstico para tumores mamários caninos.

O carcinoma ductal infiltrante da mama foi investigado por Farias *et al.* (2005), também com vista a associar a apoptose com a graduação histológica, utilizando o marcador apoptótico TUNEL. Os autores denotaram que os tumores pouco diferenciados estavam relacionados com um índice apoptótico mais elevado, concluindo, assim, que o número de células apoptóticas neste carcinoma se encontrava diretamente associado à progressão histológica.

Faria *et al.* (2006) investigaram a expressão das proteínas Bax e Bcl-2 em tumores astrocíticos humanos, de modo a associar esta expressão à graduação histopatológica. Os resultados mostraram uma tendência de aumento da expressão de ambas as proteínas, conforme o grau histológico, confirmando, assim, a sua associação.

Liang *et al.* (2011) analisaram a expressão da apoptose em tecidos humanos que apresentavam pterígio. Para tal, utilizaram marcadores apoptóticos como a Bax, o Bcl-2 e o TUNEL. Maior positividade de Bcl-2 foi encontrada em tecidos com pterígio, em comparação com tecidos normais. A expressão de Bax não revelou diferenças entre os tecidos normais e os tecidos afetados. Em conjuntivas normais, o TUNEL foi detetado em toda a largura da camada epitelial mas nos tecidos com pterígio encontravam-se confinados maioritariamente à camada exterior das células epiteliais. Os baixos níveis apoptóticos confirmaram a importância deste mecanismo na patogénese desta neoplasia.

Felinos com mastocitose sistémica foram estudados por Hadzijusufovic *et al.* (2009) para avaliar a expressão de Kit e os efeitos de quatro inibidores de tirosina quinase (TKI) no crescimento de mastócitos neoplásicos no baço. A expressão de Kit foi positiva, pois esta proteína pôde ser observada na superfície celular. Esta expressão foi confirmada por citometria de fluxo e/ou técnica de Western blot. Os inibidores da tirosina quinase inibiram o crescimento de mastócitos neoplásicos. Estes efeitos foram associados com sinais morfológicos da apoptose em mastócitos. Deste estudo, concluiu-se que os inibidores de tirosina quinase inibem o crescimento e sobrevivência dos mastócitos neoplásicos na mastocitose sistémica.

Sendo o carcinoma basocelular uma neoplasia muito comum em humanos foi já objeto de bastante estudo. Corrêa *et al.* (2009) verificaram a correlação entre a expressão de Bcl-2 com indicadores histológicos da gravidade deste tumor. Dos resultados averiguou-se que a marcação desta proteína nos carcinomas basocelulares considerados agressivos foi expressiva, apresentando tendência para diagnosticar a gravidade da neoplasia.

Também em humanos, Porichi *et al.* (2009) estudaram os efeitos dos marcadores apoptóticos Bcl-2 e Bax nos carcinomas, desta vez no endométrio, para determinar a relação da expressão destas proteínas com os critérios clínico-patológicos de mulheres com esta neoplasia. A razão de Bcl-2/Bax aumentou nos carcinomas de grau 3 em comparação com o grau 1, o que relacionou a maior expressão da proteína anti-apoptótica com a carcinogênese deste tumor.

Os glucocorticoides são amplamente usados na terapia de neoplasias, como as leucemias e os linfomas, dado que revelam efeitos apoptóticos nos linfócitos. Por outro lado, apesar dos glucocorticoides terem um efeito anti-apoptótico em células de tumores sólidos, previnem a citotoxicidade da radioterapia e quimioterapia ao induzirem a morte celular. Além desta resistência à apoptose por parte das células neoplásicas, os glucocorticoides são imunossupressores o que pode agravar o processo metastático e acelerar o desenvolvimento tumoral (Lucinda, 2009).

### 2.3.2. A APOPTOSE NO MASTOCITOMA

Sendo o mastocitoma uma das neoplasias cutâneas mais comum no cão torna-se essencial o seu estudo para melhor compreender o comportamento biológico desta patologia, de modo a estabelecer um prognóstico exato (Webster *et al.*, 2007).

A apoptose tornou-se um parâmetro de estudo para recolher mais informação acerca do mastocitoma, levando à concretização de projetos que se basearam na deteção deste processo. Visto que a apoptose é um fenómeno já muito estudado (Saraste & Pulkki, 2000; Danial & Korsmeyer, 2004; Elmore, 2007; Grivicich *et al.*, 2007; Rastogi *et al.*, 2009), combinou-se esse conhecimento com o que já se sabia acerca da célula e produziram-se vários marcadores de apoptose, como foi o caso do TUNEL, Bax, Bcl-2, caspase 3, caspase 14 e Citocromo C, que são hoje usados em imunohistoquímica.

Strefezzi (2007), ao investigar a apoptose no mastocitoma canino, testou esta neoplasia com o marcador pró-apoptótico Bax (inédito nesta neoplasia), relacionando-o com a graduação histopatológica de Patnaik *et*

*al.* (1984), com vista a definir se este era um bom marcador de prognóstico. Os seus resultados mostraram não existir associação entre a imunexpressão deste anticorpo com os graus histopatológicos ou com a mortalidade, sugerindo que as variações da expressão deste imunomarcador não estão relacionadas com maior agressividade.

Porém, novos estudos realizados em 2012 por Strefezzi *et al.*, mostraram associações estatisticamente significativas entre a imunorreatividade de Bax e o grau histológico, tal como com a mortalidade devido ao mastocitoma. Assim, a expressão de “High” Bax (associação entre avaliação quantitativa e qualitativa) presente neste estudo foi relacionada com um mau prognóstico, podendo, assim, relacionar Bax com a malignidade desta neoplasia. Desta investigação concluiu-se que este biomarcador poderia ajudar na previsão do comportamento biológico do mastocitoma canino.

Também em 2012, num estudo de Vascellari *et al.* em mastocitomas caninos foi usado o marcador anti-apoptótico Bcl-2 para avaliar a sua associação com o grau histológico e a sua importância prognóstica, o qual nunca tinha sido investigado antes. O ensaio revelou não haver associação entre a expressão de Bcl-2 e o grau histopatológico, não havendo, assim, associação com prognóstico.



## 2.4. MARCADORES DE DETEÇÃO DA APOPTOSE E PROLIFERAÇÃO CELULAR

### 2.4.1. MARCADORES APOPTÓTICOS

#### 2.4.1.1. TUNEL

Um dos eventos mais característicos da apoptose é a rutura das ligações na dupla cadeia de ADN, através da atividade de endonucleases, causando fragmentação do mesmo. Esta fragmentação é considerada o padrão de excelência para a identificação de células apoptóticas (Hughes & Gobe, 2007; Darzykiewicz *et al.*, 2008). A identificação destes fragmentos é possível devido à aplicação do método enzimático TUNEL - “Terminal Dupt Nick End-Labeling”, no qual a deoxiuridina trifosfato se une enzimaticamente à extremidade 3'-OH dos fragmentos, sendo visível através de substratos cromogénicos, a marcação microscópica dos mesmos (Pereira *et al.*, 2003; Christina *et al.*, 2006; Hughes & Gobe, 2007; Garcia, 2013).

O método foi descrito pela primeira vez por Gavrieli *et al* (1992) e a partir daí, extensivamente utilizado para a deteção de células em apoptose. Inicialmente, este marcador não era tão eficaz, contanto que não podia ser utilizado em tecidos incluídos em parafina. Todavia, foram realizados tratamentos com microondas, de modo a aperfeiçoar a sensibilidade do TUNEL (Gavrieli *et al.*, 1992; Christina *et al.*, 2006).

Este é o método mais comum para detetar apoptose em tecidos fixados devido à sua fácil utilização, sensibilidade e poder quantitativo. Contudo, permanece como desvantagem o facto de este método marcar, também, células em necrose, visto que estas também apresentam ADN livre, o que leva a questionar a validade do ensaio em casos nos quais estes dois processos coexistem (Kelly *et al.*, 2003). O ensaio pode marcar também células em processo de reparação de ADN, razão pela qual deverá ser acompanhado de outro ensaio de deteção de apoptose (Elmore, 2007).

Apesar de ser uma técnica simples, este marcador já foi relacionado com uma elevada coloração de fundo e com uma elevada marcação de falsos-positivos, impedindo uma leitura precisa dos resultados. Os falsos positivos podem surgir devido a fixações muito extensas do tecido ou até a fixações incompletas, o que leva a coloração inespecífica, ou necessidade de desmascaramento, após o processo de fixação em formol e inclusão em parafina, que pode levar a ruturas no ADN (Labat-Moleur *et al.*, 1998; Garcia, 2013). Finalizar a marcação ao inibir a atividade da enzima deoxinucleotidil transferase terminal levou a uma notável melhoria no desempenho (Christina *et al.*, 2006).

#### 2.4.1.2. FAMÍLIA BCL-2

Bcl-2 é uma família de proteínas da membrana mitocondrial que regula a apoptose. Estas proteínas dividem-se em dois grupos: pró e anti-apoptóticas. No primeiro grupo, temos proteínas como o Bax, Bak, Bid, Bad, Bim, Bik, Blk, Bcl-10, e no segundo, proteínas como Bcl-2, Bcl-x, Bcl-XL, Bcl-XS, Bcl-w e BAG (Grivicich *et al.*, 2007; Lucinda, 2009; Réssio, 2010).

##### **a) bax e bcl-2**

Durante a homeostasia celular as proteínas Bax (pró-apoptótica) e Bcl-2 (anti-apoptótica) encontram-se em equilíbrio. São capazes de formar homodímeros (Bax-Bax e Bcl-2-Bcl-2) e heterodímeros (Bax-Bcl-2), sendo que o equilíbrio entre homodímeros e heterodímeros é o que define o balanço pró-apoptótico e anti-apoptótico na célula.

Na presença de um estímulo negativo, capaz de potenciar a apoptose, estas duas proteínas vão entrar em desequilíbrio. É esta desproporção que vai decidir o destino da célula. Caso o dano celular seja irreparável, a expressão de Bax irá aumentar e a célula entrará em apoptose. A Bax, que se encontra originalmente no citoplasma da célula, desloca-se para a membrana mitocondrial externa e interage com a mitocôndria, de forma independente da interação com outras proteínas

antiapoptóticas. A mitocôndria sofre, então, um aumento da permeabilidade da sua membrana, possibilitando a libertação de moléculas pró-apoptóticas, incluindo o Citocromo C, AIF e Smac/DIABLO. Por outro lado, o aumento da expressão de Bcl-2 promove a inibição da apoptose ao impedir a libertação de Citocromo C pela mitocôndria. Isto acontece por causa da interrupção da permeabilização da sua membrana externa, devido à remoção de Bax ou porque Bcl-2 compete pelos locais que esta proteína irá ocupar na membrana mitocondrial, o que acabará por impedir a ativação da cascata de caspases, ao interromper a libertação de fatores apoptóticos (Grivicich *et al.*, 2007; Lucinda, 2009; Réssio, 2010).

O estudo destas duas proteínas tornou-se objeto de investigação com a finalidade de criar novas terapêuticas. A redução da atividade de Bcl-2 é suficiente para induzir a célula a entrar em apoptose. Drogas como o Oblimersen, um oligonucleotídeo antisense anti Bcl-2, e o ABT737, uma pequena molécula que inibe Bcl-2, mostraram resultados promissores, tendo o segundo levado à completa regressão de tumor pulmonar de pequenas células em modelos xenográficos (Grivicich *et al.*, 2007).

## 2.4.2. MARCADOR DE PROLIFERAÇÃO

### 2.4.2.1. KI-67

O ki-67 é uma proteína nuclear que se encontra presente em todas as fases do ciclo celular (Ozaki *et al.*, 2007; Webster *et al.*, 2007; Vascellari *et al.*, 2012). Antigamente, por não ter sido caracterizada, designava-se esta proteína como antigénio Ki-67, todavia, em 1991 começou a designar-se por proteína Ki-67 (Gerdes *et al.*, 1991). Esta proteína apresenta a característica particular de possuir 16 elementos repetidos na estrutura primária, cada um com um tamanho aproximado de 122 resíduos de aminoácidos (Scholzen & Gerdes, 2000).

O anticorpo Ki-67 reage com a estrutura nuclear que se encontra presente apenas em células proliferativas (normais ou tumorais), nas fases da divisão celular, G1, S e G2, e na mitose (Scholzen & Gerdes, 2000). A

fase G0 (fase de repouso) não expressa esta proteína (Gerdes *et al.*, 1984; Ozaki *et al.*, 2007; Webster *et al.*, 2007; Vascellari *et al.*, 2012). Apesar deste anticorpo só reagir com células em proliferação, o facto de uma célula ser positiva ao Ki-67 não significa, que a célula vai, inequivocamente, sofrer divisão (Scholzen & Gerdes, 2000).

Em 2000, o papel desta proteína, durante a proliferação celular, era desconhecido, mas era inquestionável que a sua expressão e a proliferação estavam intimamente ligadas. A utilidade da expressão da proteína para o diagnóstico era questionada, contudo, estudos realizados provaram que tinha valor prognóstico. Discutia-se a existência de competição do Ki-67 com outro marcador de proliferação (PCNA), que podia ser utilizado em cortes fixados em formalina e incluídos em parafina, ao contrário do Ki-67. Porém, a marcação com PCNA era sensível à fixação e a reavaliação do antigénio por tratamento em micro-ondas levou à marcação de células que se encontravam em repouso. Alternativamente, usava-se o anticorpo monoclonal equivalente ao Ki-67, o MIB-1, que se podia usar nestes cortes, depois da reavaliação do antigénio por processamento em micro-ondas (Scholzen & Gerdes, 2000).

Atualmente, a função de Ki-67 continua uma incógnita mas julga-se que está envolvida na síntese do ADN ribossómico (Sheri & Dowsett, 2012). O anticorpo Ki-67, sendo o mais usado para deteção da proliferação celular, tornou-se uma ajuda no diagnóstico em certas patologias humanas, tal como na distinção entre proliferações mesoteliais benignas e malignas, usado em combinação com a proteína repp86 (Taheri *et al.*, 2008), e na deteção do HPV (vírus do papiloma humano), na deteção do carcinoma das células escamosas e da lesão intraepitelial escamosa de alto grau na cérvix (Yu *et al.*, 2010). Atualmente o Ki-67 já pode ser usado em cortes fixados em formalina e incluídos em parafina, o que causou rutura na competição deste anticorpo com o PCNA. Todavia, o primeiro não anulou o segundo e são utilizados em conjunto, simultaneamente, com outros marcadores de proliferação, para uma melhor avaliação desta característica.

Experiências com o anticorpo Ki-67 podem dar uma perspetiva ainda melhor acerca das características proliferativas dos tumores, da

suscetibilidade a certas drogas, além de fornecer alguma informação prognóstica, ajudando a perceber o desenlace do paciente. Contudo, a utilização da expressão desta proteína sozinha não é suficiente para estimar o crescimento tumoral. Esta estimativa dá informação apenas do estado mas não da taxa de proliferação. Para uma melhor avaliação, deve-se realizar uma análise multiparamétrica, com marcadores adicionais (Sheri & Dowsett, 2012).

O anticorpo Ki-67 pode ser usado para imunocoloração em preparações citológicas e histológicas como esfregaços, preparações por técnicas de esmagamento, preparações citocentrífugas e secções histológicas. A sua visualização é sensível a condições de fixação e coloração das amostras (Scholzen & Gerdes, 2000).

Por ser um anticorpo utilizado para a deteção de qualquer célula que se encontre em proliferação, a adaptação de Ki-67 para tecidos tumorais foi natural, já que uma característica essencial das células cancerígenas envolve a sua capacidade para uma proliferação desenfreada (Sheri & Dowsett, 2012).

### **3. COMPONENTE PRÁTICA**

#### **3.1. OBJETIVOS**

Este projeto teve como objetivo avaliar o índice apoptótico no mastocitoma canino através da deteção de diferentes marcadores apoptóticos relacionando-os com um marcador de proliferação, tentando estabelecer uma relação com a graduação histopatológica, com vista a contribuir para o melhor conhecimento da biologia desta neoplasia e para uma melhor determinação de prognóstico.

#### **3.2. MATERIAL E MÉTODOS**

##### **3.2.1. CASUÍSTICA**

Foi realizada uma pesquisa com recurso à base de dados informática do Laboratório de Anatomia Patológica da Escola Superior Agrária de Viseu, GestLabESAV, contemplando o período de 2005 a 2013. No total foram analisadas 1386 fichas de entrada, a partir das quais se selecionaram todos os casos cujo diagnóstico obtido foi o de mastocitoma canino, no total de 84 casos.

Foram considerados como critérios de exclusão todos os casos diagnosticados como tumores de células redondas, diagnóstico efetuado predominantemente por citologia, em que o mastocitoma surgia como uma das principais hipóteses de diagnóstico, resultando na rejeição de 17 casos. Dos 67 restantes casos foram selecionados 28 para a realização deste estudo, dando preferência aos casos mais recentes. Para cada marcador foram selecionados 12 casos de modo a ter 4 casos por grau, tentando, simultaneamente, utilizar os mesmos casos para os diferentes marcadores.

##### **3.2.2. AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA**

Os tecidos foram fixados em formalina neutra tamponada a 10% e submetidos ao processamento histológico, de acordo com as técnicas de

rotina de inclusão em parafina, utilizando o processador Microm STP 120 e a bancada de inclusão Microm AP 280. Os cortes de 3µm foram adquiridos pelo micrótomo Leica RM 2255 e foram corados por Hematoxilina-Eosina, uma coloração que permite a visualização de diferentes estruturas celulares ao corar os núcleos de azul e o citoplasma e fibras de tecido conjuntivo em vários tons de rosa, laranja e vermelho (Bancroft & Gamble, 2002), e o diagnóstico foi feito através da observação das preparações ao microscópio ótico Zeiss Axioplan 2. Para confirmação do diagnóstico as preparações foram submetidas ao método histoquímico de azul de toluidina. Este método evidencia uma reação metacromática que cora os mucopolissacarídeos ácidos (sulfatados e carboxílicos), mastócitos, assim como os seus grânulos, permitindo, assim, a sua visualização (Lourenço, 2009).

Os casos selecionados foram classificados segundo a classificação de Patnaik *et al.*, (1984).

### 3.2.3. IMUNOHISTOQUÍMICA

As amostras foram então testadas de acordo com o método de imunohistoquímica, do Laboratório de Anatomia Patológica da Escola Superior Agrária de Viseu.

#### **Protocolo para Bax, Bcl-2 e Ki-67 pelo método (LAB-SA):**

1. Desparafinação por xilol durante 15 minutos
2. Hidratação em banhos de concentrações decrescentes de álcool etílico - 100%, 96%, 80% e 70% (5 minutos cada)
3. Inibição da peroxidase endógena através de uma solução de peróxido de hidrogénio a 0,5% em metanol, durante 30 minutos, em agitação contínua
4. Lavagem com TBS (Tris-Buffered Saline, pH 7.4), 3 vezes
5. Recuperação antigénica através de uma solução de tampão citrato (ph 6.0) aquecida em:

- a. micro-ondas a 800 watts, em 3 ciclos de 5 minutos cada com arrefecimento intercalar e posterior para Bax e Bcl-2
  - b. panela de pressão, durante 3 minutos, com arrefecimento posterior, para Ki-67
6. Lavagem com TBS, 3 vezes
7. Colocação das preparações em câmara húmida vertical (Sequenza)
8. Incubação da solução de bloqueio, 2 gotas por preparação, durante 10 minutos à temperatura ambiente
9. Incubação do 1º anti-soro, 100 µl/ preparação:
  - a. anti-Bax (Δ 21, 1:100, “rabbit polyclonal antibody”, Santa Cruz, Biotechnology) “overnight”, a 4°C
  - b. Bcl2 (C 21, 1:100, rabbit polyclonal antibody, Santa Cruz, Biotechnology) overnight”, a 4°C
  - c. Ki-67 (rabbit monoclonal antibody antihuman MIB-1) durante 2 horas, a 4°C
10. Lavagem em TBS, 3 vezes, 5 minutos cada
11. Incubação com o segundo anti-soro biotínido, 2 gotas por preparação, durante 10 minutos
12. Lavagem com TBS, 3 vezes, 5 minutos cada
13. Incubação do terceiro anti-soro (streptavidina peroxidase - HRP), 2 gotas por preparação, durante 10 minutos à temperatura ambiente
14. Lavagem com TBS, 3 vezes, 5 minutos cada
15. Coloração com DAB, 2 gotas (100 µl) por preparação, durante 5 minutos à temperatura ambiente
16. Colocação das preparações em TBS
17. Lavagem em água corrente
18. Coloração de contraste com hematoxilina de Harris durante 15 minutos
19. Lavagem das preparações em água corrente, durante 10 minutos
20. Desidratação com concentrações crescentes de álcool (2 banhos a 96% e 2 banhos a 100%), 5 minutos cada



21. Clarificação em xilol, durante 5 minutos
22. Montagem das preparações com meio de montagem próprio (Entellan)

### **Protocolo para TUNEL:**

1. Desparafinação por xilol durante 15 minutos
2. Hidratação em banhos de concentrações decrescentes de álcool etílico - 100%, 96%, 80% e 70% (5 minutos cada)
3. Inibição da peroxidase endógena através de uma solução de peróxido de hidrogénio a 3% em metanol, durante 30 minutos, em agitação contínua
4. Lavagem com TBS (Tris-Buffered Saline, pH 7.4), 3 vezes
5. Recuperação antigénica através de uma solução de tampão citrato (pH 6.0) aquecida no micro-ondas a 800 watts, em 3 ciclos de 5 minutos cada, com arrefecimento intercalar e posterior
6. Lavagem com TBS, 3 vezes
7. Secagem da área em redor das preparações e delimitação do tecido com caneta hidrofóbica
8. Colocação das preparações em câmara húmida horizontal (Bioptica)
9. Adição da mistura reacional TUNEL, 100 µl/ preparações
10. Incubação em câmara húmida vertical no escuro, durante 1 hora, a 37°C
11. Lavagem em TBS, 3 vezes, 5 minutos cada
12. Secagem da área em redor da preparação
13. Adição de 100 µl de Converter POD
14. Incubação em câmara húmida vertical no escuro, durante 10 minutos, a 37°C
15. Lavagem com TBS, 3 vezes, 5 minutos cada
16. Coloração com DAB, 2 gotas (100 µl) por preparação, durante 5 minutos à temperatura ambiente
17. Lavagem com TBS, 3 vezes, 5 minutos cada

18. Coloração de contraste com hematoxilina de Harris durante 15 minutos
19. Lavagem das preparações em água corrente, durante 10 minutos
20. Desidratação com concentrações crescentes de álcool (2 banhos a 96% e 2 banhos a 100%), 5 minutos cada
21. Clarificação em xilol, durante 5 minutos
22. Montagem das preparações com meio de montagem próprio (Entellan)

#### 3.2.4. AVALIAÇÃO DA IMUNOMARCAÇÃO

Os casos testados foram considerados positivos na presença de uma coloração distinta em castanho. Os casos testados com TUNEL e Ki-67 foram considerados positivos aquando da presença de material nuclear com imunomarcação. No caso da Bax e do Bcl-2 foram consideradas positivas as células que apresentavam marcação citoplasmática.

Os controlos positivos utilizados revelaram reação positiva em todas as amostras estudadas. Para Bax foi usado timo de coelho e para Bcl-2 e Ki-67 utilizou-se válvula ileocecal.

A avaliação qualitativa foi baseada na intensidade da marcação citoplasmática e registada como: 0, ausente; 1, fraca; 2, moderada; 3, intensa; 4, muito intensa.

A avaliação quantitativa foi baseada na percentagem de células tumorais positivamente marcadas e registada como: 0, sem marcação; 1, <25% de células marcadas; 2, 25-50% de células marcadas; 3, 50-75% de células marcadas; e 4, >75% de células marcadas.

O resultado final para a expressão dos marcadores foi obtido através da soma das avaliações qualitativa e quantitativa: 0, sem reação; 1-4, baixa expressão de marcador - Low; 5-8, alta expressão de marcador - High (adaptado de Strefezzi *et al.*, 2012).

Aquando da visualização das lâminas foi realizado o Quickscore – QS (Detre *et al.*, 1995), de modo a avaliar cada lâmina por inteiro, obtendo um score mais fiável.

Para as avaliações quantitativa e qualitativa foram adquiridas 10 fotografias de campos aleatórios, de cada caso através da Câmara microscópica digital Leica DFC450 e a sua análise foi feita pelo Software LAS V 4.2

Para calcular o High-Score (HS) total cada campo foi observado com o auxílio de uma grelha para uma contagem celular manual mais precisa. Recorrendo ao software Excel foram registadas quantas células estavam presentes com determinada intensidade de marcação. Após esta contagem, calculou-se a média dos HS de cada um dos 10 campos, obtendo-se o H-score total.

O índice apoptótico (IA) foi obtido através da relação entre células tumorais positivas com o total de células presentes na amostra, segundo a fórmula:

$$IA (\%) = \frac{[\text{número de células imunopositivas}]}{[\text{número total de células contadas}]} \times 100 \text{ (adaptado de Faria et al., 2006)}$$

### **3.3. RESULTADOS**

#### **3.3.1. CASUÍSTICA**

O número de amostras avaliadas neste estudo foi de 23 visto que as restantes 5 revelaram resultados negativos que impossibilitaram a sua avaliação.

Os casos de estudo compreenderam mastocitomas de animais com idades compreendidas entre os 5 e os 11 anos, sendo a média de 9, 15 machos (65,22%) e 8 fêmeas (34,78%), das raças Boxer (39,13%), Labrador Retriever (30,43%), Golden Retriever (4,35%), Dogue Argentino (4,35%), Cocker Spaniel (4,35%), Boerboel (4,35%) e indeterminada (13,04%). A localização incluía várias regiões do corpo, entre as quais a zona da cabeça (8,69%), do pescoço (4,35%), do tórax (13,04%), da axila (4,35%), do abdómen (17,39%), dos membros (43,48%), da anca (4,35%) e da cauda (4,35%). Foram incluídos 8 (34,78%) mastocitomas de grau I, 7 (30,44%) de grau II e 8 (34,78%) de grau III. Estes parâmetros encontram-se descritos no Quadro 4.

**Quadro 4. Epidemiologia e histopatologia referentes aos casos avaliados**

<b>CASO</b>	<b>IDADE (anos)</b>	<b>SEXO</b>	<b>RAÇA</b>	<b>LOCAL</b>	<b>GRAU</b>	<b>JUSTIFICAÇÃO DA CLASSIFICAÇÃO HISTOLÓGICA</b>
<b>1</b>	8	Fêmea	Indeterminada	Membro	I	- organização em fileiras e agrupamentos - grânulos abundantes - localização na derme média
<b>2</b>	-	Macho	Boxer	Membro	I	- organização em fileiras e agrupamentos - grânulos abundantes - localização na derme média
<b>3</b>	6	Macho	Boerboel	Abdómen	I	- organização em fileiras e agrupamentos - grânulos abundantes - localização na derme média
<b>4</b>	-	Macho	Boxer	Membro	I	- grânulos abundantes - localização na derme média
<b>5</b>	-	Fêmea	Golden Retriever	Axila	I	- localização na derme média - baixo pleomorfismo
<b>6</b>	-	Fêmea	Boxer	Cabeça	I	- organização em fileiras e agrupamentos -localização na derme média
<b>7</b>	10	Macho	Boxer	Cabeça	II	- organização em fileiras e agrupamentos mal definidos -localização na derme média e profunda -pleomorfismo moderado

<b>8</b>	10	Fêmea	Boxer	Membro	II	- localização em toda a derme - presença de colagenólise e necrose
<b>9</b>	9	Macho	Labrador Retriever	Cauda	II	- localização na derme profunda e tecido subcutâneo - pleomorfismo moderado - presença de colagenólise
<b>10</b>	8	Macho	Dogue Argentino	Membro	II	- localização na derme média - pleomorfismo moderado - presença de colagenólise
<b>11</b>	-	Macho	Labrador Retriever	Abdómen	II	- organização em fileiras e padrão difuso - localização da derme média até ao tecido subcutâneo - presença de colagenólise
<b>12</b>	9	Macho	Labrador Retriever	Membro	II	- organização em fileiras e padrão difuso - localização na derme média e profunda - pleomorfismo moderado
<b>13</b>	8	Macho	Boxer	Membro	II	- organização em fileiras e padrão difuso - localização na derme profunda - pleomorfismo acentuado
<b>14</b>	10	Macho	Labrador Retriever	Tórax	III	- localização na derme profunda e tecido subcutâneo - pleomorfismo elevado - presença de hemorragia
<b>15</b>	-	Fêmea	Boxer	Abdómen	III	- núcleos de tamanho

						irregular - pleomorfismo elevado
<b>16</b>	-	Macho	Indeterminada	Anca	III	- pleomorfismo elevado - presença de necrose e ulceração
<b>17</b>	-	Fêmea	Indeterminada	Membro	III	- 1 ou 2 nucléolos proeminentes - pleomorfismo elevado - presença de colagenólise
<b>18</b>	-	Macho	Boxer	Tórax	III	- 1 ou 2 nucléolos proeminentes - pleomorfismo elevado - presença de ulceração
<b>19</b>	11	Fêmea	Labrador Retriever	Pescoço	III	- organização em padrão difuso - presença de hemorragia
<b>20</b>	-	Macho	Cocker Spaniel	Tórax	III	- observação de grânulos - presença de colagenólise - pleomorfismo elevado
<b>21</b>	-	Macho	Labrador Retriever	Membro	III	- altamente celular - nucléolos proeminentes - pleomorfismo moderado
<b>22</b>		Macho	Labrador Retriever	Abdómen	I	- organização em fileiras ou num padrão mais difuso - muito granular
<b>23</b>		Fêmea	Boxer	Membro	I	- organização em fileiras ou num padrão mais difuso - muito granular

### 3.3.2. TUNEL

Das amostras testadas com o marcador TUNEL apenas três foram positivas com reação localizada no núcleo.

A amostra de grau I apresentou uma reação moderada (++) de 0% a 25% das células

O grau II revelou uma reação intensa (+++) em 25% a 50% das células.

O grau III apresentou uma reação muito intensa (+++++) em 75% a 100% das células.

A intensidade e percentagem de marcação celular podem ser observadas no Quadro 5.

**Quadro 5. Reação imunohistoquímica obtida com marcador TUNEL.**

Grau	Casos	Intensidade	Percentagem de células
Grau I	1	++	0% - 25%
Grau II	1	+++	25% - 50%
Grau III	1	+++++	75% - 100%

O score final revelou que a amostra de grau I apresentou Low TUNEL e as amostras de graus II e III revelaram High TUNEL (Quadro 6).

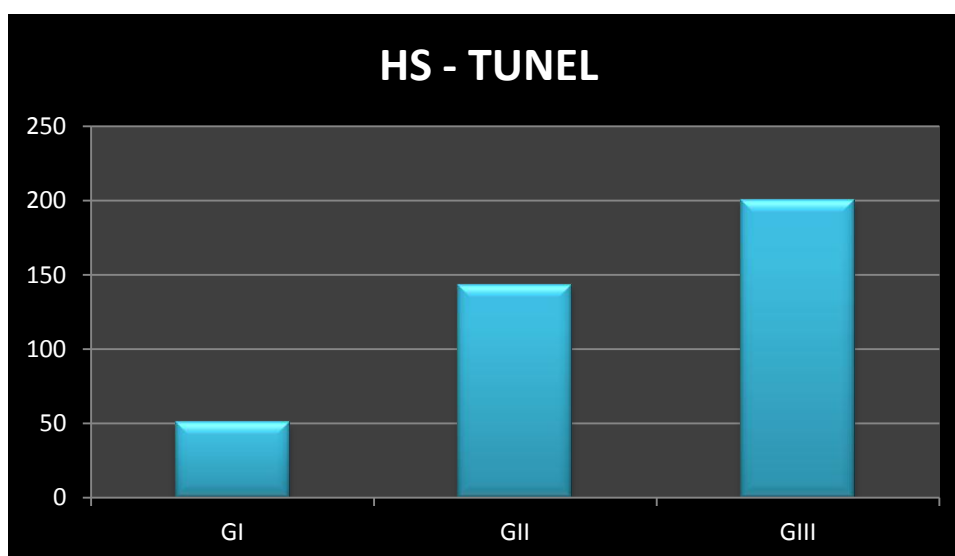
**Quadro 6. Score final das amostras testadas com TUNEL.**

Nº da amostra	Localização	Gradação histológica	IHC labelling
			Bax
1	Membro	G I	3 (Low)
12	Membro	G II	5 (High)
14	Tórax	G III	8 (High)

Os HS revelaram um aumento de grau I para grau III (Quadro 7; Figura 8).

**Quadro 7. Valores de HS referentes às amostras testadas com TUNEL.**

Grau	Casos	HS
Grau I	1	50,3
Grau II	1	143,1
Grau III	1	200,1



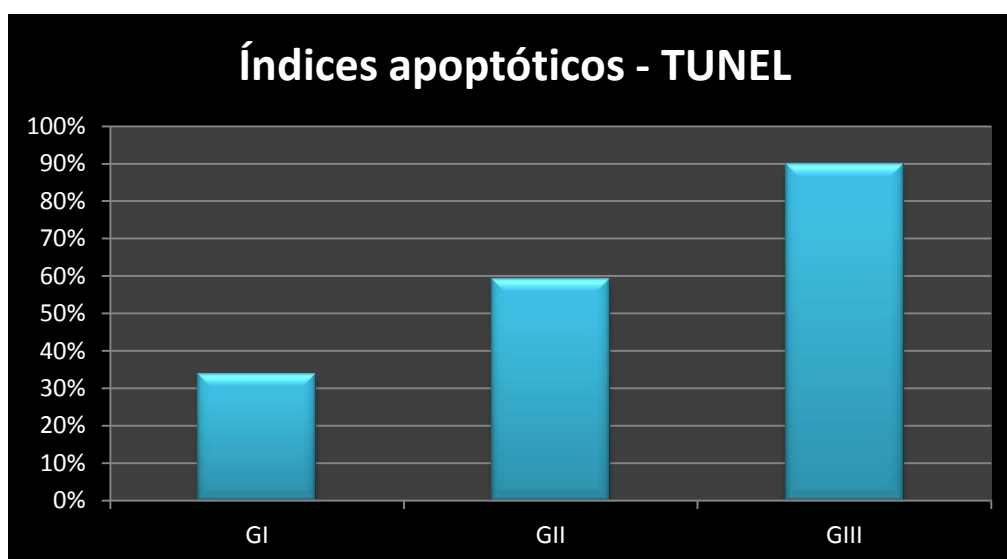
**Figura 8.** HS, imunomarcador TUNEL.

Os índices apoptóticos apresentaram também um aumento de grau I para grau III (Quadro 8; Figura 9).



**Quadro 8. Índice apoptótico das amostras testadas com TUNEL.**

Grau	Caso	Células negativas	Células positivas	Total de células	Proporção
Grau I	1	2430	1234	3664	33,7%
Grau II	1	591	855	1446	59,1%
Grau III	1	106	932	1038	89,8%



**Figura 9.** Índices apoptóticos, imunomarcador TUNEL.

### 3.3.3. BAX

Todos os mastocitomas testados com Bax revelaram reação positiva no citoplasma e também no núcleo.

Das amostras de grau I três revelaram marcação muito intensa (++++) em 75% a 100% das células e o restante marcação intensa (+++) em 75% a 100% das células.

No grau II duas amostras apresentavam marcação intensa (+++) em 75% das células, a terceira apresentava a mesma intensidade (+++) mas apenas em 50% a 75% das células e a quarta amostra apresentou reação de intensidade moderada (++) em 25% a 50% das células.

No grau III uma das amostras obteve marcação muito intensa (++++) em 100% das células, duas obtiveram marcação intensa (+++) em 50% das células e uma marcação moderada (++) em 50% das células.

A intensidade e percentagem de marcação celular pode ser observada no Quadro 9.

**Quadro 9. Reação imunohistoquímica obtida com marcador Bax.**

Grau	Casos	Intensidade	Percentagem de células
Grau I	1	++++	75% - 100%
	2	++++	75% - 100%
	3	++++	75% - 100%
	4	++	75% - 100%
Grau II	1	+++	75% - 100%
	2	++	25% - 50%
	3	+++	75% - 100%
	4	+++	50% - 75%
Grau III	1	+++	50% - 75%
	2	++	50% - 75%
	3	+++	50% - 75%
	4	++++	100%

O score final revelou que todas as amostras apresentavam High Bax com exceção de umas das amostras de grau II que revelou Low Bax - 4 (Quadro10).

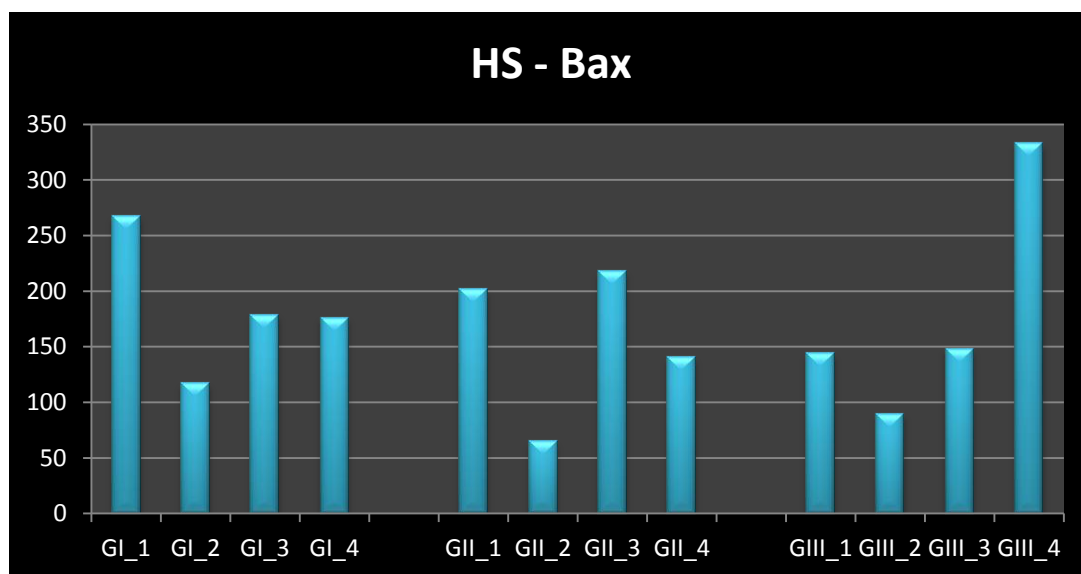
**Quadro 10. Score final das amostras testadas com Bax.**

Nº da amostra	Localização	Graduação histológica	IHC labelling
			Bax
5	Axila	G I	8 (High)
4	Membro	G I	8 (High)
3	Membro	G I	8 (High)
2	Membro	G I	6 (High)
9	Cauda	G II	7 (High)
8	Membro	G II	4 (Low)
10	Lombar	G II	7 (High)
11	Abdómen	G II	6 (High)
18	Tórax	G III	6 (High)
17	Abdómen	G III	5 (High)
16	Anca	G III	6 (High)
15	Mama	G III	8 (High)

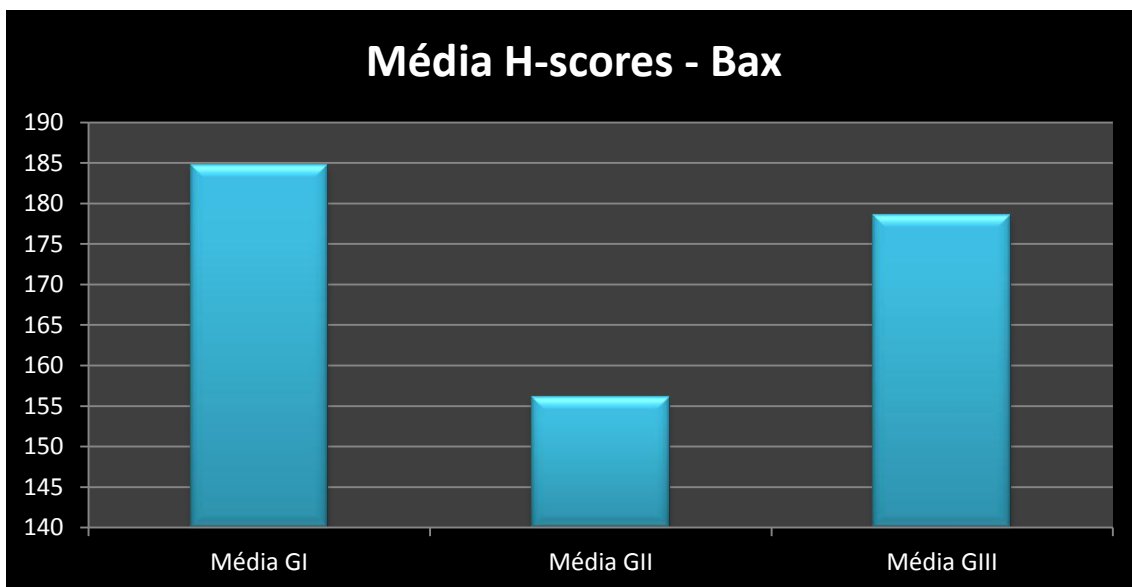
Foi contudo notória uma diminuição da média dos HS, com o aumento do grau (HS GI - 184,592; HS GII - 156,04; HS GIII - 174,88), quando analisamos de grau I para grau III, visto que o grau II apresentou um valor mais baixo comparativamente com o grau III (Quadro 11; Figuras 10 e 11).

**Quadro 11. Valores de HS referentes às amostras testadas com Bax.**

Grau	Casos	HS	Média dos HS
Grau I	1	267,3	184,6
	2	116,7	
	3	178,7	
	4	175,7	
Grau II	1	201,3	156,0
	2	64,9	
	3	217,8	
	4	140,2	
Grau III	1	143,7	178,5
	2	89,5	
	3	148,4	
	4	332,6	



**Figura 10. HS, imunomarcador Bax.**

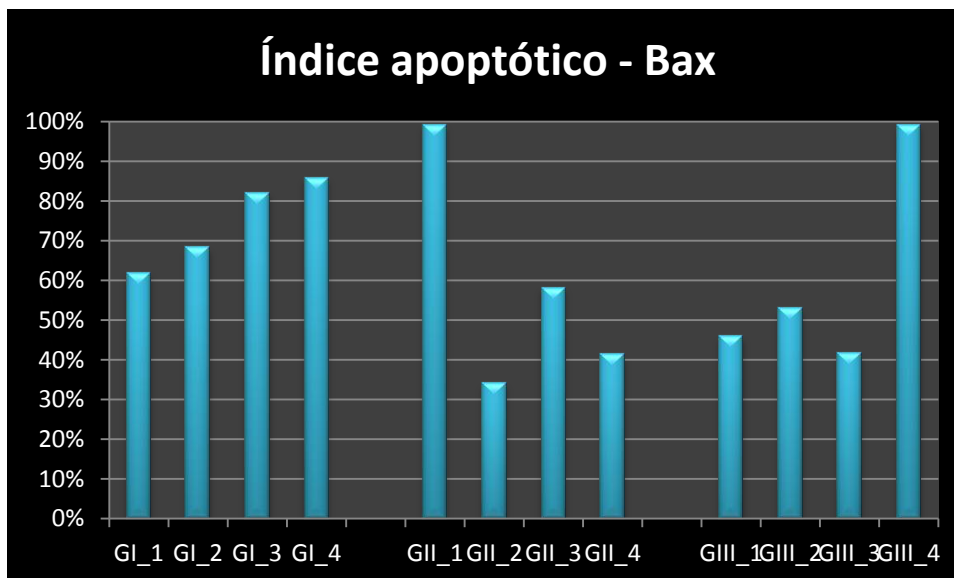


**Figura 11.** Média HS, imunomarcador Bax.

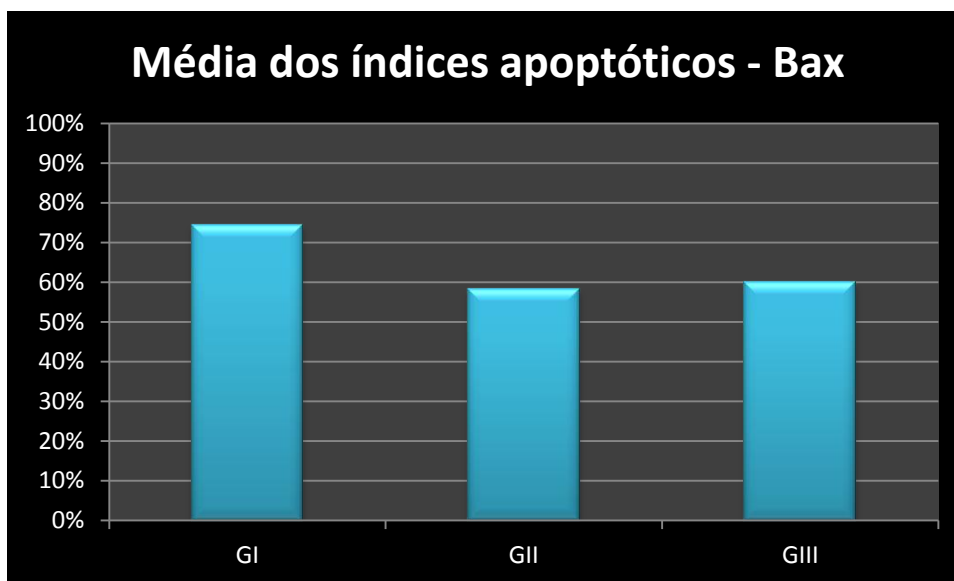
A média dos índices apoptóticos revelou também uma diminuição conforme a graduação histológica (IA GI – 74,5%; IA GI – 58,1%; IA GIII – 59,8%), com a exceção do grau II que apresentou um índice mais baixo comparativamente com o grau III (Quadro 12; Figuras 10 e 11).

**Quadro 12.** Índice apoptótico das amostras testadas com Bax.

rau	Caso	Células negativas	Células positivas	Total de células	Índice apoptótico (%)	Média do índice apoptótico (%)
Grau I	1	1222	1985	3207	61,9%	74,5%
	2	1116	2402	3518	68,3%	
	3	559	2546	3105	82%	
	4	441	2673	3114	85,8%	
Grau II	1	26	2884	2910	99,1%	58,1%
	2	1719	989	2708	34%	
	3	774	1074	1848	58,1%	
	4	943	660	1603	41,2%	
Grau III	1	2014	1701	3715	45,8%	59,8%
	2	808	908	1716	52,9%	
	3	1664	1182	2846	41,5%	
	4	33	3794	3827	99,1%	



**Figura 12.** Índices apoptóticos, imunomarcador Bax.



**Figura 13.** Média dos índices apoptóticos, imunomarcador Bax.

### 3.3.4. BCL-2

Todos os mastocitomas testados com Bcl-2 revelaram uma reação positiva no citoplasma e também no núcleo.

Dois casos de grau I revelaram marcação em 50% a 75% das células, tendo sido a marcação variável de intensa (+++) a moderada (++) . Os dois casos restantes revelaram reações intensa (+++) e débil (+) em 75% a 100% das células.

No grau II uma das amostras apresentou marcação intensa (+++) em 75% a 100% das células e as restantes uma marcação fraca (+) em 50% a 75%.

No grau III duas das amostras apresentaram marcação intensa (+++) em 75% a 100% das células, outra apresentou marcação intensa (+++) em 50% a 75% das células e a última apresentou marcação fraca (+) em 75% a 100% das células.

A intensidade e percentagem de marcação celular podem ser observadas no Quadro 13.

**Quadro 13. Reação imunohistoquímica obtida com marcador Bcl-2.**

Grau	Casos	Intensidade	Percentagem de células
Grau I	1	++	50% - 75%
	2	+++	50% - 75%
	3	+++	75% - 100%
	4	+	75% - 100%
Grau II	1	+	50% - 75%
	2	+	50% - 75%
	3	+	50% - 75%
	4	+++	75% - 100%
Grau III	1	+	75% - 100%
	2	+++	50% - 75%
	3	+++	75% - 100%
	4	+++	75% - 100%

O score final revelou que todas as amostras apresentavam High Bcl-2 com exceção de três amostras de grau II que revelaram Low Bcl-2 - 4 (Quadro14).

**Quadro 14. Score final das amostras testadas com Bcl-2.**

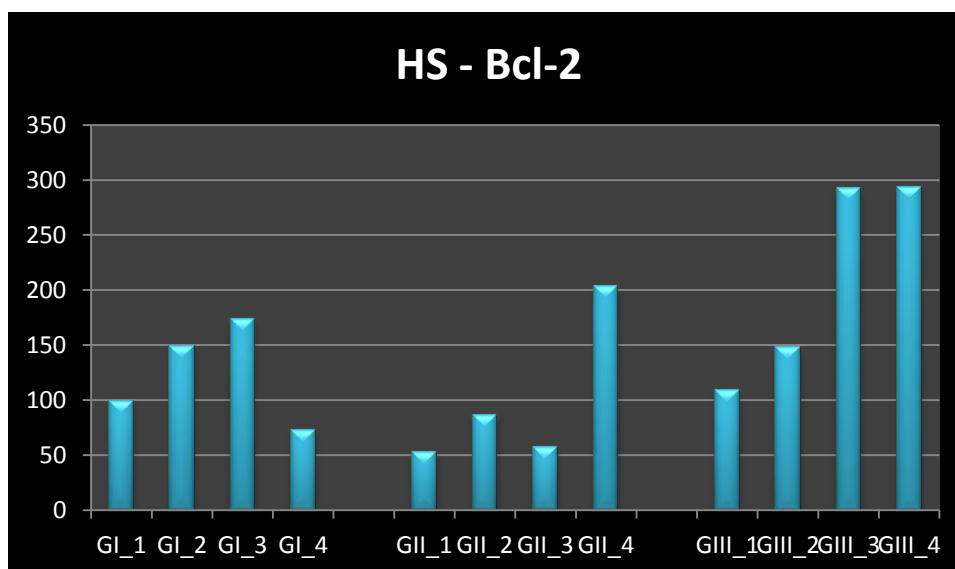
Nº da amostra	Localização	Gradação histológica	IHC labelling
			Bcl-2
5	Axila	G I	5 (High)
4	Membro	G I	6 (High)
3	Membro	G I	7 (High)
2	Membro	G I	5 (High)
9	Cauda	G II	4 (Low)
8	Membro	G II	4 (Low)
10	Lombar	G II	4 (Low))
11	Abdómen	G II	7 (High)
18	Tórax	G III	5 (High)
17	Abdómen	G III	6 (High)
16	Anca	G III	7 (High)
15	Mama	G III	7 (High)

A média dos HS aumentou conforme o grau aumentou com a exceção do grau II, que diminuiu em comparação a ambos os graus I e II (HS GI - 123,51; HS GII - 99,851; HS GIII - 210,42). Estes valores estão representados no Quadro 15 e Figuras 12 e 13.

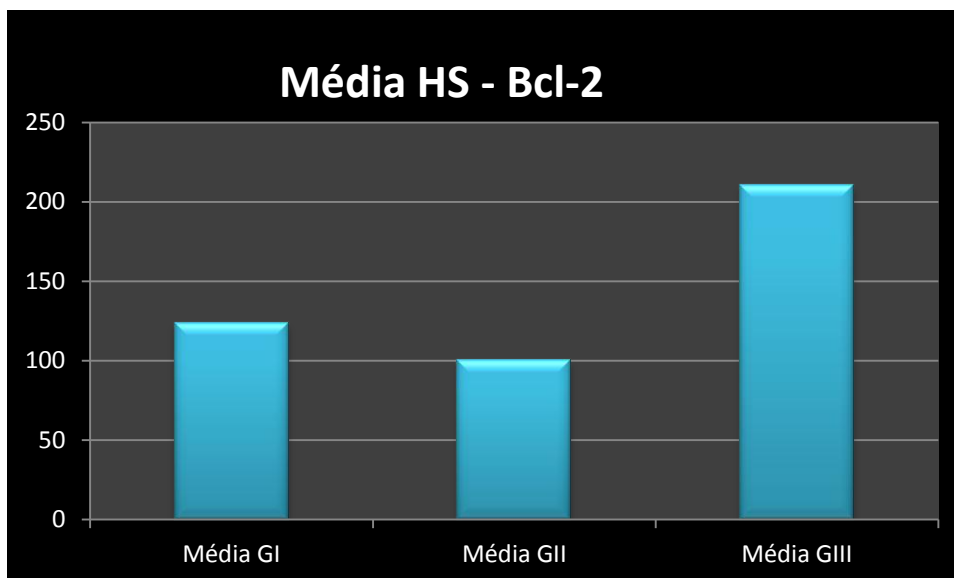


**Quadro 15. Valores de HS referentes às amostras testada com Bcl-2.**

Grau	Casos	HS	Média dos HS
Grau I	1	99	123,5
	2	149,3	
	3	173,4	
	4	72,3	
Grau II	1	53,2	99,9
	2	86,1	
	3	56	
	4	203,1	
Grau III	1	108,9	210,4
	2	147,8	
	3	292,0	
	4	293,1	



**Figura 14. HS, imunomarcador Bcl-2.**

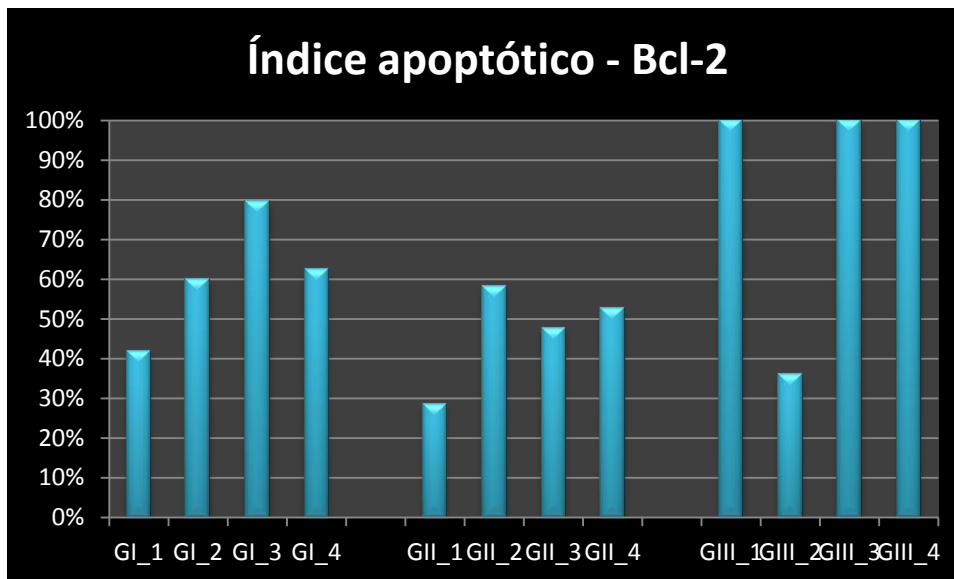


**Figura 15.** HS, imunomarcador Bcl-2.

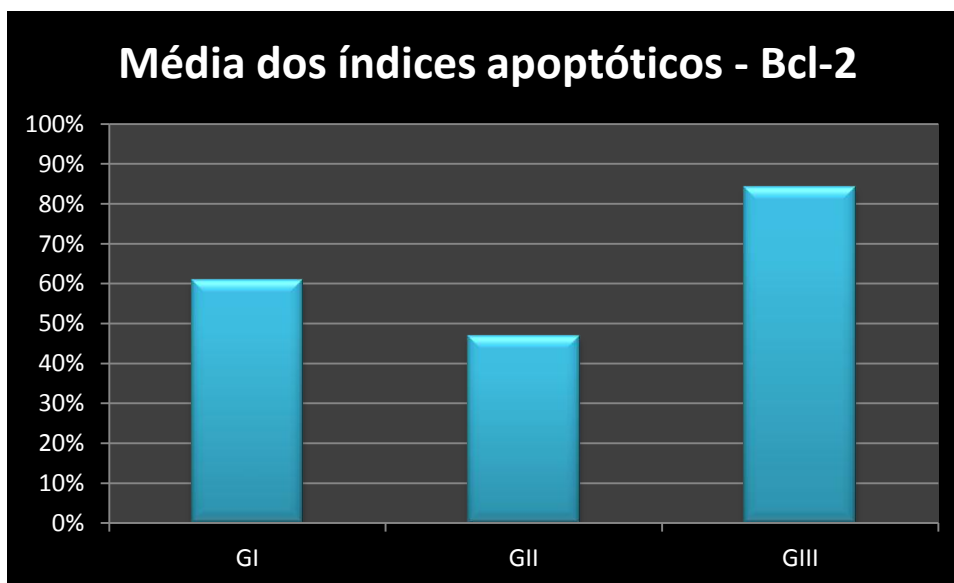
A média dos índices apoptóticos revelou um aumento coincidente com o aumento da graduação histológica, com exceção do grau II que diminuiu em comparação com os outros dois (IA GI – 64%; IA GI – 48,7%; IA GIII – 84%). Estes valores podem ser observados no Quadro 16 e nas Figuras 14 e 15.

**Quadro 16.** Índice apoptótico das amostras testadas com Bcl-2.

Grau	Caso	Células negativas	Células positivas	Total de células	Índice apoptótico (%)	Média do índice apoptótico (%)
Grau I	1	2409	1741	4150	42%	61%
	2	1339	2012	3351	60%	
	3	536	2087	2623	79,6%	
	4	1301	2168	3469	62,5%	
Grau II	1	1172	462	1634	28,3%	46,7%
	2	1340	1856	3196	58,1%	
	3	1628	1483	3111	47,7%	
	4	1190	1319	2509	52,6%	
Grau III	1	0	3723	3723	100%	84%
	2	999	566	1565	36,2%	
	3	0	2279	2279	100%	
	4	0	4516	4516	100%	



**Figura 16.** Índices apoptóticos, imunomarcador Bcl-2.



**Figura 17.** Médias dos índices apoptóticos, imunomarcador Bcl-2.

### 3.3.5. RAZÃO BCL-2/BAX

A razão entre Bcl-2 e Bax aumentou de acordo com o grau histológico. Nos mastocitomas de grau I e II esta razão foi maior que 1, o que levou à ocorrência de apoptose. No caso do grau III a razão foi menor que 1, o que significa que houve supressão da apoptose (Quadro 17).

**Quadro 17. Razão Bcl-2/Bax, segundo IA.**

IA	Bcl-2	Bax	Razão	Resultado
Média GI	61%	74,5%	<1	Ocorrência de apoptose
Média GII	46,7%	58,1%	<1	Ocorrência de apoptose
Média GIII	84%	59,8%	>1	Supressão da apoptose

### 3.3.6. KI-67

Todos os mastocitomas testados com Ki-67 revelaram reação positiva localizada no núcleo, com a exceção de uma das amostras de grau II que apresentou uma reação negativa.

No grau I três das amostras revelaram marcação intensa em menos de 25% das células e a quarta amostra teve reação moderada em menos de 25% as células

No grau II uma das amostras apresentou marcação moderada em menos de 25% das células, uma de marcação muito intensa em menos de 25% das células.

No grau III três amostras tiveram uma marcação muito intensa, duas em menos de 25% das células e a outra em 25% a 50%. A restante apresentou reação moderada em menos 25% das células.

A intensidade e percentagem de marcação celular podem ser observadas no Quadro 18.

**Quadro 18. Reação imunohistoquímica obtida com marcador Ki-67.**

Grau	Casos	Intensidade	Percentagem de células
Grau I	1	+++	0% - 25%
	2	+++	0% - 25%
	3	+++	0% - 25%
	4	++	0% - 25%
Grau II	1	+	0% - 25%
	2	++++	0% - 25%
	3	++	0% - 25%
Grau III	1	+++++	0% - 25%
	2	++	0% - 25%
	3	++++	0% - 25%
	4	+++++	25% - 50%

O score final revelou Low Ki-67 em todas as amostras de grau I, em duas amostras do grau II e uma amostra do grau III. Observou-se High Ki-67 numa das amostras do grau II e em três amostras do grau III (Quadro 19).

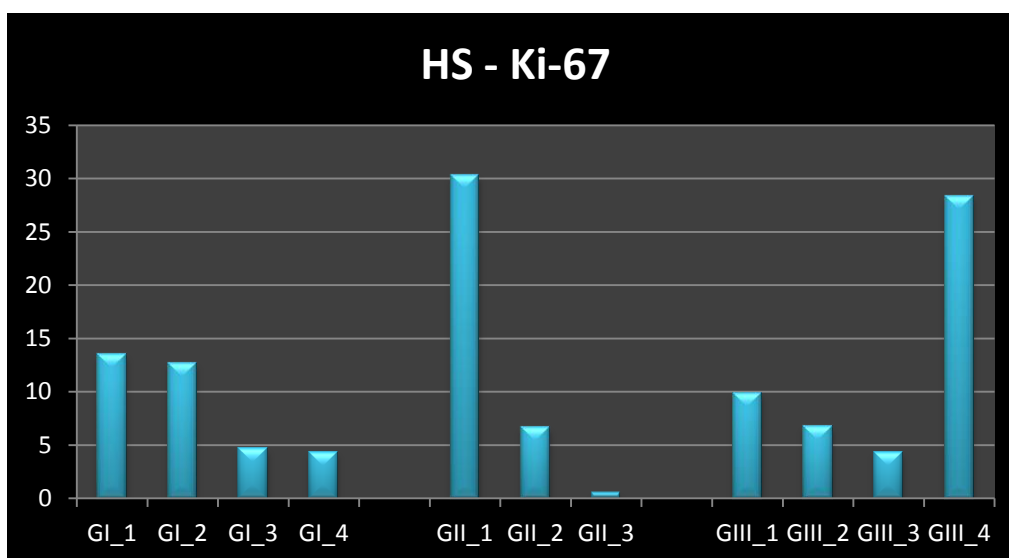
**Quadro 19. Score final das amostras testadas com Ki-67.**

Nº da amostra	Localização	Gradação histológica	IHC labelling
			Ki-67
5	Axila	G I	4 (Low)
23	Membro	G I	4 (Low)
22	Abdómen	G I	4 (Low)
6	Cabeça	G I	3 (Low)
7	Cabeça	G II	5 (High)
12	Membro	G II	3 (Low)
1	Membro	G II	2 (Low)
21	Membro	G III	5 (High)
20	Tórax	G III	3 (Low)
19	Pescoço	G III	5 (High)
14	Tórax	G III	6 (High)

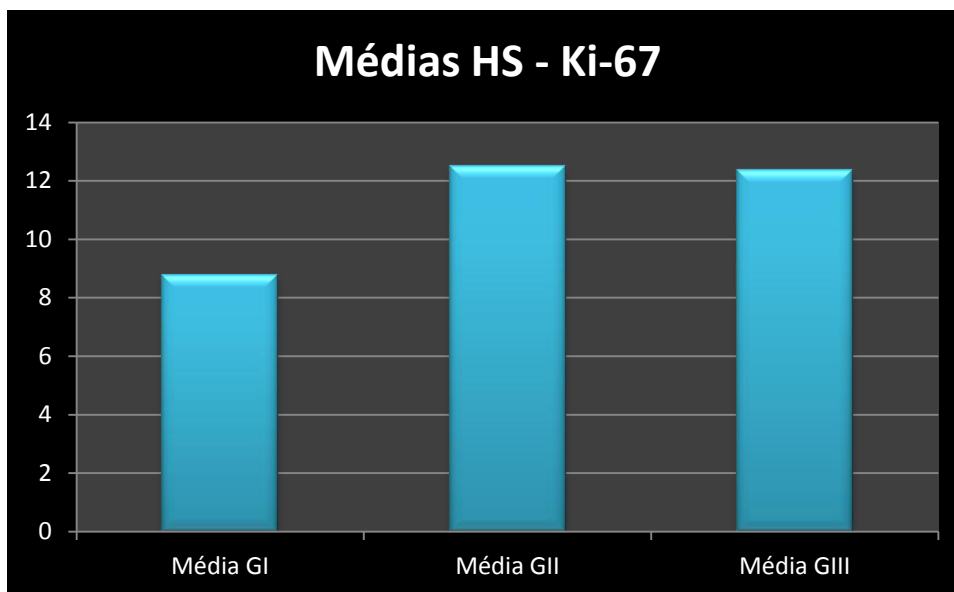
A média dos HS revelou tendência para aumentar conforme a graduação histológica (HS GI – 8,8; HS GII – 12,5; HS GIII – 12,3), com a exceção do grau II que apresentou um valor mais elevado que os restantes graus (Quadro 20; Figuras 16 e 17).

**Quadro 20. Valores de HS referentes às amostras testada com Ki-67.**

Grau	Casos	HS	Média dos HS
Grau I	1	13,5	8,8
	2	12,7	
	3	4,6	
	4	4,3	
Grau II	1	30,3	12,5
	2	6,7	
	3	0,5	
Grau III	1	9,9	12,3
	2	6,7	
	3	4,3	
	4	28,4	



**Figura 18.** HS, imunomarcador Ki-67.

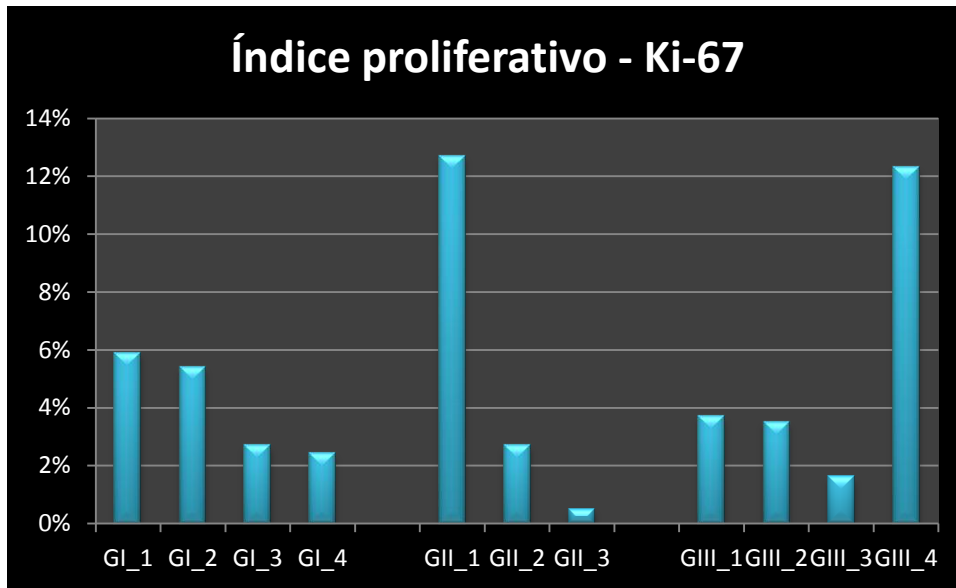


**Figura 19.** Média HS, imunomarcador Ki-67.

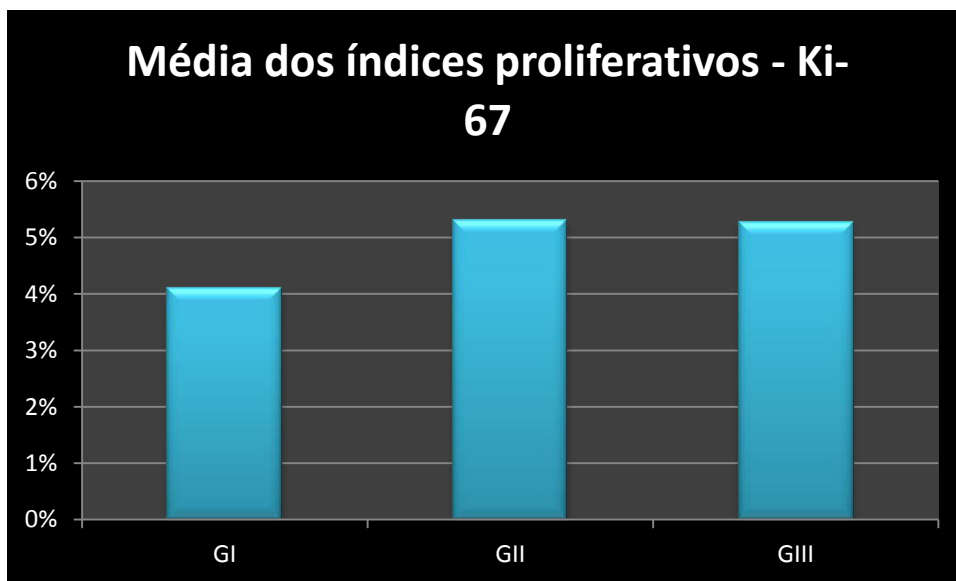
A média dos índices proliferativos revelou um aumento conforme a graduação histológica (IA GI- 4,1%; IA GII – 7%; IA GIII – 5,3%). O grau II apresentou um índice mais elevado que os restantes graus (Quadro 21; Figuras 18 e 19).

**Quadro 21.** Índice proliferativo das amostras testadas com Ki-67.

Grau	Caso	Células negativas	Células positivas	Total de células	Índice proliferativo (%)	Média dos índices proliferativos (%)
Grau I	1	3416	214	3630	5,9%	4,1%
	2	2617	149	2766	5,4%	
	3	2135	59	2194	2,7%	
	4	2724	66	2790	2,4%	
Grau II	1	1002	146	1148	12,7%	7%
	2	2029	57	2086	2,7%	
	3	2402	12	2414	0,5%	
Grau III	1	1624	62	1686	3,7%	5,3%
	2	2725	99	2824	3,5%	
	3	6951	110	7061	1,6%	
	4	4837	680	5517	12,3%	



**Figura 20.** Índices proliferativos, imunomarcador Ki-67.

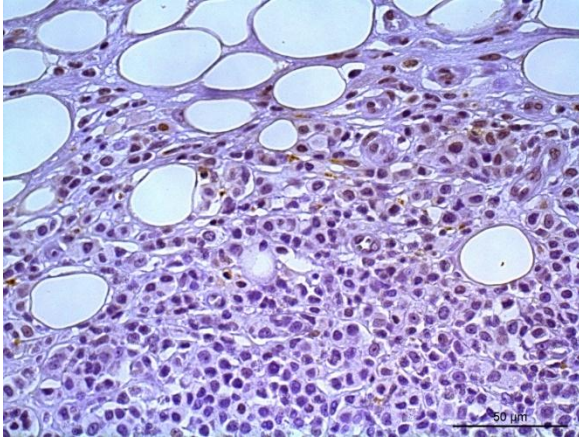


**Figura 21.** Média dos índices proliferativos, Ki-67.

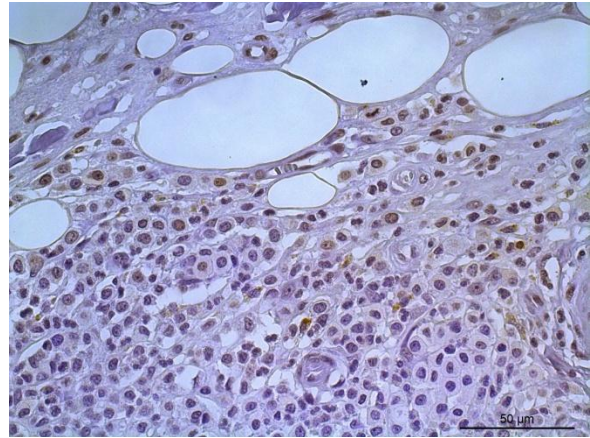


### 3.3.7. ICONOGRAFIA

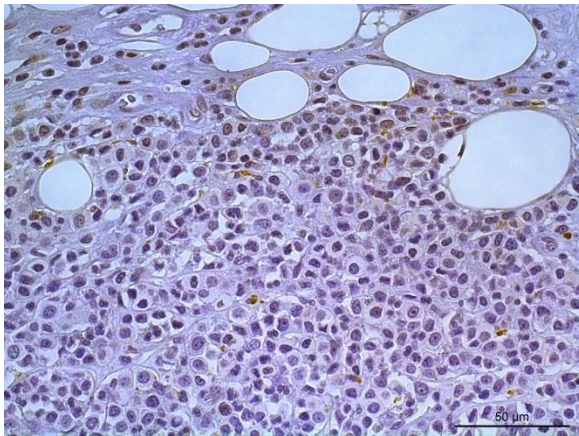
#### 3.3.7.1. TUNEL



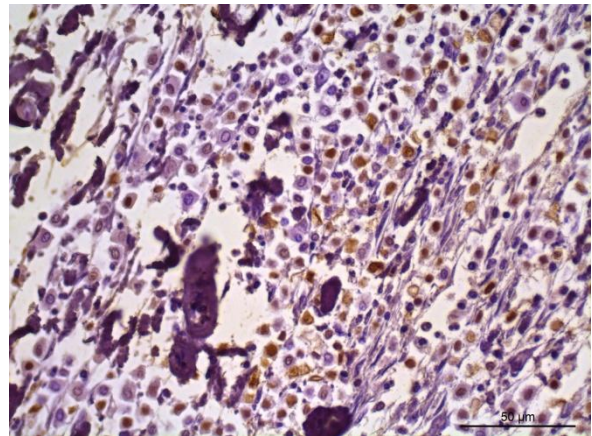
**Figura 22.** Mastocitoma GI. Reação positiva moderada (++) . Caso nº 1.



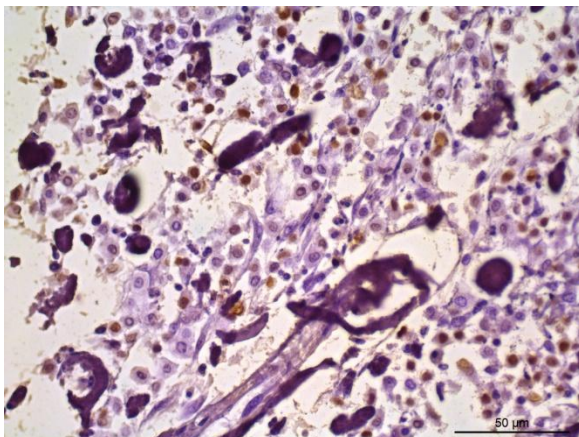
**Figura 23.** Mastocitoma GI. Reação positiva moderada (++) . Caso nº 1.



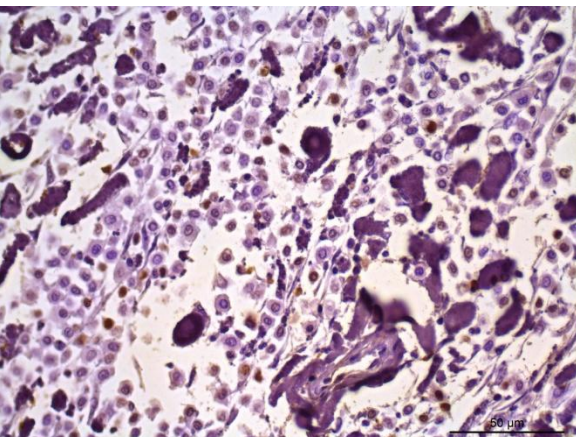
**Figura 24.** Mastocitoma GI. Reação positiva moderada (++) . Caso nº 1.



**Figura 25.** Mastocitoma GII. Reação positiva intensa (+++) . Caso nº 12.

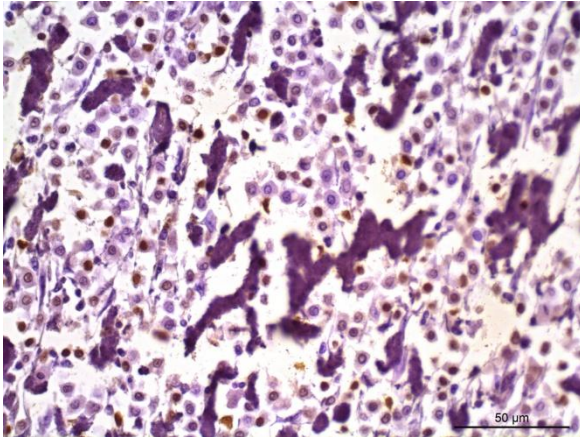


**Figura 26.** Mastocitoma GII. Reação positiva intensa (+++) . Caso nº 12.

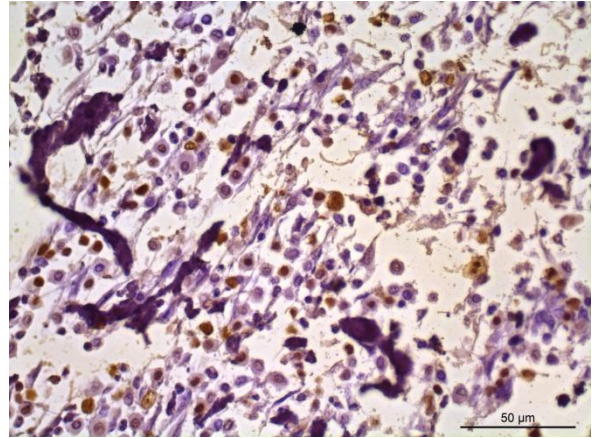


**Figura 27.** Mastocitoma GII. Reação positiva intensa (+++) . Caso nº 12.

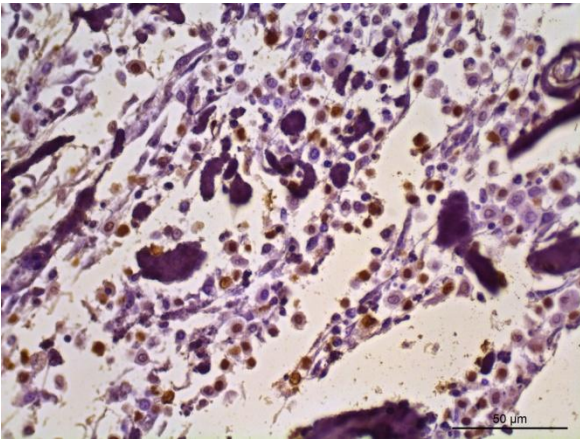




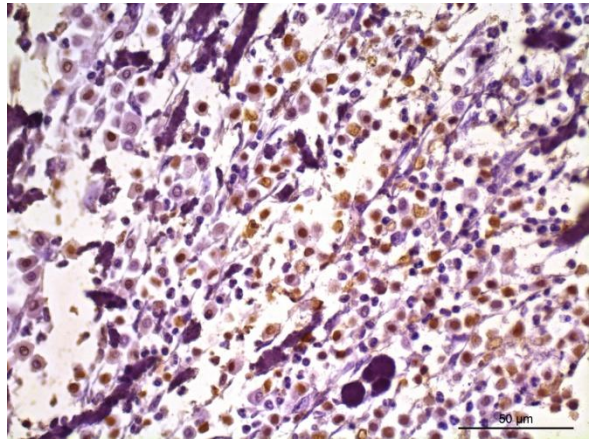
**Figura 28.** Mastocitoma GII. Reação positiva intensa (+++). Caso nº 12.



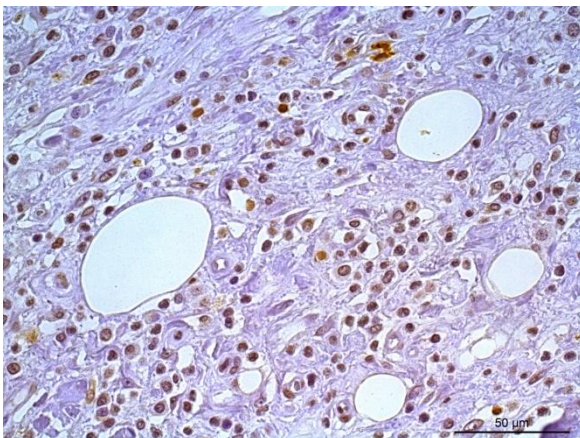
**Figura 29.** Mastocitoma GII. Reação positiva intensa (+++). Caso nº 12.



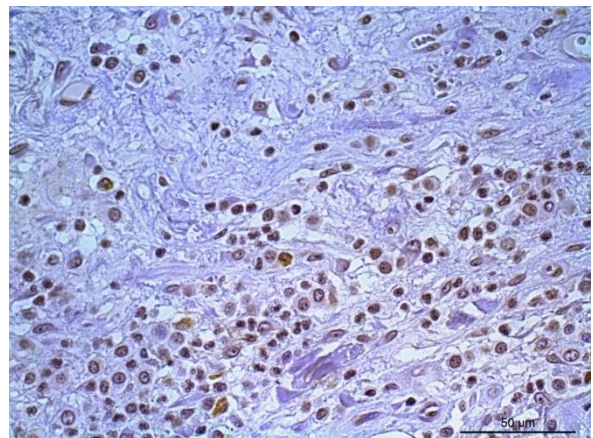
**Figura 30.** Mastocitoma GII. Reação positiva intensa (+++). Caso nº 12.



**Figura 31.** Mastocitoma GII. Reação positiva intensa (+++). Caso nº 12.

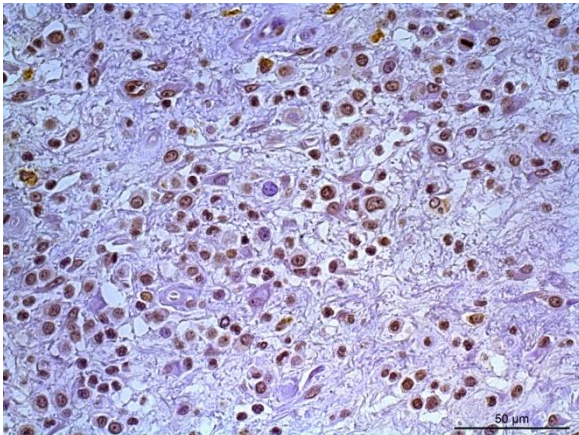


**Figura 32.** Mastocitoma GIII. Reação positiva muito intensa (++++). Caso nº 14.

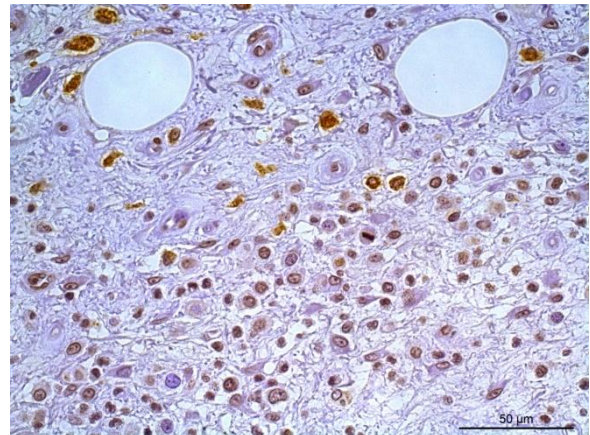


**Figura 33.** Mastocitoma GIII. Reação positiva muito intensa (++++). Caso nº 14.



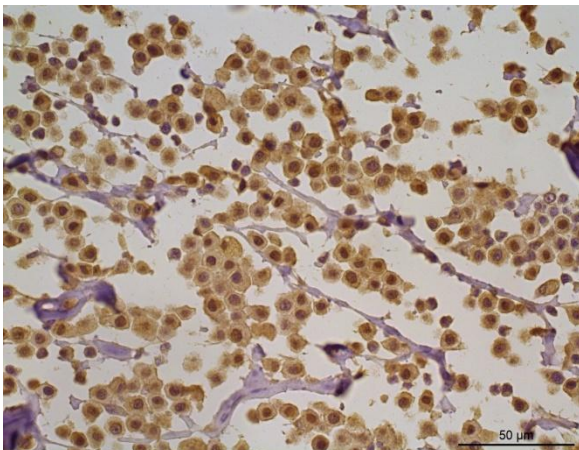


**Figura 34.** Mastocitoma GIII. Reação positiva muito intensa (++++). Caso nº 14.

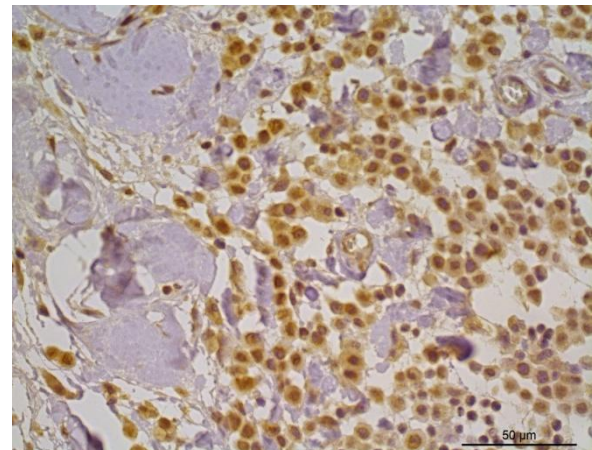


**Figura 35.** Mastocitoma GIII. Reação positiva muito intensa (++++). Caso nº 14.

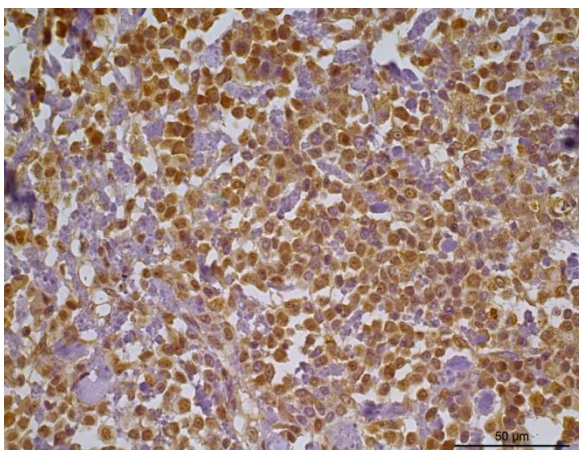
### 3.3.7.2. BAX



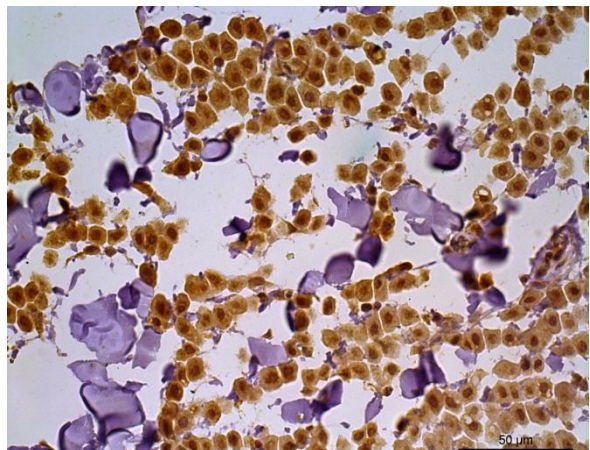
**Figura 36.** Mastocitoma GI. Reação positiva muito intensa (++++). Caso nº 2.



**Figura 37.** Mastocitoma GI. Reação positiva muito intensa (++++). Caso nº 3.

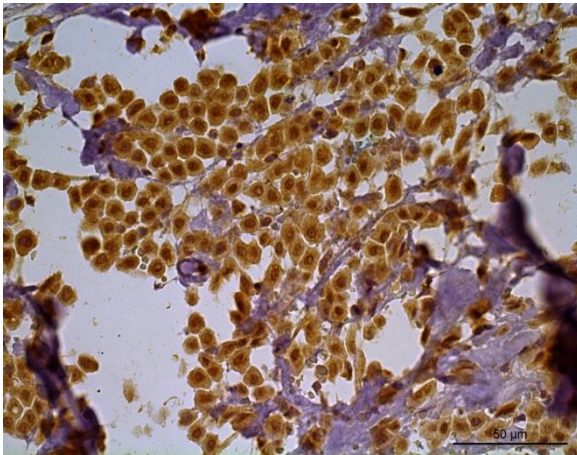


**Figura 38.** Mastocitoma GI. Reação positiva muito intensa (++++). Caso nº 4.

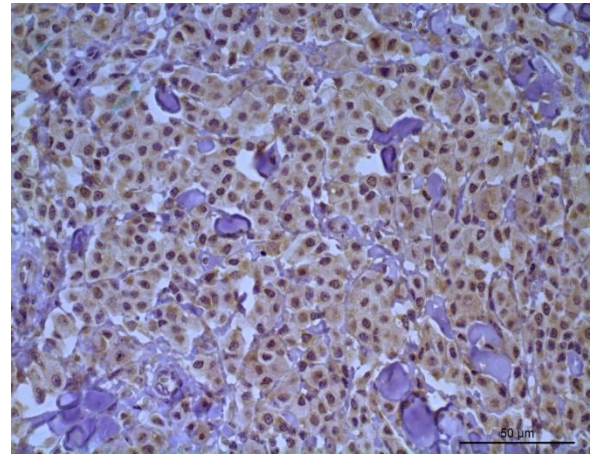


**Figura 39.** Mastocitoma GI. Reação positiva muito intensa (++++). Caso nº 5.

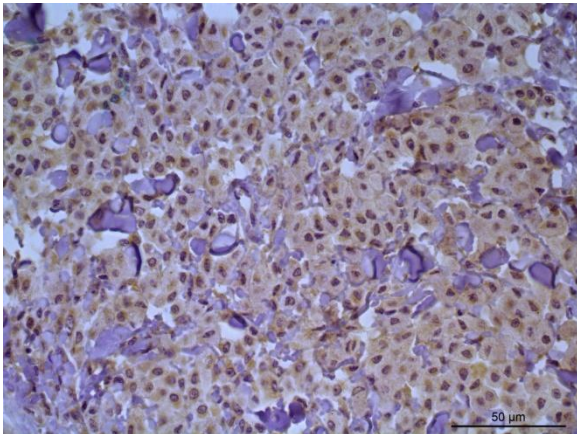




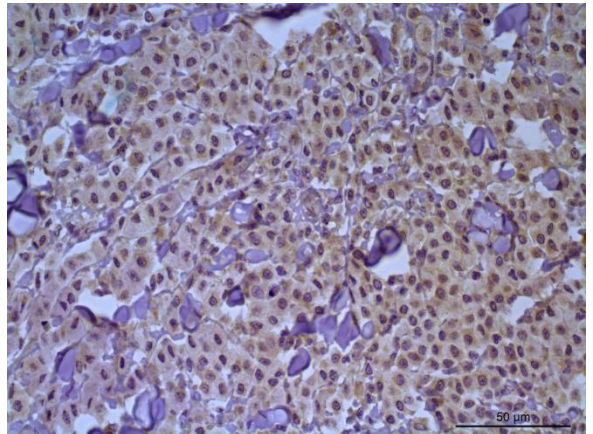
**Figura 40.** Mastocitoma GI. Reação positiva muito intensa (++++). Caso nº 5.



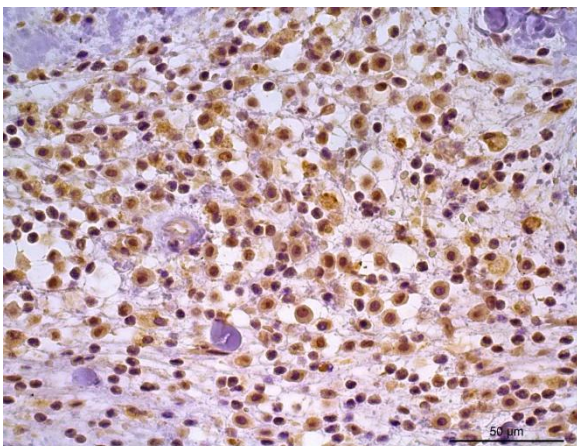
**Figura 41.** Mastocitoma GII. Reação positiva moderada (++) . Caso nº 8.



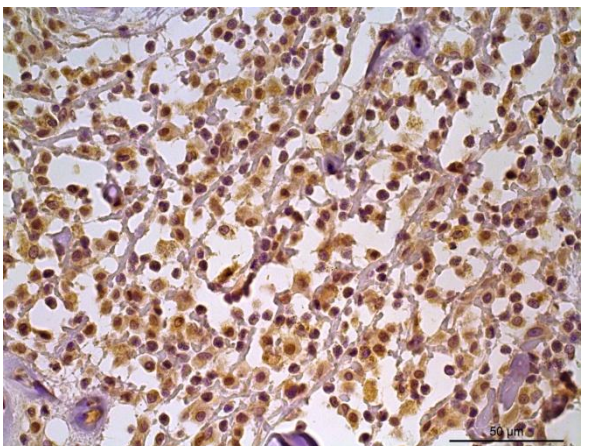
**Figura 42.** Mastocitoma GII. Reação positiva moderada (++) . Caso nº 8.



**Figura 43.** Mastocitoma GII. Reação positiva moderada (++) . Caso nº 8.

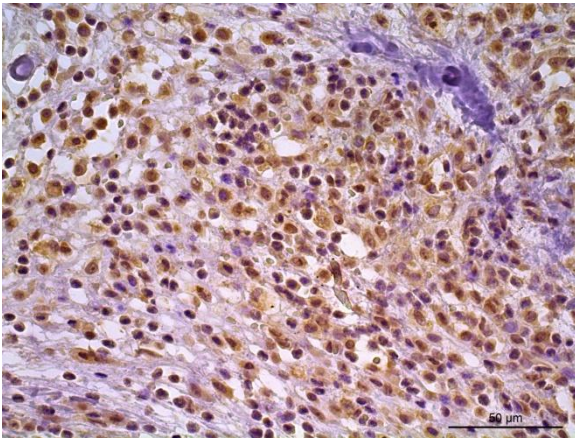


**Figura 44.** Mastocitoma GII. Reação positiva intensa (+++). Caso nº 9.

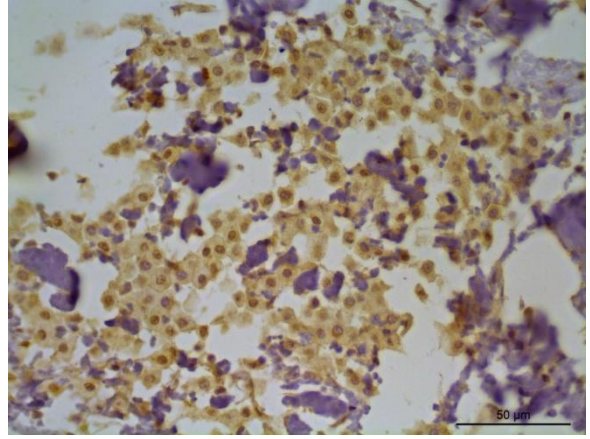


**Figura 45.** Mastocitoma GII. Reação positiva intensa (+++). Caso nº 9.

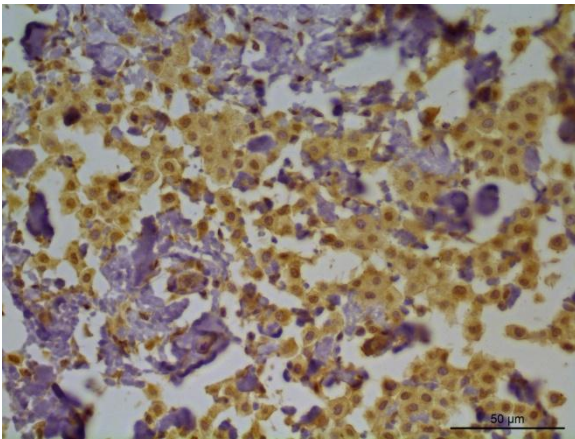




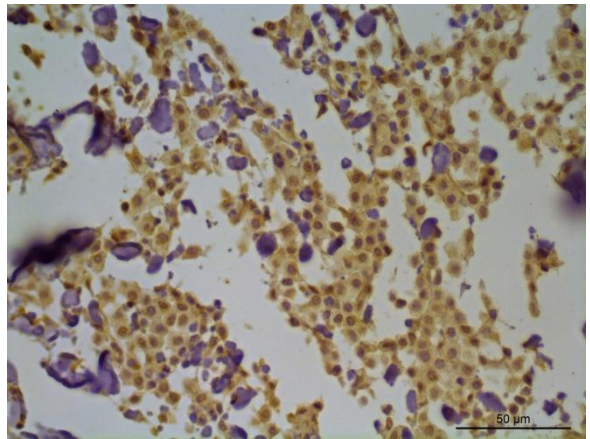
**Figura 46.** Mastocitoma GII. Reação positiva intensa (+++). Caso nº 9.



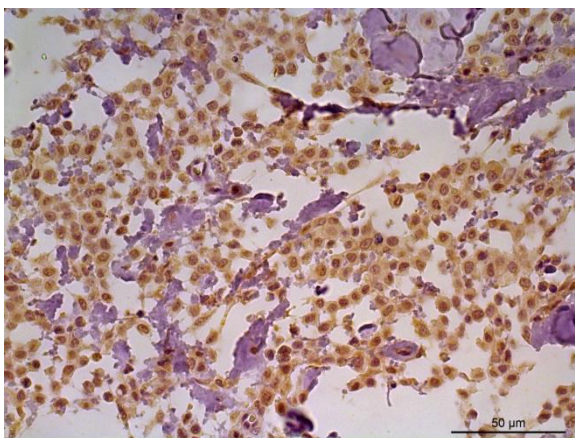
**Figura 47.** Mastocitoma GII. Reação positiva intensa (+++). Caso nº 10.



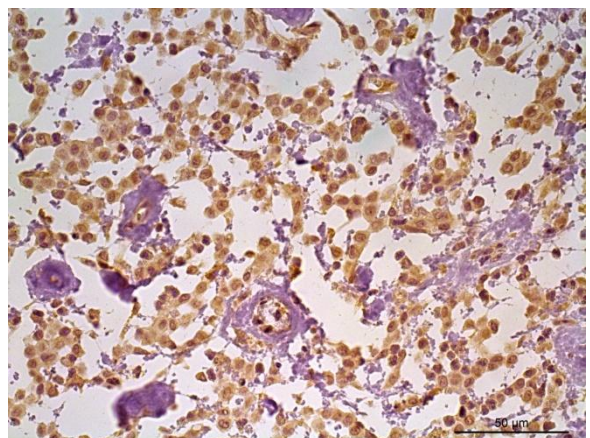
**Figura 48.** Mastocitoma GII. Reação positiva intensa (+++). Caso nº 10.



**Figura 49.** Mastocitoma GII. Reação positiva intensa (+++). Caso nº 10.

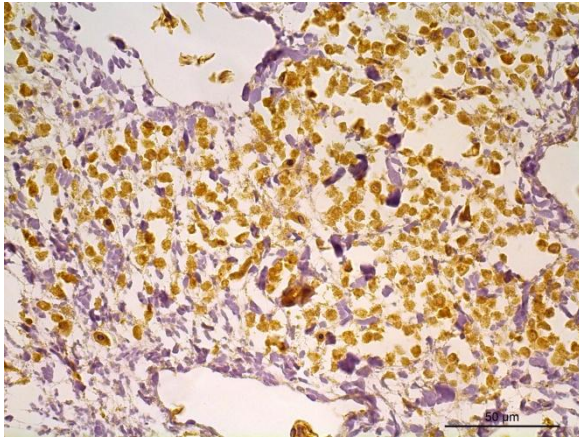


**Figura 50.** Mastocitoma GII. Reação positiva intensa (+++). Caso nº 11.

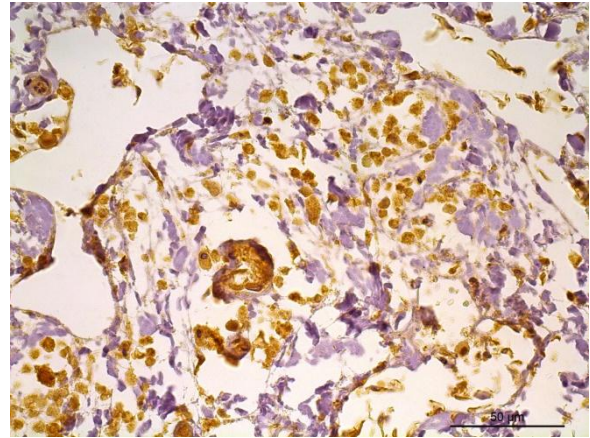


**Figura 51.** Mastocitoma GII. Reação positiva intensa (+++). Caso nº 11.

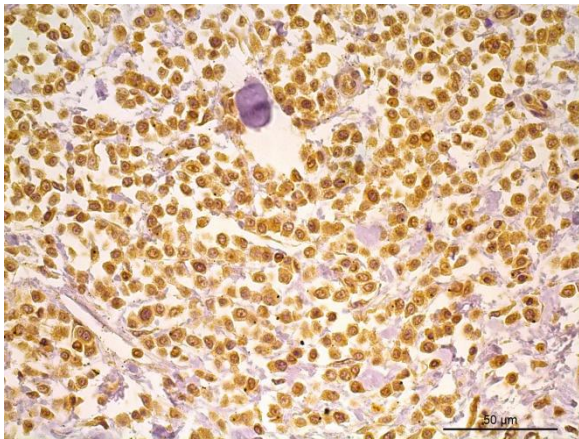




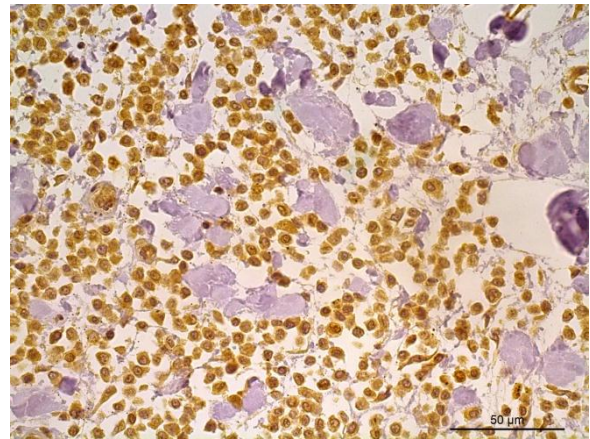
**Figura 52.** Mastocitoma GIII. Reação positiva muito intensa (++++). Caso nº 15.



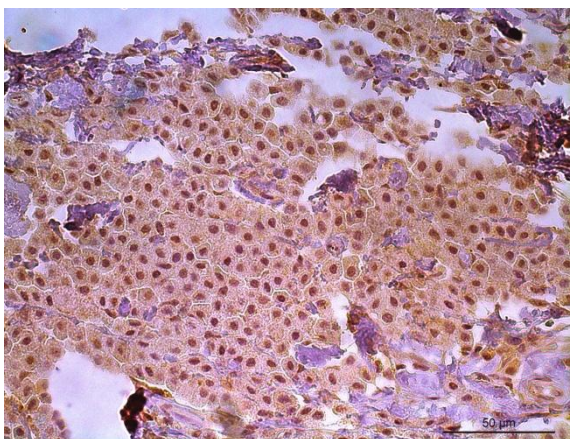
**Figura 53.** Mastocitoma GIII. Reação positiva muito intensa (++++). Caso nº 15.



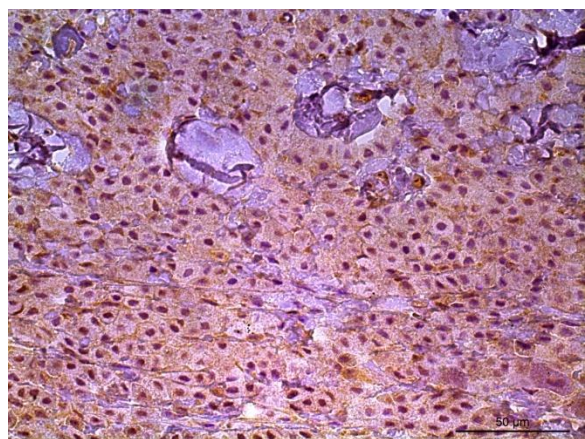
**Figura 54.** Mastocitoma GIII. Reação positiva muito intensa (++++). Caso nº 15.



**Figura 55.** Mastocitoma GIII. Reação positiva muito intensa (++++). Caso nº 15.

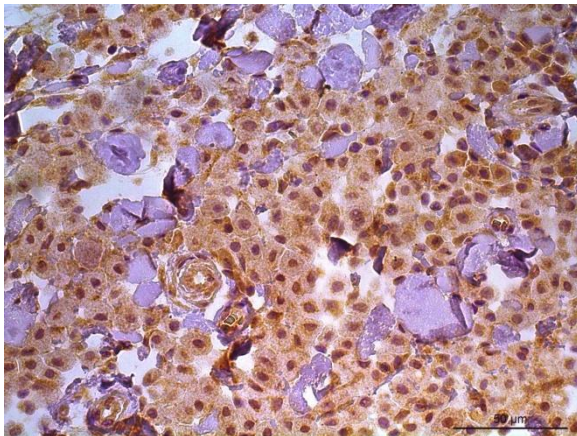


**Figura 56.** Mastocitoma GIII. Reação positiva intensa (+++). Caso nº 16.

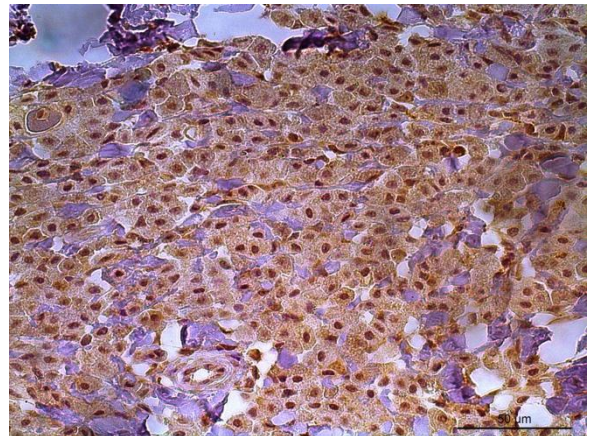


**Figura 57.** Mastocitoma GIII. Reação positiva intensa (+++). Caso nº 16.

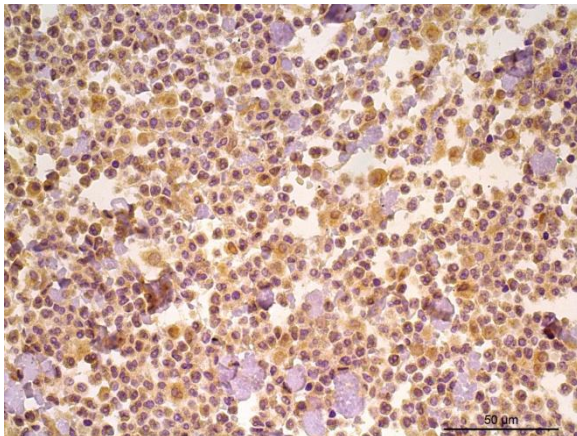




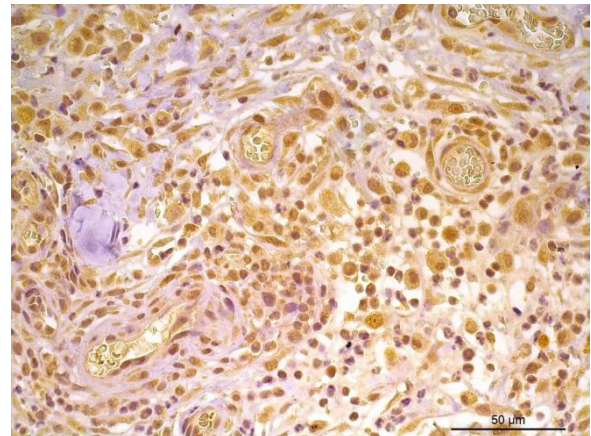
**Figura 58.** Mastocitoma GIII. Reação positiva intensa (+++). Caso nº 16.



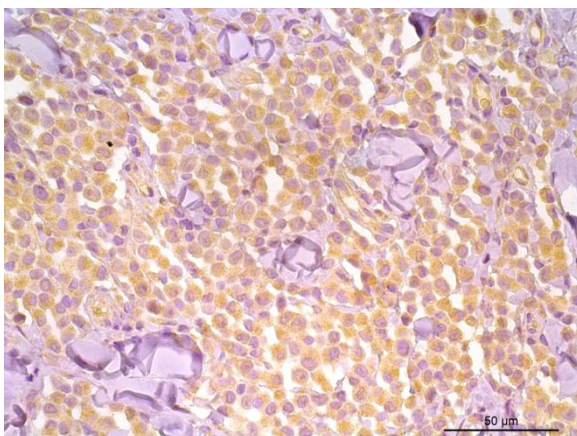
**Figura 59.** Mastocitoma GIII. Reação positiva intensa (+++). Caso nº 16.



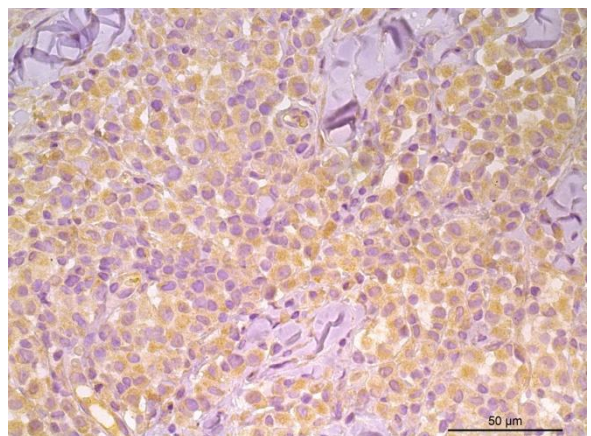
**Figura 60.** Mastocitoma GIII. Reação positiva moderada (++) . Caso nº 17.



**Figura 61.** Mastocitoma GIII. Reação positiva intensa (+++). Caso nº 18.



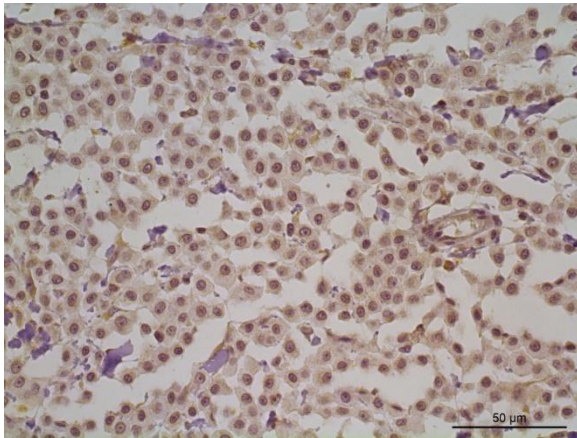
**Figura 62.** Mastocitoma GIII. Reação positiva intensa (+++). Caso nº 18.



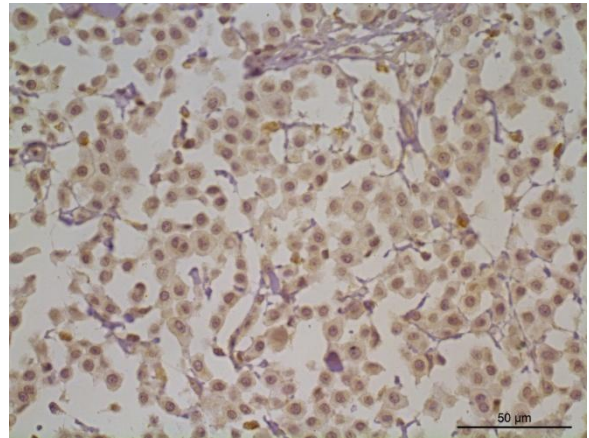
**Figura 63.** Mastocitoma GIII. Reação positiva intensa (+++). Caso nº 18.



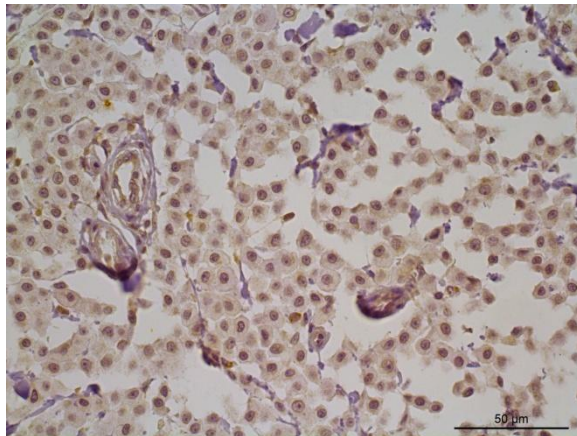
### 3.3.7.3. BCL-2



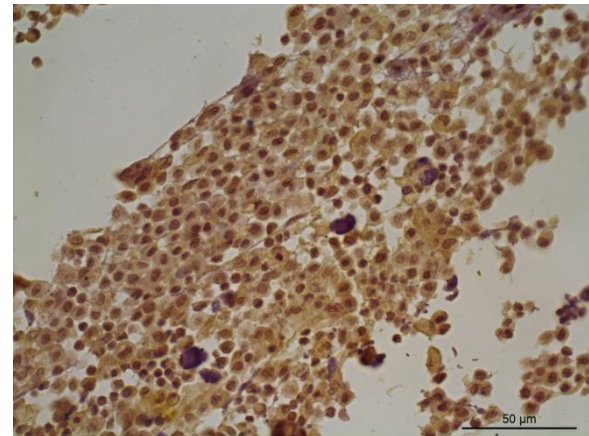
**Figura 64.** Mastocitoma GI. Reação positiva débil (+). Caso nº 2.



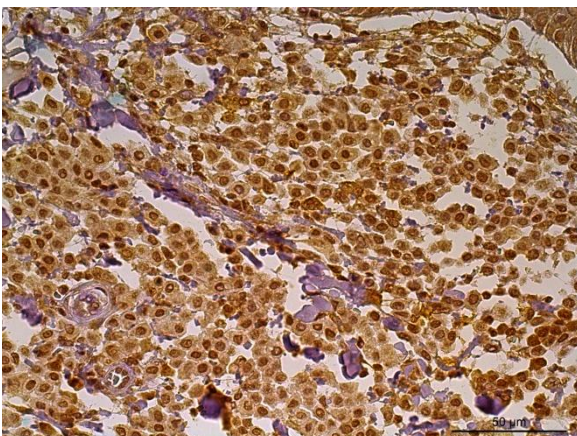
**Figura 65.** Mastocitoma GI. Reação positiva débil (+). Caso nº 2.



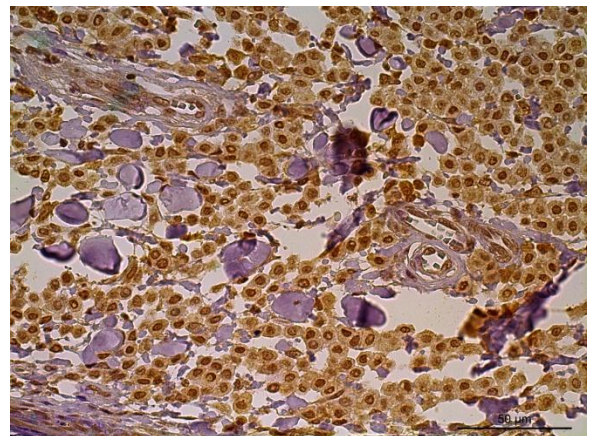
**Figura 66.** Mastocitoma GI. Reação positiva débil (+). Caso nº 2.



**Figura 67.** Mastocitoma. Reação positiva intensa (+++). Caso nº 3.

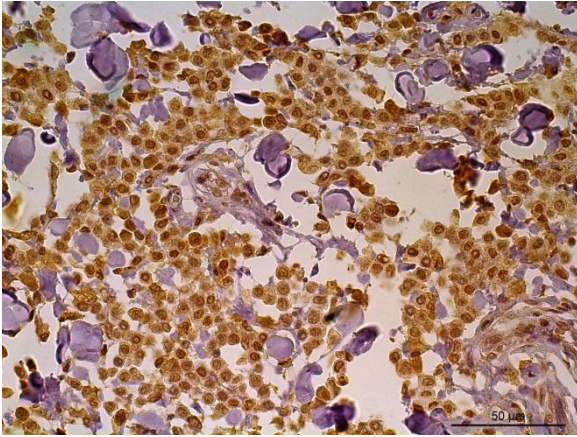


**Figura 68.** Mastocitoma GI. Reação positiva intensa (+++). Caso nº 4.

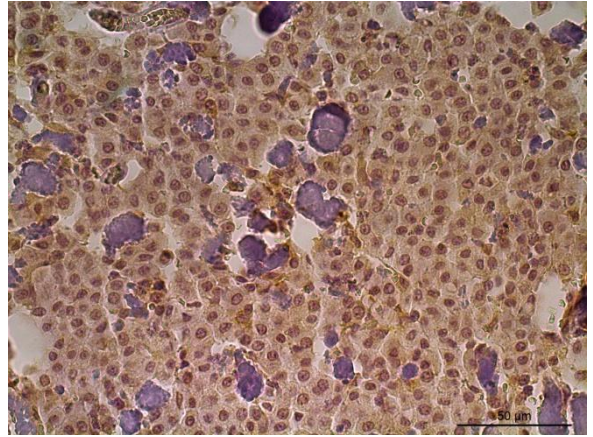


**Figura 69.** Mastocitoma GI. Reação positiva intensa (+++). Caso nº 4.

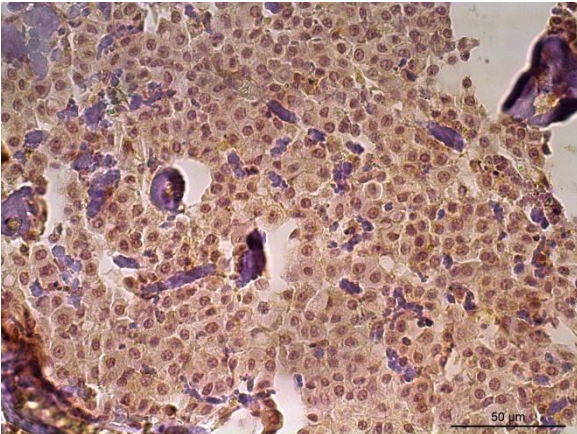




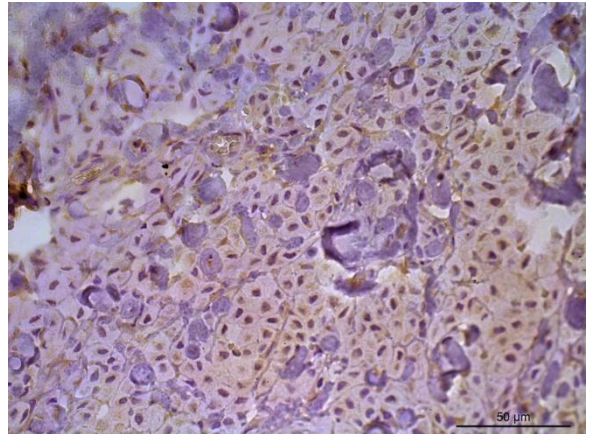
**Figura 70.** Mastocitoma GI. Reação positiva intensa (+++). Caso nº 4.



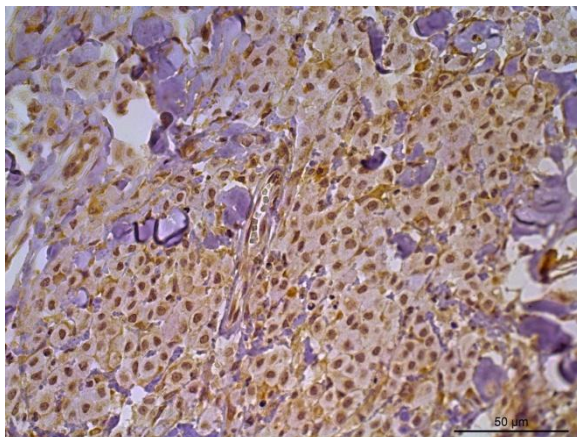
**Figura 71.** Mastocitoma GI. Reação positiva moderada (++) . Caso nº 5.



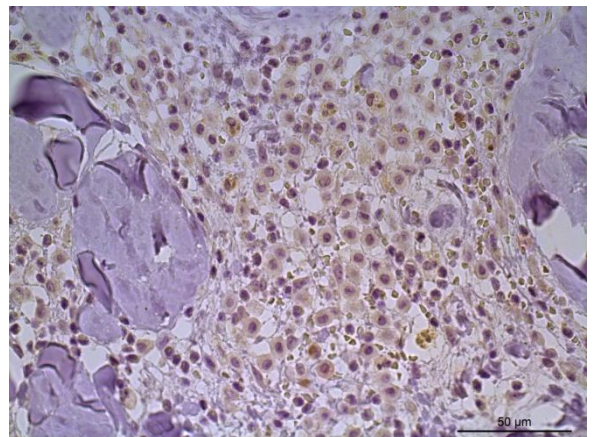
**Figura 72.** Mastocitoma GI. Reação positiva moderada (++) . Caso nº 5.



**Figura 73.** Mastocitoma GII. Reação positiva débil (+). Caso nº 8.

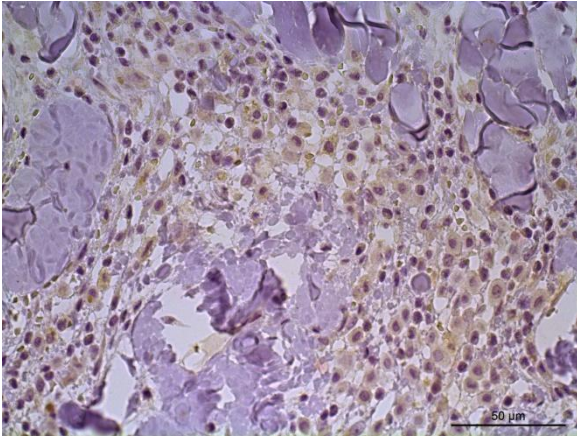


**Figura 74.** Mastocitoma GII. Reação positiva débil (+). Caso nº 8.

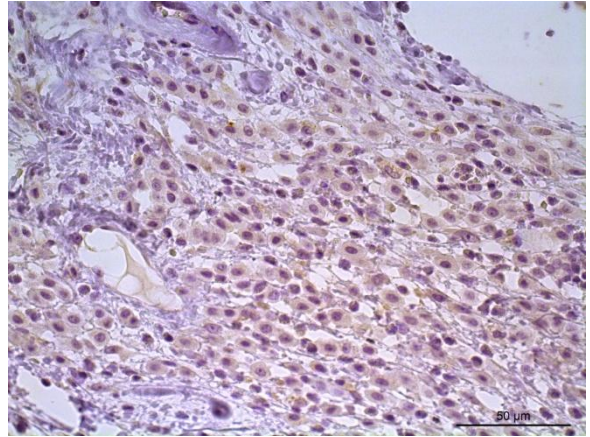


**Figura 75.** Mastocitoma GII. Reação positiva débil (+). Caso nº 9.

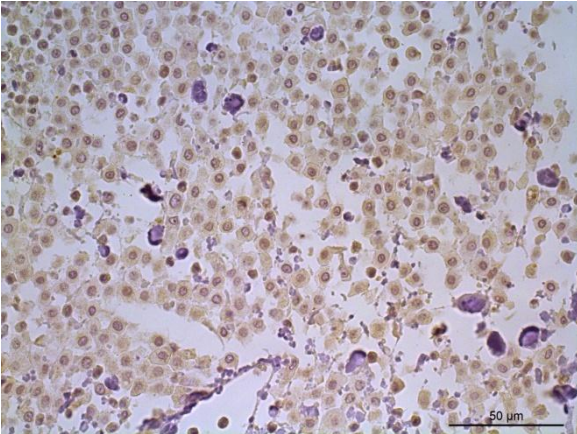




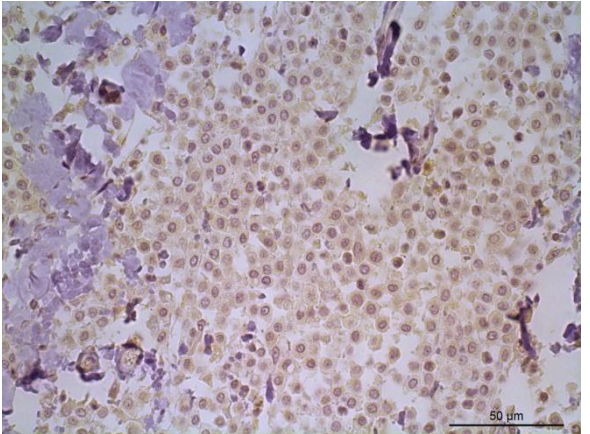
**Figura 76.** Mastocitoma GII. Reação positiva débil (+). Caso nº 9.



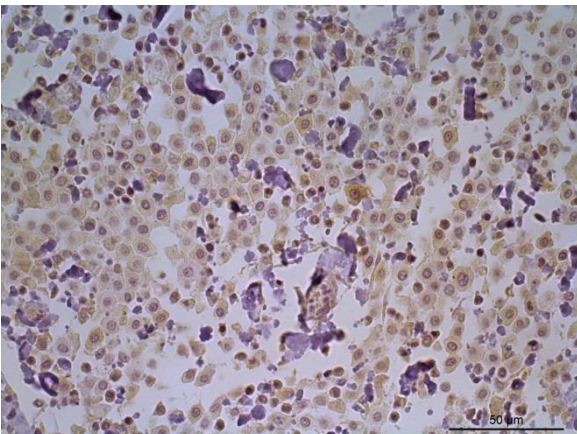
**Figura 77.** Mastocitoma GII. Reação positiva débil (+). Caso nº 9.



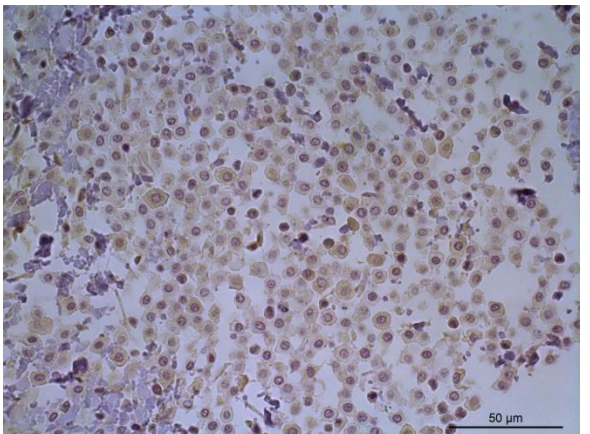
**Figura 78.** Mastocitoma GII. Reação positiva débil (+). Caso nº 10.



**Figura 79.** Mastocitoma GII. Reação positiva débil (+). Caso nº 10.

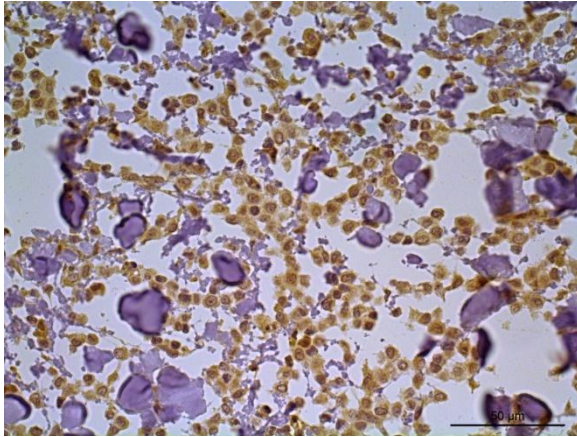


**Figura 80.** Mastocitoma GII. Reação positiva débil (+). Caso nº 10.

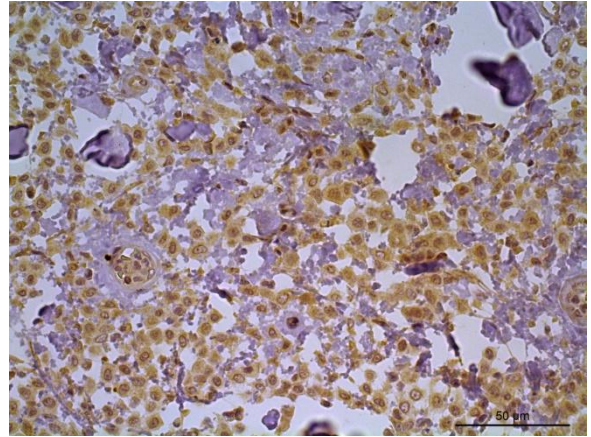


**Figura 81.** Mastocitoma GII. Reação positiva débil (+). Caso nº 10.

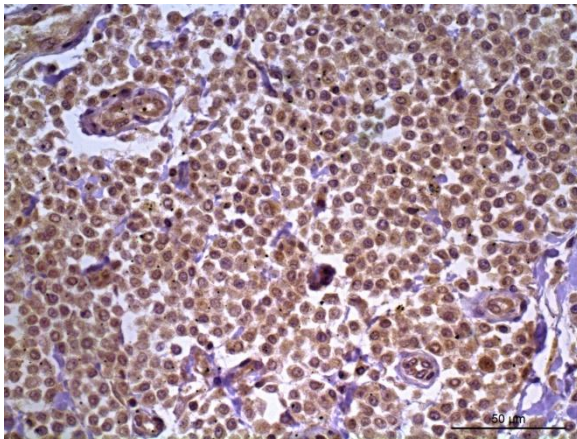




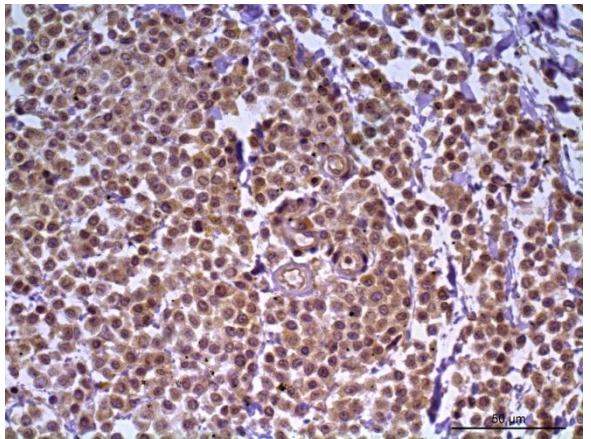
**Figura 82.** Mastocitoma GII. Reação positiva intensa (+++). Caso nº 11.



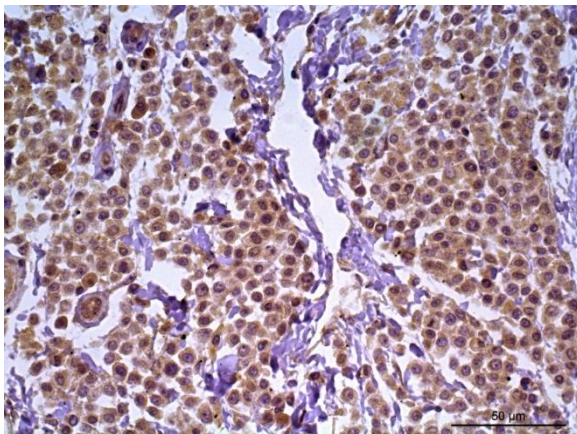
**Figura 83.** Mastocitoma GII Reação positiva intensa (+++). Caso nº 11.



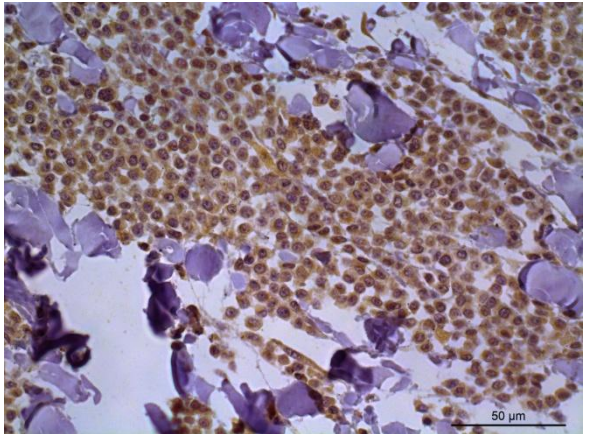
**Figura 84.** Mastocitoma GIII. Reação positiva intensa (+++). Caso nº 15.



**Figura 85.** Mastocitoma GIII. Reação positiva intensa (+++). Caso nº 15.

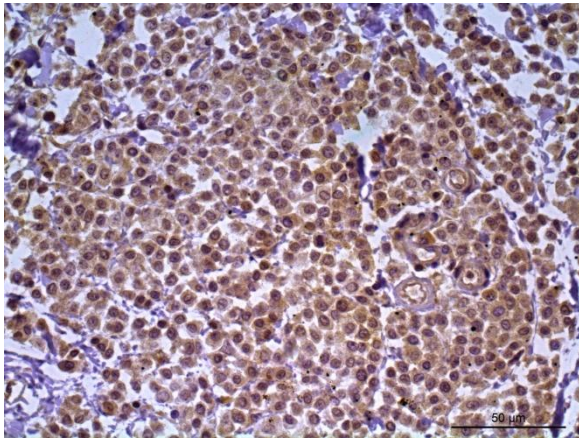


**Figura 86.** Mastocitoma GIII. Reação positiva intensa (+++). Caso nº 15.

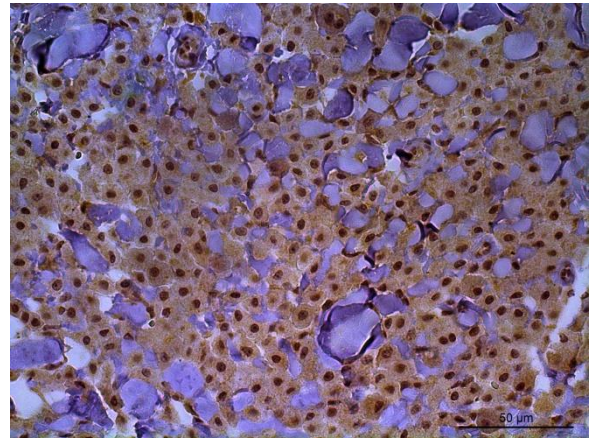


**Figura 87.** Mastocitoma GIII. Reação positiva intensa (+++). Caso nº 15.

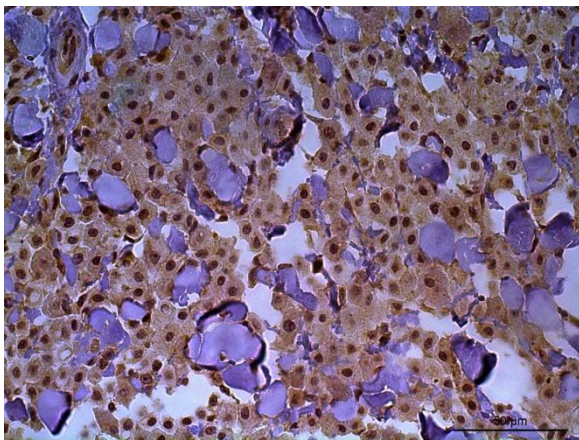




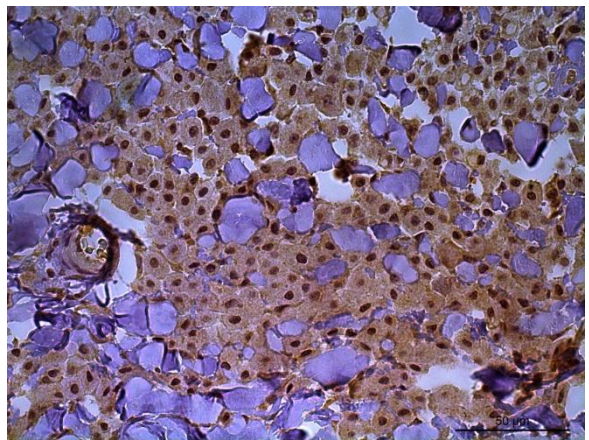
**Figura 88.** Mastocitoma GIII. Reação positiva intensa (+++). Caso nº 15.



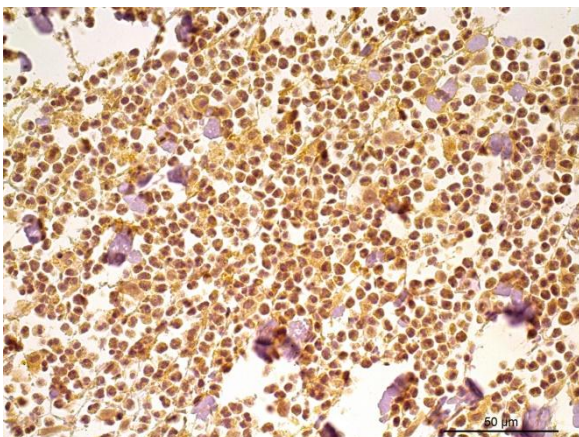
**Figura 89.** Mastocitoma GIII. Reação positiva intensa (+++). Caso nº 16.



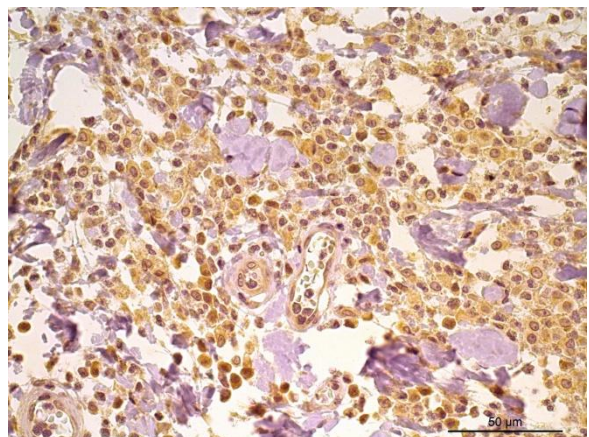
**Figura 90.** Mastocitoma GIII. Reação positiva intensa (+++). Caso nº 16.



**Figura 91.** Mastocitoma GIII. Reação positiva intensa (+++). Caso nº 16.

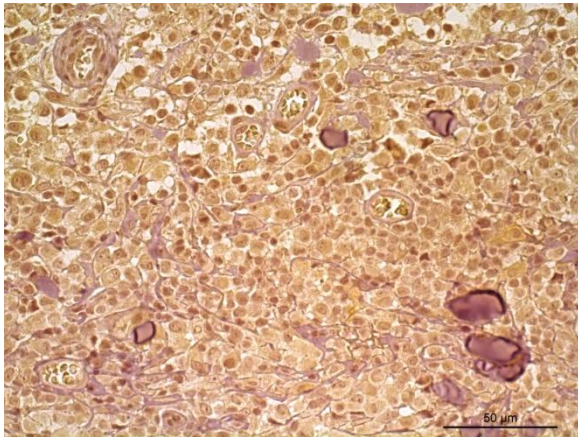


**Figura 92.** Mastocitoma GIII. Reação positiva intensa (+++). Caso nº 17.

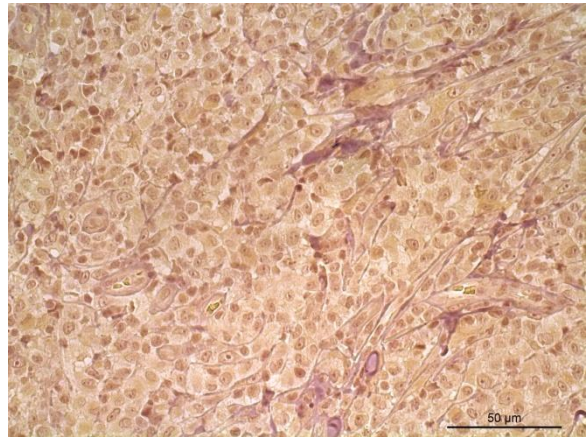


**Figura 93.** Mastocitoma GIII. Reação positiva intensa (+++). Caso nº 17.

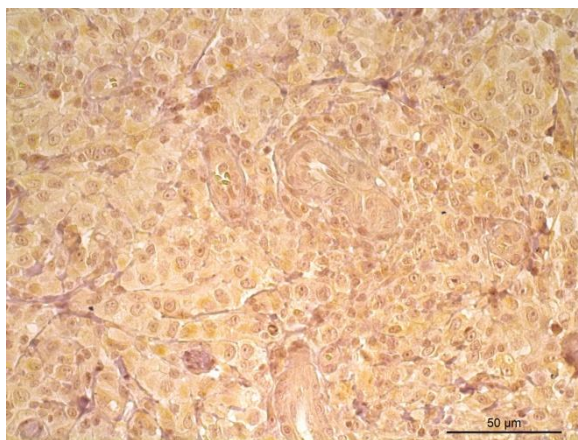




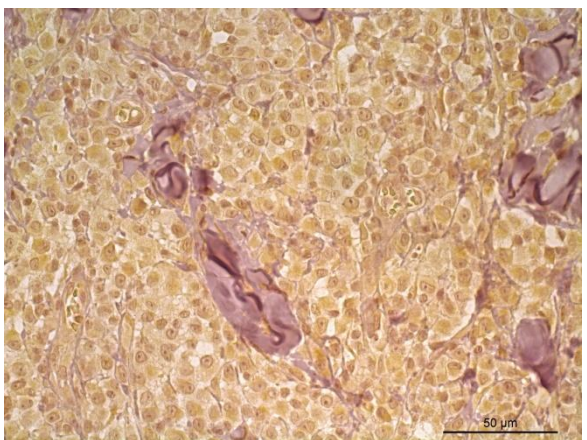
**Figura 94.** Mastocitoma GIII. Reação positiva débil (+). Caso nº 18.



**Figura 95.** Mastocitoma GIII. Reação positiva débil (+). Caso nº 18.

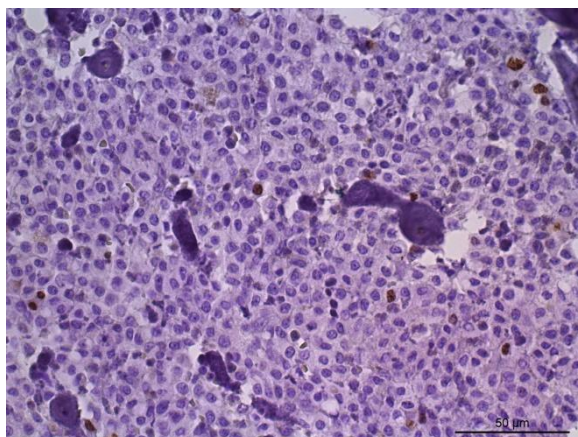


**Figura 96.** Mastocitoma GIII. Reação positiva débil (+). Caso nº 18.

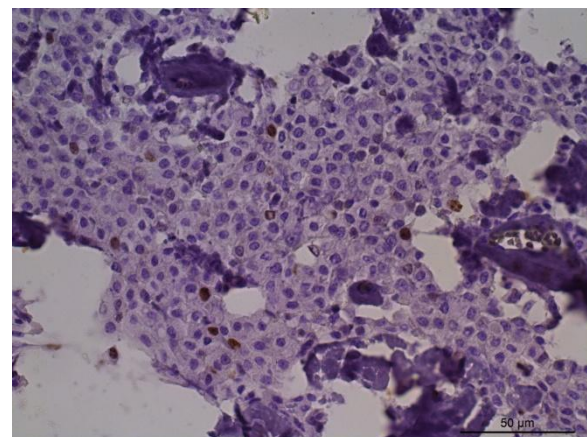


**Figura 97.** Mastocitoma GIII. Reação positiva débil (+). Caso nº 18.

#### 3.3.7.4. KI-67

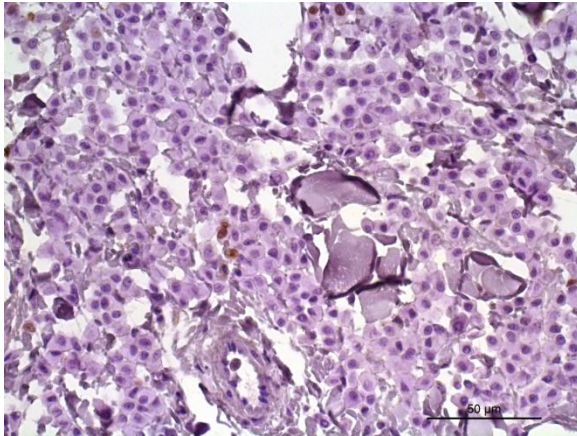


**Figura 98.** Mastocitoma Grau I. Reação positiva intensa (+++). Caso nº 5.

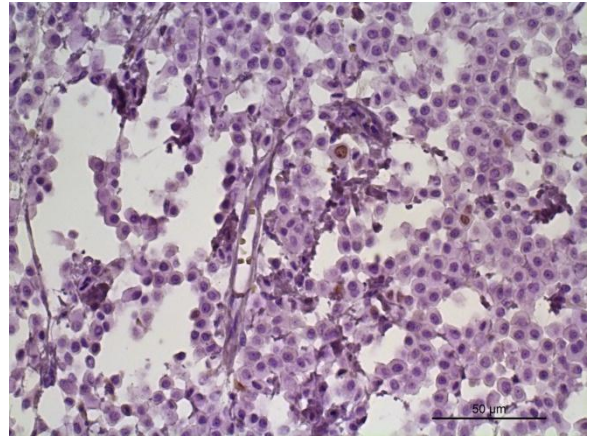


**Figura 99.** Mastocitoma GI. Reação positiva intensa (+++). Caso nº 5.

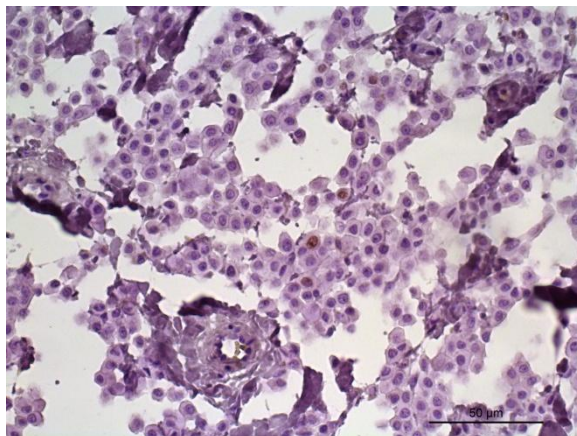




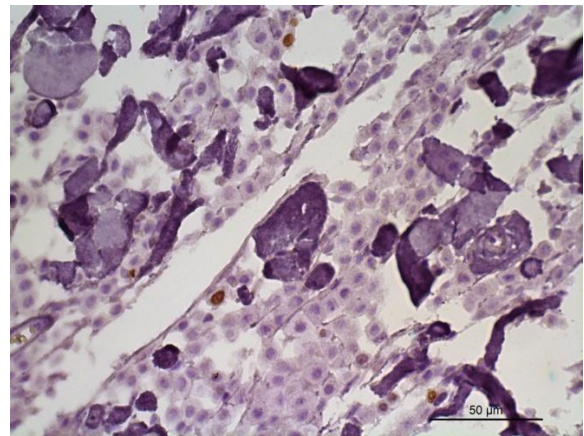
**Figura 100.** Mastocitoma GI. Reação positiva moderada (++) . Caso nº 6.



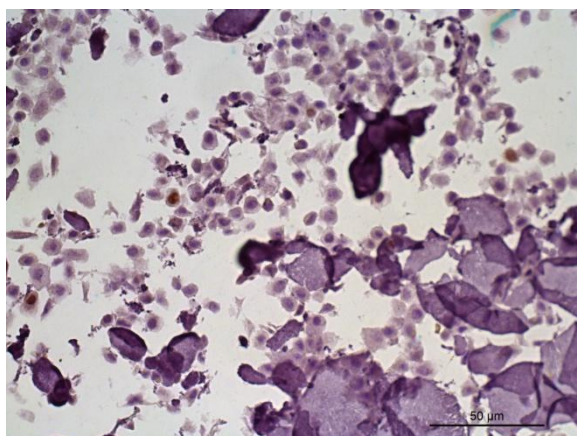
**Figura 101.** Mastocitoma GI. Reação positiva moderada (++) . Caso nº 6.



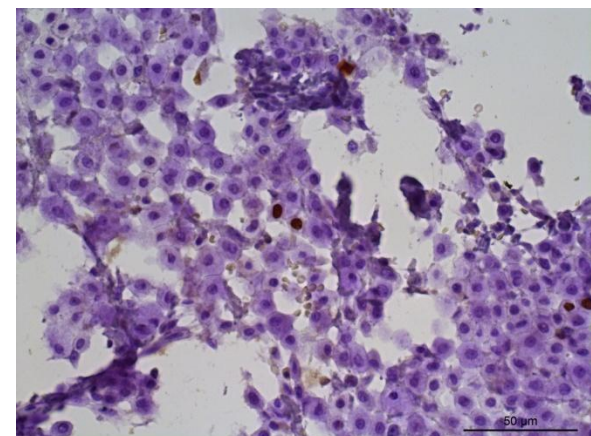
**Figura 102.** Mastocitoma GI. Reação positiva moderada (++) . Caso nº 6.



**Figura 103.** Mastocitoma GI. Reação positiva intensa (+++) . Caso nº 22.

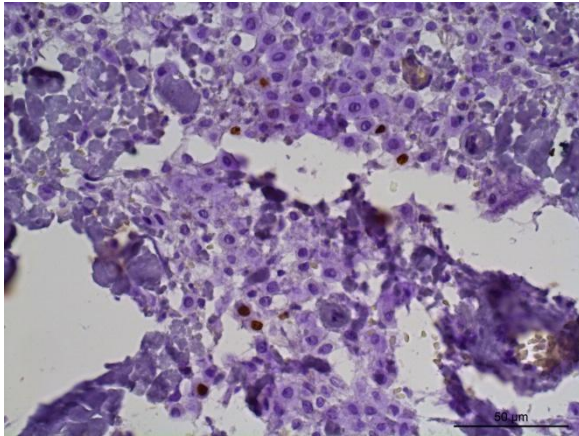


**Figura 104.** Mastocitoma GI. Reação positiva intensa (+++) . Caso nº 22.

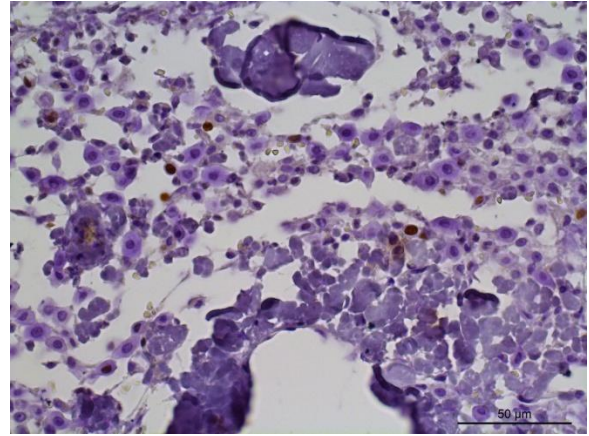


**Figura 105.** Mastocitoma GI. Reação positiva intensa (+++) . Caso nº 23.

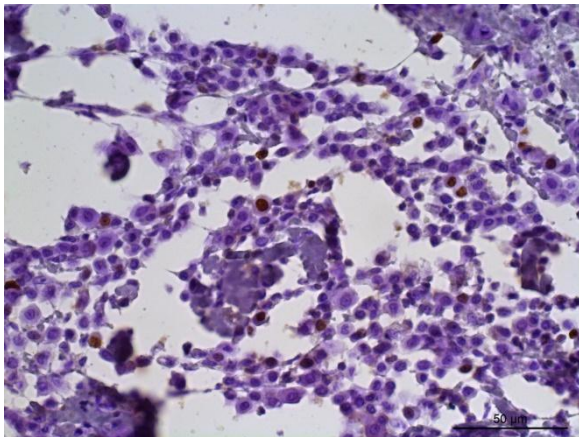




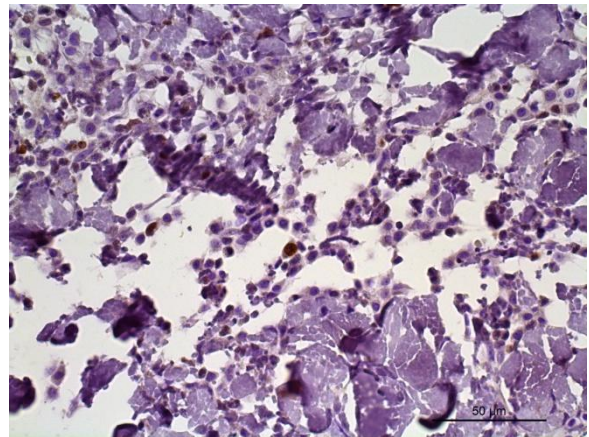
**Figura 106.** Mastocitoma GI. Reação positiva intensa (+++). Caso nº 23.



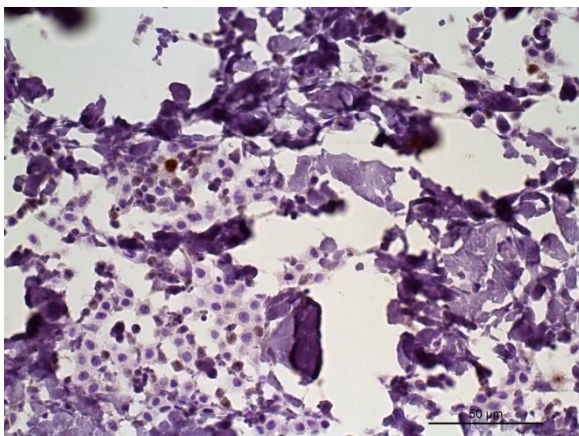
**Figura 107.** Mastocytoma GI. Reação positiva intensa (+++). Caso nº 23.



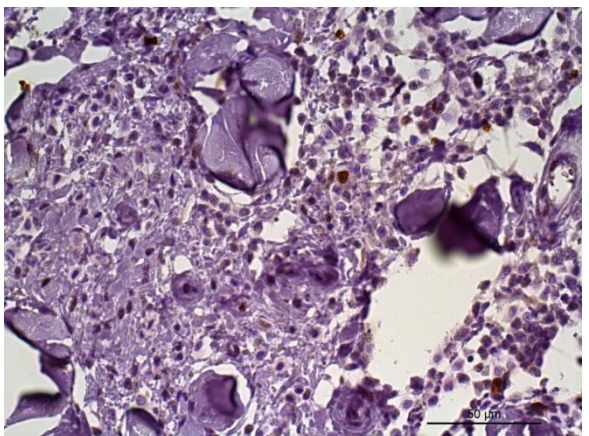
**Figura 108.** Mastocitoma GI. Reação positiva intensa (+++). Caso nº 23.



**Figura 109.** Mastocitoma GII. Reação positiva muito intensa (++++). Caso nº 7.

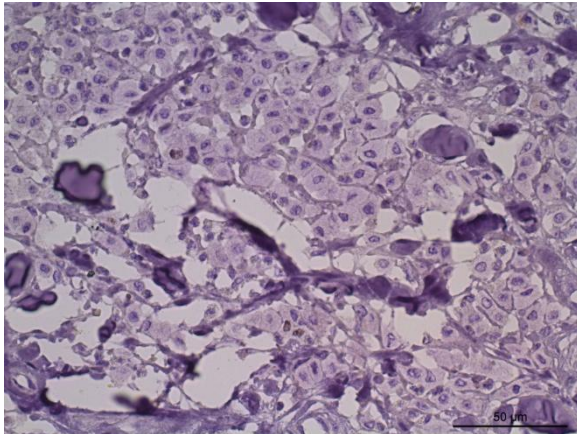


**Figura 110.** Mastocitoma GII. Reação positiva muito intensa (++++). Caso nº 7.

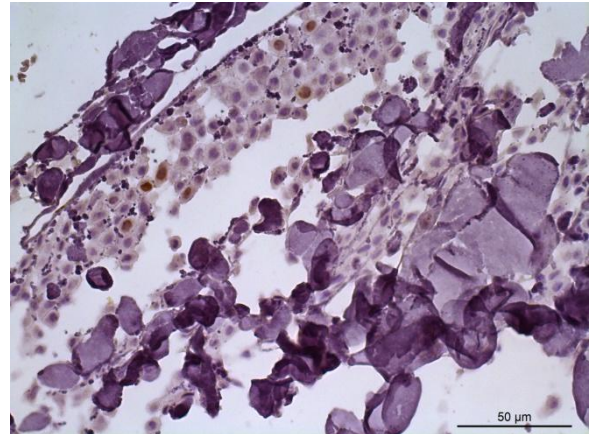


**Figura 111.** Mastocitoma GII. Reação positiva muito intensa (++++). Caso nº 7.

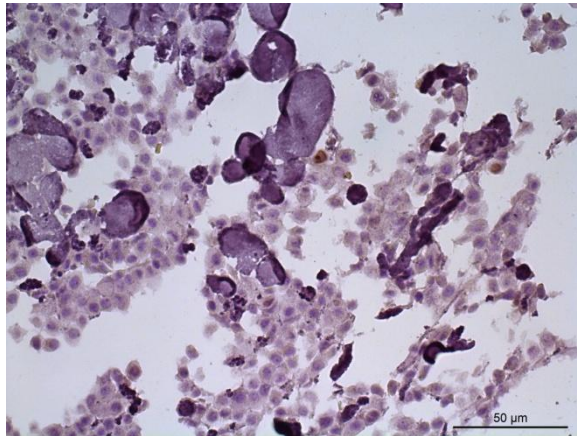




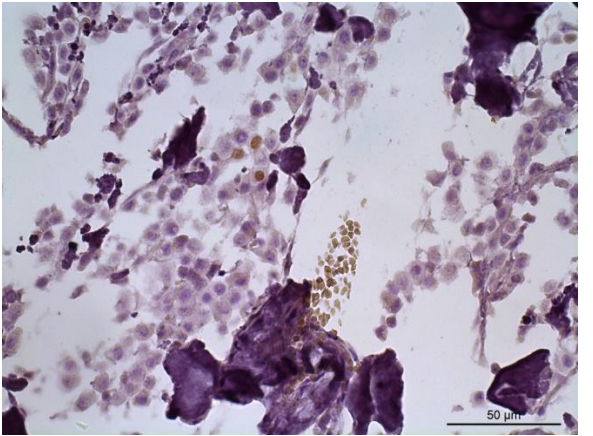
**Figura 112.** Mastocitoma GII. Reação positiva débil (+). Caso nº 9.



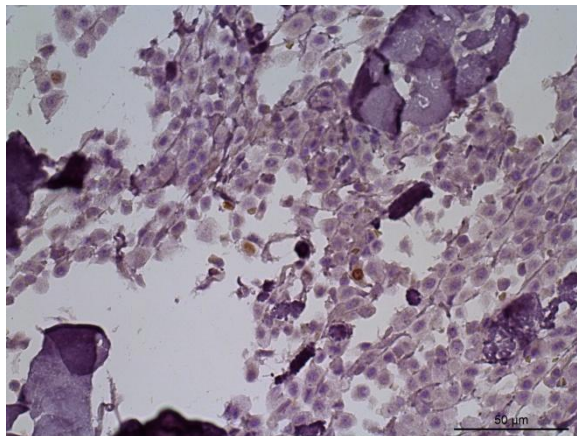
**Figura 113.** Mastocitoma GII. Reação positiva moderada (++) . Caso nº 12.



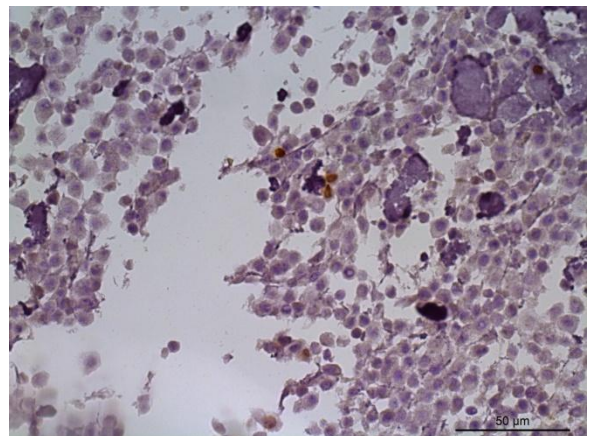
**Figura 114.** Mastocitoma GII. Reação positiva moderada (++) . Caso nº 12.



**Figura 115.** Mastocitoma GII. Reação positiva moderada (++) . Caso nº 12.

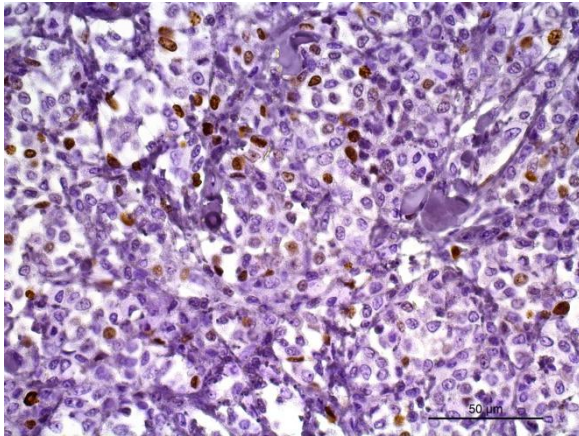


**Figura 116.** Mastocitoma GII. Reação positiva moderada (++) . Caso nº 12.

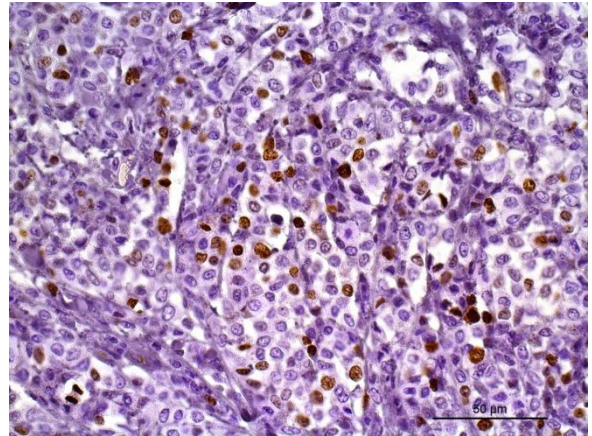


**Figura 117.** Mastocitoma GII. Reação positiva moderada (++) . Caso nº 12.

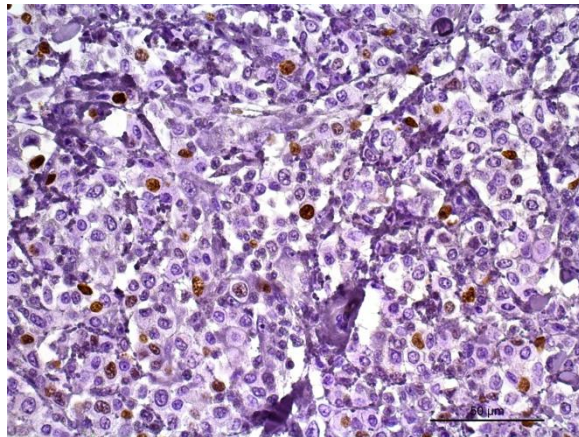




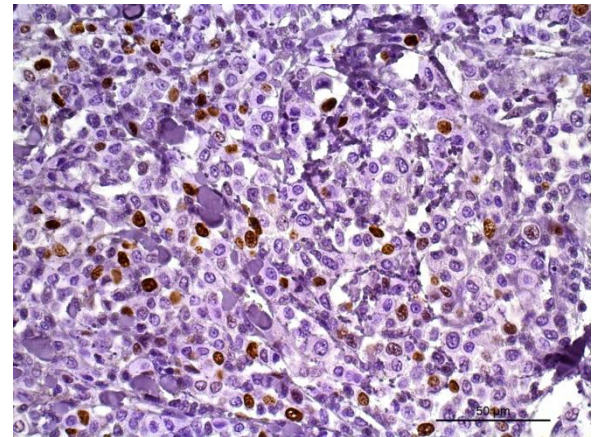
**Figura 118.** Mastocitoma GIII. Reação positiva muito intensa (++++). Caso nº 14.



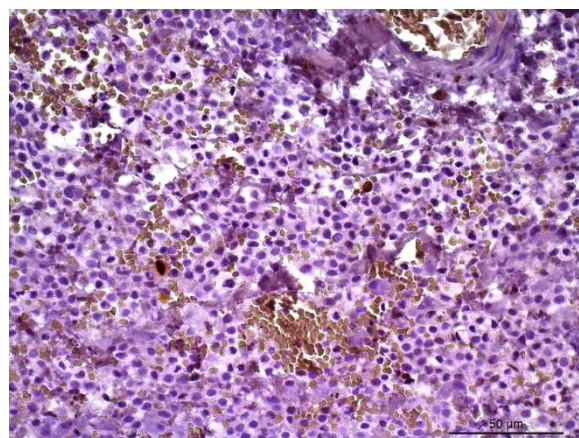
**Figura 119.** Mastocitoma GIII. Reação positiva muito intensa (++++). Caso nº 14.



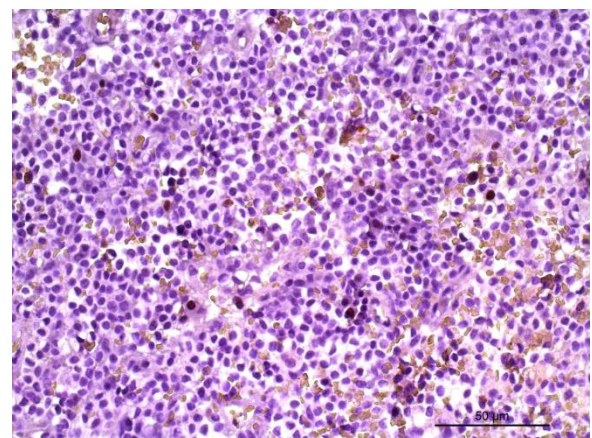
**Figura 120.** Mastocitoma GIII. Reação positiva muito intensa (++++). Caso nº 14.



**Figura 121.** Mastocitoma GIII. Reação positiva muito intensa (++++). Caso nº 14.

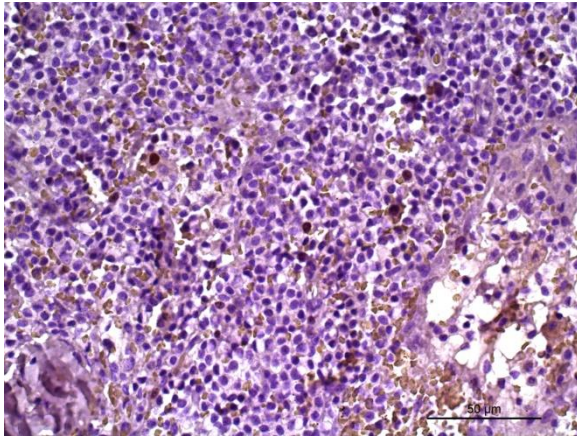


**Figura 122.** Mastocitoma GIII. Reação positiva muito intensa (++++). Caso nº 19.

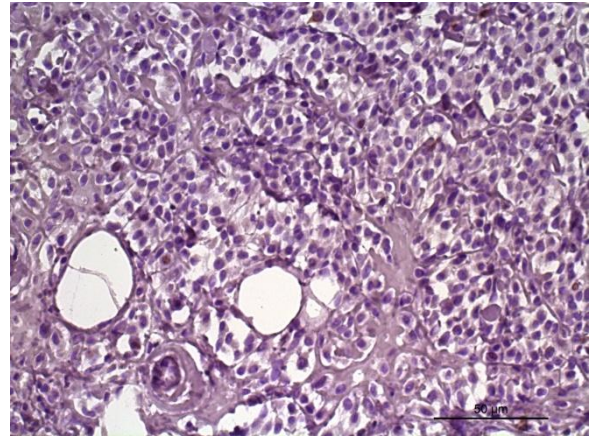


**Figura 123.** Mastocitoma GIII. Reação positiva muito intensa (++++). Caso nº 19.

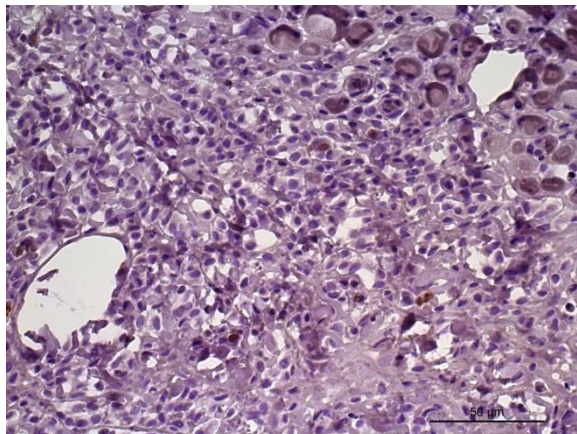




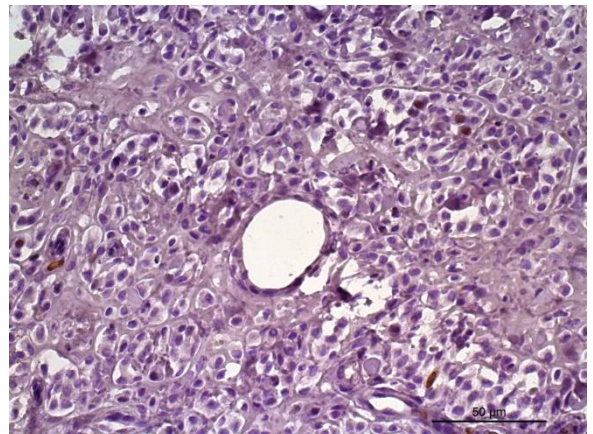
**Figura 124.** Mastocitoma GIII. Reação positiva muito intensa (++++). Caso nº 19.



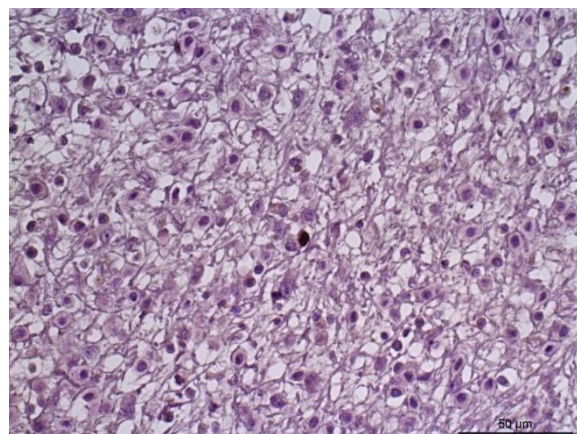
**Figura 125.** Mastocytoma GIII. Reação positiva moderada (++) . Caso nº 20.



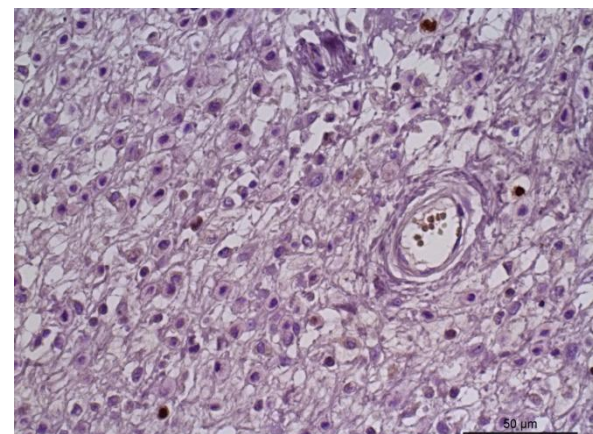
**Figura 126.** Mastocitoma GIII. Reação positiva moderada (++) . Caso nº 20.



**Figura 127.** Mastocitoma GIII. Reação positiva moderada (++) . Caso nº 20.

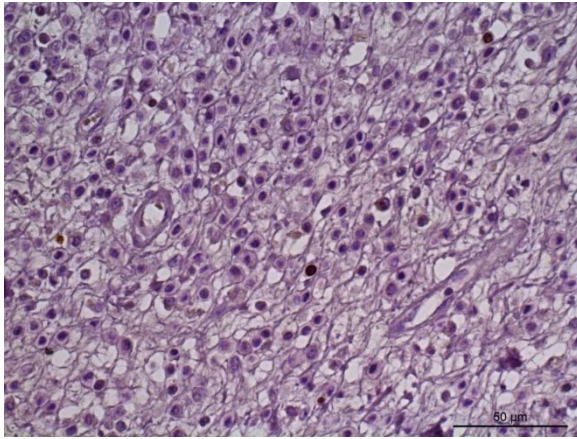


**Figura 128.** Mastocitoma GIII. Reação positiva muito intensa (++++). Caso nº 21.

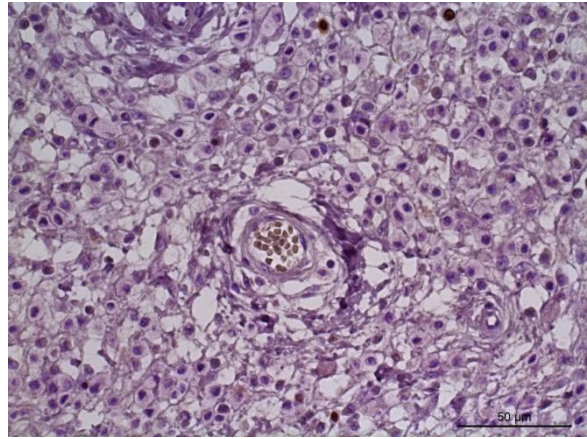


**Figura 129.** Mastocitoma GIII. Reação positiva muito intensa (++++). Caso nº 21.





**Figura 130.** Mastocitoma GIII. Reação positiva muito intensa (++++). Caso nº 21.



**Figura 131.** Mastocitoma GIII. Reação positiva muito intensa (++++). Caso nº 21.

### 3.4. DISCUSSÃO

A apoptose é um mecanismo natural que, em conjunto com a mitose, permite a renovação dos tecidos do organismo. Contudo, encontram-se alterações neste ciclo devido ao aumento ou supressão do mesmo que pode levar ao desenvolvimento neoplásico (Elmore, 2007).

A gênese e progressão tumoral não estão relacionadas apenas com a proliferação celular mas também com a perda do controlo do crescimento, bem como com as características biológicas das neoplasias (Sun *et al.*, 2002; Porichi *et al.* 2009).

O mastocitoma é uma das neoplasias mais comuns em canídeos que merece atenção devido à sua frequência. Presentemente, o método mais utilizado para obter um prognóstico nesta neoplasia é a gradação histológica. Contudo, devido à subjetividade deste critério e dos observadores esta avaliação poderá não ser tão precisa.

Durante o estudo um dos maiores obstáculos encontrados foi o fato do mastocitoma ser uma neoplasia constituída por tecidos friáveis e sem estroma, o que lhe confere pouca consistência. Sendo estes tecidos tão frágeis, a implementação da técnica de imunohistoquímica foi, por vezes, problemática levando a algumas repetições de testes, exigindo mais tempo de secagem das amostras na estufa, de modo a permitir uma melhor

aderência às lâminas. Contudo, e apesar de repetições, alguns tecidos ficaram algo destruídos o que tornou a avaliação mais difícil.

#### 3.4.1. CASUÍSTICA

A média das idades referentes aos casos estudados foi de 9 anos, o que está de acordo com toda bibliografia consultada que afirma que esta média se encontra entre os 8 e os 9 anos.

A raça com maior prevalência de mastocitoma foi o Boxer, com 9 (39,13%) indivíduos, tendo sido a segunda raça com maior ocorrência de mastocitoma o Labrador Retriever e em terceiro lugar encontram-se as raças indeterminadas. Estes resultados encontram-se de acordo com Gross *et al.* (2005), Scott *et al.* (2001) e Withrow & Vail (2007) que referem o Boxer e o Labrador Retriever como sendo duas das raças mais predisponentes para o mastocitoma. Também se encontra em concordância com Withrow & Vail (2007) o resultado em relação às raças indeterminadas, dado que referem que a maioria dos mastocitomas ocorre em cães de raça mista.

Apesar da bibliografia consultada referir que não existe predisposição quanto ao género, no presente estudo verificou-se uma predisposição dos machos (65,22%).

Os membros foram o local de maior incidência, seguidos pelo tronco e por último a cabeça. A ocorrência de mastocitoma na cabeça está de acordo com a bibliografia consultada, que refere ser esta a localização que de menor predominância para mastocitoma. Porém, o mesmo não acontece os membros, já que são o segundo local mais afetado (Withrow & Vail, 2007).

#### 3.4.2. TUNEL

A positividade mostrou-se crescente na graduação histológica relativamente aos H-scores e índices apoptóticos. Visto não se ter

encontrado estudos anteriores relativamente ao estudo desta técnica em mastocitomas ou relativamente à sua marcação considerando os graus histológicos de diferentes neoplasias, a sua avaliação torna-se difícil por falta de comparação.

Não se encontraram resultados de TUNEL em mastocitoma canino descritos na bibliografia. Contudo, num estudo para verificar se a apoptose seria um bom marcador de prognóstico em tumores mamários caninos, os autores determinaram que, quanto mais elevado fosse o número de células apoptóticas pior era o prognóstico (Pereira *et al.* 2003). O que iria de encontro com os resultados do presente trabalho, já que os mastocitomas de grau III são considerados mais agressivos que os dos restantes graus e foram estes que apresentaram um maior índice apoptótico.

Como nesta técnica só foi positiva uma amostra por cada grau não foi possível estabelecer uma tendência fidedigna. Seria necessária a realização de mais testes para verificar se os resultados aqui expostos podem ser considerados fiéis.

O método de TUNEL é uma técnica sensível que, por vezes, apresenta marcação inespecífica. Nas restantes amostras testadas as células neoplásicas foram negativas e havia presença de marcação de fundo, a qual pode ser devida ao fato da enzima deoxinucleotidil transferase reconhecer todos os grupos terminais 3' – OH, resultando em reações inespecíficas (Garcia, 2013), constituindo uma desvantagem à análise desta reação.

### 3.4.3. BAX

Apesar de já se ter referido que a localização de Bax é citoplasmática ou fracamente associada à membrana mitocondrial esta também se pode encontrar no núcleo durante a interfase (Hoetelmans *et al.*, 2000), daí ter sido observada esta marcação nas amostras.

O resultado do score final para o método de Bax demonstrou que todos os mastocitomas testados revelaram expressão de Bax, tal como sucedeu com Strefezzi (2007) e Strefezzi *et al.* (2012). Porém, os scores

deste estudo revelaram expressão High Bax, com a exceção de um dos mastocitomas de grau II, ao contrário de Strefezzi (2007) que obteve uma maior dispersão de resultados entre os scores High e Low, sugerindo que variações na deteção imunohistoquímica de Bax não estão relacionadas com maior agressividade dos mastocitomas caninos.

O resultado da média dos H-scores e dos índices apoptóticos foram mais elevados no grau I em comparação com o grau III. O grau II apresentou o valor mais baixo. Por outro lado Faria *et al.* (2006) obtiveram resultados relativamente constantes entre as médias do H-score dos graus I e IV de astrocitomas humanos, uma grande redução nos tumores de grau II e um aumento no grau III, e índices apoptóticos semelhantes nos diferentes graus, com uma diminuição no grau II, levando a concluir que a sobreexpressão desta proteína pode estar relacionada com a carcinogénese dos astrocitomas, já que este fenómeno é mais frequente conforme a malignidade desta neoplasia.

A redução dos valores de H-score e IA no grau II poderá dever-se ao fato de que certas particularidades referentes à histogénese deste grau possam provocar variações na expressão de moléculas relacionadas com a apoptose (Faria *et al.*, 2006). Neste grau tumoral encontram-se mastocitomas que apresentam comportamento característico de grau I e grau III, levando a uma sub ou sobrestimação, respetivamente, do potencial de agressividade (Strefezzi, 2007). Devido ao seu comportamento de difícil previsão (Vascellari *et al.*, 2012) foi, conseqüentemente, sugerido um novo sistema de classificação que classificaria os mastocitomas em dois graus para evitar a ambigüidade do grau intermédio. Esta nova classificação permite identificar de imediato os mastocitomas mais agressivos, possibilitando a escolha de um tratamento e monitorização mais adequada (Kiupel *et al.*, 2011).

A perda da expressão de Bax implica um atraso no desenvolvimento dos tecidos, pois não elimina células durante a formação do mesmo (Strefezzi, 2007), o que, neste caso, leva à sobrevivência das células neoplásicas, permitindo a aceleração do crescimento da neoplasia (Strefezzi *et al.*, 2012).

Níveis mais elevados desta proteína podem ter origem na síntese excessiva de uma proteína mutante não funcional, que levará à sua acumulação citoplasmática, ou à presença de alguma alteração na produção ou função de reguladores de Bax que podem ser responsáveis por manter esta proteína no citoplasma ou deslocá-la para a membrana mitocondrial. Isto pode prejudicar o efeito pro-apoptótico de Bax e causar acumulação de células mutadas no tumor. Este aumento pode exercer pressão seletiva na população neoplásica, na qual as células com defeitos nos mecanismos apoptóticos podem sobreviver mais tempo, o que facilitaria a sobrevivência de células mais resistentes e adaptáveis e, conseqüentemente, o desenvolvimento de tumores mais agressivos. Foi também sugerido que o aumento da expressão de Bax, que levará ao aumento da atividade apoptótica pode ser a consequência de um fenótipo mais maligno em vez da causa deste fenótipo. Assim, Bax poderia ser considerado um indicador de malignidade, em vez de uma alteração que contribui para tal (Strefezzi *et al.*, 2012).

Caso este aumento de expressão nos mastocitomas de grau I esteja associada à acumulação de Bax no citoplasma, e esta prejudique o efeito pro-apoptótico, ocorrerá uma acumulação de células neoplásicas e, conseqüentemente, haverá progressão para graus de maior malignidade. Neste caso, a expressão de Bax estará associada a um mau prognóstico.

Por outro lado a elevada expressão de Bax em mastocitomas bem diferenciados pode ser associada com um prognóstico mais favorável devido a uma elevada eliminação de células cancerígenas nos estádios iniciais da neoplasia, o que leva a um maior tempo de sobrevivência em mastocitomas de grau I. Isto está de acordo com a bibliografia visto que este é o grau com maior taxa de sobrevivência (Oliveira, 2008).

#### 3.4.4. BCL-2

O score final resultante da avaliação do QS revelou que todos os mastocitomas usados obtiveram expressão de Bcl-2, tendo sido High Bcl-2, com a exceção e três amostras de grau II. No caso de Sun *et al.* (2002), a

maioria dos carcinomas pancreáticos que não apresentaram expressão de Bcl-2 encontravam-se no grupo que abrangia os graus I e II, em comparação com os graus III e IV.

A média dos H-scores e dos índices apoptóticos aumentou do grau I para o grau III, com a exceção da média dos H-scores do grau II que foi menor que os restantes. Esta tendência revelou-se semelhante aos resultados acerca dos tumores astrocíticos de Faria *et al.* (2006) que apresentaram também um aumento destes valores com o aumento da graduação histológica.

Por outro lado Sun *et al.* (2002) ao estudarem a reação de carcinomas pancreáticos a esta proteína, denotaram uma expressão mais elevada nas neoplasias não metastáticas, mais diferenciadas, não invasivas e em graus I e II, em comparação com as neoplasias metastáticas, indiferenciadas, invasivas e de graus III e IV, resultados estes que não se identificam com os do presente estudo.

No estudo de Vascellari *et al.* (2012) sobre os mastocitomas caninos também não foi encontrada associação significativa entre a expressão de Bcl-2 e as classificações histológicas utilizadas (Patnaik e Kiupel). Porém, foi referido neste estudo uma outra investigação referente a mastocitose cutânea em humanos que revelou um aumento de expressão de Bcl-2, quando comparada com controlos saudáveis, sugerindo que o prolongamento da sobrevivência dos mastócitos pode estar associado com o aumento do seu número. Todavia, a expressão de Bcl-2 não foi relacionada com o prognóstico.

A Bcl-2 não altera a velocidade da proliferação celular, mas prolonga a sobrevivência das células, visto que aumenta o seu número ao contrariar a apoptose, resultando, assim, na génese e progressão tumoral (Sun *et al.*, 2002; Faria *et al.*, 2006). A sobreexpressão desta proteína pode ser um fator negativo na progressão das neoplasias e assim a inibição do mecanismo apoptótico pode ser utilizado como um fator de prognóstico da progressão da neoplasia (Porichi *et al.* 2009).

O aumento de Bcl-2 neste estudo, de acordo com a graduação histológica, poderá indicar que a sobreexpressão se encontra diretamente ligada ao grau de malignidade tumoral (Faria *et al.*, 2006).



### 3.4.5. RAZÃO BCL-2/BAX

No presente estudo pôde observar-se uma menor razão nos graus I e II e maior razão Bcl-2/Bax no grau III em comparação com o grau I e II. Estes resultados são semelhantes aos de Porichi *et al.* (2009) no estudo de carcinoma do endométrio e de Faria *et al.* (2006) no estudo de tumores astrocíticos, tendo este último sido associado ao aumento da sobrevivência celular consoante a progressão tumoral. Por outro lado, com a deteção do aumento paralelo na deteção de Bax e Bcl-2 conforme a gradação dos astrocitomas, Faria *et al.* (2006) sugeriram que existem mecanismos de co-regulação entre a expressão dessas proteínas durante a progressão maligna dos tumores astrocíticos. Porichi *et al.* (2009) reforçam ainda que em células malignas a expressão de Bcl-2 deveria ser elevada já que a supressão da apoptose parece ter um papel importante na carcinogénese, o que no presente trabalho decorreu nos tumores de grau III que, visto serem mais agressivos, sobreexpressam um sinal anti-apoptótico.

### 3.4.6. KI-67

O número relativo de células positivas ao Ki-67 é usado para determinar o índice de proliferação ou o número relativo de células envolvidas ativamente no ciclo celular, tendo este marcador de proliferação sido considerado como um marcador de prognóstico independente em mastocitomas caninos (Webster *et al.* 2007; Oliveira, 2008; Maglennon *et al.*, 2008; Vascellari *et al.*, 2012). Por outro lado, na tentativa de utilizar este marcador para avaliar o prognóstico nos mastocitomas de grau II com associação às suas margens, este foi fidedigno para a estimativa da sobrevivência em mastocitomas de margens incompletas, mas não para a recorrência e metástases, já que quando estes revelavam maior positividade a Ki-67 apresentavam um tempo de sobrevivência mais reduzido. Os mastocitomas de grau II com margens completas apresentavam por si só uma maior taxa de sobrevivência visto que uma excisão de margens completas reduz a recorrência desta neoplasia (Ozaki

*et al.*, 2007). Maglennon *et al.* (2008) reforçaram a ideia de que o Ki-67 tinha um papel na avaliação do prognóstico dos mastocitomas de grau II.

Neste estudo o score final resultante da avaliação do QS revelou tendência para High Ki-67 nos mastocitomas mais indiferenciados e a média dos H-scores e dos índices apoptóticos revelou uma tendência de aumento do grau I para grau III, com a exceção do grau II que apresentou um valor mais elevado. Estes resultados encontram-se de acordo com os estudos realizados por Sakai *et al.* (2002), Oliveira (2008) e Vascellari *et al.* (2012) que revelaram positividade crescente, de acordo com o aumento do grau histológico, tendo os dois últimos relacionado o aumento da proliferação celular com o aumento da mortalidade relacionada ao mastocitoma, taxa de recorrência local e metástases.

#### 4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A escassez do estroma nos mastocitomas caninos dificulta a aplicação de métodos imunohistoquímicos.

Com o método de TUNEL o índice apoptótico foi crescente com a graduação histológica, podendo este método ser um potencial indicador de prognóstico, logo que confirmando num maior número de amostras.

O marcador pró-apoptótico Bax revelou um índice apoptótico decrescente com a graduação histológica, não validando os resultados do TUNEL.

O marcador anti-apoptótico Bcl-2 revelou resultado antagonista do Bax e crescente com a graduação histológica.

O mastocitoma de grau II não respeitou a tendência observada nos resultados do Bax e Bcl-2, pondo em causa a sua existência e a classificação de Patnaik já que neste grau intermédio pode haver mastocitomas de comportamento biológico grau I ou de grau III.

A razão Bcl-2/Bax foi crescente com a graduação histológica, confirmando que no grau representativo de maior malignidade há também maior expressão do marcador Bcl-2.

O índice proliferativo foi crescente com a graduação histológica.

A diminuição gradual do estímulo apoptótico, associada ao pressuposto aumento progressivo do incentivo proliferativo, sugere uma extensão na vida das células neoplásicas, um aumento do seu número e, consequentemente, progressão tumoral.

Os mastocitomas caninos revelaram sensibilidade aos marcadores estudados mas serão necessários mais estudos com uma casuística maior para consolidar os resultados aqui expostos.

Sendo o mastocitoma canino tão frequente na clínica veterinária é vital que todos os elementos da equipa possuam conhecimentos relativamente a esta neoplasia. Tendo o Enfermeiro Veterinário um papel cada vez mais relevante torna-se essencial que este melhore as suas competências em oncologia, ao aprofundar o seu conhecimento dos processos celulares envolvidos nesta neoplasia.

## 5. BIBLIOGRAFIA

**Abadie JJ, Amardaeilh MA, Delverdier ME** (1999). Immunohistochemical detection of proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 in mast cell tumor from dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. **215**: 1629-1634.

**Al-Dissi AN, Haines DM, Singh B, Kidney BA** (2010). Immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptor-2 in canine simple mammary gland adenocarcinomas. *Canadian Veterinary Journal*. **51**: 1109-1114.

**Amagai Y, Tanaka A, Jung K, Matsuda A, Oida K, Nishikawa S, Jang H, Ishizaka S, Matsuda H** (2013). Production of stem cell factor in canine mast cell tumors. *Research in Veterinary Science*. 1-3.

**Amarante-Mendes GP, Finucane DM, Martin SJ, Cotter TG, Salvesen GS, Green DR** (1998). Anti-apoptotic oncogenes prevent caspase-dependent and independent commitment for cell death. *Cell Death and Differentiation*. **5**: 298-306.

**Amidi F, French BA, Chung D, Halsted CH, Medici V, French SW** (2007). M-30 and 4HNE are sequestered in different aggresomes in the same hepatocytes. *Experimental and Molecular Pathology*. **83**: 296-300.

**Aranha MM, Borralho PM, Ravasco P, Silva IB Moreira, Correia L, Fernandes A, Camilo ME, Rodrigues CMP** (2007). NF-KB and apoptosis in colorectal tumourigenesis. *European Journal of Clinical Investigation*. **37**: 416-424.

**Arbesman J, Grover R, Helm TN, Beutner EH** (2010). Can direct immunofluorescence testing still be accurate if performed on biopsy specimens after brief inadvertent immersion in formalin? *Journal of the American Academy of Dermatology*. 1-6.

**Bantel H, Ruck P, Gregor M, Schulze-Osthoff K** (2001). Detection of elevated caspase activation and early apoptosis in liver diseases. *European Journal of Cell Biology*. **80**: 230-239.

**Bariani MH, Souza FB, Talon DB** (2007). Mastocitoma cutâneo em cães - relato de caso. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária*. Ano IV (8): 1-3.

**Barranco I, Gómes-Laguna J, Rodrigues-Gómes IM, Salguero FJ, Pallarés FJ, Bernabé A, Carrasco L** (2011) Immunohistochemical detection of extrinsic mediators of apoptosis in porcine paraffin-embedded tissues. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. **139**: 210-216.

**Barsotti G, Marchetti V, Abramo F** (2007). Primary conjunctival mast cell tumor in a Labrador Retriever. *Veterinary Ophthalmology*. **10 (1)**: 60-64.

**Benchimol S** (2001). P53- dependent pathways of apoptosis. *Cell Death and Differentiation*. **8**: 1049-1051.

**Bensignor E, Delisle F, Devauchelle P** (1996). "Les mastocytomes du chien. *Le Point Veterinary*. **27 (173)**: 925-32.

**Bin Y, Akifumi O, Ryuichi I, Takehiro F, Seiji T, Shuji T, Kazuma Fujimoto** (2003). Ischemic preconditioning attenuates ischemia-reperfusion-induced mucosal apoptosis by inhibiting the mitochondria-dependent pathway in rat small intestine. *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology*. **286**: 580-587.

**Bingham J, van der Merwe M** (2001). Distribution of rabies antigen in infected brain material: determining the reliability of different regions of the brain for the rabies fluorescent antibody test. *Journal of Virological Methods*. **101**: 85–94.

**Blomgren K, Leist M, Groc L (2007).** Pathological apoptosis in the developing brain. *Apoptosis*. **12**: 993-1010.

**Bortner CD, Oldenburg NBE, Cidlowsky JA (1995).** The role of DNA fragmentation in apoptosis. *Trends in Cell Biology*. **5**: 180-200.

**Brancolini C, Benedetti M, Schneider C (1995).** Microfilament reorganization during apoptosis: the role of Gas2, a possible substrate for ICE-like proteases. *The EMBO Journal*. **14 (21)**: 5179-5190.

**Brant JMC, Vasconcelos AC, Rodrigues LV (2008).** Role of apoptosis in erosive and reticular oral lichen planus exhibiting variable epithelial thickness. *Brazilian Dental Journal*. **19 (3)**: 179-185.

**Brown SB, Bailey K, Savill J (1997).** Actin is cleaved during constitutive apoptosis. *Biochemical Journal*. **323**: 233-237.

**Bruin EC, Medena JP (2008).** Apoptosis and non-apoptotic deaths in cancer development and treatment response. *Cancer Treatment Reviews*. **34**: 737-749.

**Brunet CL, Gunby RH, Benson RSP, Hichman JA, Watson AJM, Brady G (1998).** Commitment to cell death measured by loss of clonogenicity is separable from the appearance of apoptotic markers. *Cell Death and Differentiation*. **5**: 107-115.

**Burger H, Nooter K, Boersma AWM, Kortland CJ, Van Den Berg AP, Stoter G (1998).** Expression of p53, p21/WAF/CIP, BCL-2, Bax, Bcl-x, and Bak in radiation-induced apoptosis in testicular germ cell tumor lines. *International Journal of Radiation Biology Physics*. **41 (2)**: 415-424.

**Cahalane AK, Payne S, Barber LG et al. (2004).** Prognostic factors for survival of dogs with inguinal and perineal mast cell tumors treated surgically with or without adjunctive treatment: 68 cases (1994-2002). *Journal of the American Veterinary Medical Association*. **225**: 401-408.

**Cao JX, Ou CR, Zou YF, Ye KP, Zang QQ, Khan MA, Pan DD, Zhou G** (2013). Activation of caspase-3 and its correlation with shear force in bovine skeletal muscles during postmortem conditioning. *Journal of Animal Science*. **91**: 4547-4552

**Chen S, Zhu W, Zhou Q, Chen G** (2008). Cytotoxicity and apoptotic effect of phytoceramide IV containing liposomes on murine mastocytoma cell P815. *Tsinghua Science and Technology*. **13 (4)**: 447-453.

**Chinnaiyan AM** (1999). The apoptosome: heart and soul of the cell death machine. *Neoplasia*. **1 (1)**: 5-15.

**Christina M, HL Angelika, Bernd P, Prelog M** (2006). Simultaneous detection of a cell surface antigen and apoptosis by microwave-sensitized TUNEL assay on paraffin sections. *Journal of Immunological Methods*. **316**: 163–166.

**Clarke P, Tyler KL** (2009). Apoptosis in animal models of virus-induced disease. *Nature Reviews Microbiology*. **7 (2)**: 144-155.

**Clynes M, Daly C, NicAmhlaibh R, Cronin D, Elliott C, O'Connor R, O'Doherty, Connolly L, Howlett, Scanlon** (1998). Recent developments in drug resistance and apoptosis research. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. **28**: 181-205.

**Cohen GM** (1997). Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochemical Journal*. **326**: 1-16.

**Coopersmith CM, O'Donnell D, Gordon JI** (1999). Bcl-2 inhibits ischemia-reperfusion-induced apoptosis in the intestinal epithelium of transgenic mice. *The American Journal of Physiology*. **276 (39)**: 677-686.

**Corrêa MPD, Ferreira AP, Gollner AM, Rodrigues MF, Guerra MCS** (2009). Expressão de marcadores de proliferação celular e apoptose em carcinoma basocelular. *Anais Brasileiros de Dermatologia*. **84 (6)**: 606-614.

**Couto C** (2011). Mast cell tumors in dogs and cats. *VII Congresso Oncologia Hospital Veterinário Montenegro e I Congresso Enfermagem Hospital Veterinário Montenegro*. Europarque. Santa Maria da Feira. 12-13 Fevereiro.

**Culling CFA, Allison RT, Barr WT** (1985). *Cellular pathology technique*. (4ª edição). London, Butterworths. 642.

**Danial NN, Korsmeyer SJ** (2004). Cell death: critical control points. *Cell Press*. **116**: 205-219.

**Darzynkiewicz Z, Galkowski D, Zhao, H** (2008). Analysis of apoptosis by cytometry using TUNEL assay. *Methods*. **44 (3)**: 250-254.

**Davis BJ, Page R, Sannes PI, Meuten DJ** (1992). Cutaneous mastocytosis in a dog. *Veterinary Pathology*. **29**: 363-365.

**Debatin KM, Krammer PH** (2004). Death receptors in chemotherapy and cancer. *Oncogene*. **23**: 2950-2966.

**Detre S, Sacanni Jotti, Dowsett M** (1995). A “quickscore” method for immunohistochemical semiquantitation: validation for oestrogen receptor in breast carcinomas. *Journal of Clinical Pathology*. **48**: 876-878.

**Didenko VV, Hornsby PJ** (1996). Presence of double-strand breaks with single-base 3' overhangs in cells undergoing apoptosis but not necrosis. *The Journal of Cell Biology*. **135 (5)**: 1369-1376.



**Dobson MJ, Duncan B, Lascelles X** (2011). *BSAVA manual of canine and feline oncology*. Waterwells, British Small Animal Veterinary Association: 142-149.

**Dogu Y, Díaz J** (2009). Mathematical model of a network of interaction between p53 and Bcl-2 during genotoxic-induced apoptosis. *Biophysical Chemistry*. **143**: 44-54.

**Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X** (2000). Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell*. **102**: 33-42.

**Dubská L, Matalová E, Mísek I** (2002). Detection of Apoptosis in Paraffin Embedded Tissues: the Influence of Tissue Type and Fixation. *Acta Veterinaria BRNO*. **71**: 529-533.

**Ekert PG, Vaux DL** (2005). The mitochondrial death squad: hardened killers or innocent bystanders? *Current Opinion in Cell Biology*. **17**: 626-630.

**Elders RC, Baines SJ, Catchpole B** (2008). Susceptibility of the C2 canine mastocytoma cell line to the effects of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). *Veterinary Immunology and Immunopathology*. **130**: 11-16.

**Elmore S** (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*. **35(4)**: 495-516.

**Fadok VA, Cathelineau A, Daleke DL, Henson PM, Bratton DL** (2001). Loss of phospholipid asymmetry and surface exposure of phosphatidylserine is required for phagocytosis of apoptotic cells by macrophages and fibroblasts. *The Journal of Biological Chemistry*. **276**: 1071-1077.

**Fan Tin-Jun, Han Li-Hui, Cong Jin** (2005). Caspase family proteases and apoptosis. *Acta Biochimica et Biophysica*. **37(11)**: 719-727.

**Faria MHG, Patrocínio RMSV, Filho MOM, Rabenhorst SHB** (2006). Expressão das proteínas BCL-2 e BAX em tumores astrocíticos humanos. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. **42 (4)**: 271-278.

**Farias RE, Souza AR, Aarestru FM** (2005). Avaliação da apoptose no carcinoma ductal infiltrante da mama: associação com graus histológicos e fatores prognósticos. *Revista Brasileira de Cancerologia*. **51(3)**: 209-218.

**Ferrington DA, Tran TN, LEW KL, Remmen HV, Gregson DS** (2006). Different death stimuli evoke apoptosis via multiple pathways in retinal pigment epithelial cells. *Experimental Eye Research*. **83**: 638-650.

**Foster I** (2008). Cancer: A cell cycle defect. *Radiography*. **14**: 144-149.

**Froberg GK, Lindberg R, Ritter M, Nordlind K** (2009). Expression of serotonin and its 5-HT1A receptor in canine cutaneous mast cell tumours. *Journal of Comparative pathology*. **141**: 89-97.

**Froelich CJ, Tschopp J** (1998). Flip prevents apoptosis induced by death receptors but not by perforin/granzyme B, chemo therapeutic drugs, and gamma irradiation. *The Journal of Immunology*. **161**: 3936-3942.

**Fulda S, Debatin KM** (2006). Resveratrol modulation of signal transduction in apoptosis and cell survival: a mini-review. *Cancer Detection and Prevention*. **30**: 217-223.

**Garcia C** (2013). Avaliação da técnica imunohistoquímica como método de detecção da apoptose a nível celular. Mestrado em Tecnologias da Produção Animal. Escola Superior Agrária de Viseu, Viseu: 4-15, 20-22.

**Garrido C, Galluzzi L, Brunet M, Puig PE, Didelot C, Kroemer G** (2006). Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death and Differentiation*. **13**: 1423-1433.

**Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA** (1992). Identification of Programmed Cell Death In Situ via Specific Labeling of Nuclear DNA Fragmentation. *The Journal of Cell Biology*. **119 (3)**: 493-501.

**Gerdes, J, Li L, Schlüter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Gerlach C, Stahmer I, Kloth S, Brandt E, Flad HD** (1991). Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67. *American Journal of Pathology*. **138**: 867-873.

**Gerl R, Vaux DL** (2005). Apoptosis in the development and treatment of cancer. *Carcinogenesis* . **26 (2)**: 263-270.

**Giantin M, Aresu L, Benali S, Arico A, Morello EM, Martano M, Vascellari M, Castagnaro M, Lopparelli RM, Zancanella V, Granato A, Mutinelli F, Dacasto M** (2012). Expression of matrix metalloproteinases, tissue inhibitors of metalloproteinases and vascular endothelial growth factor in canine mast cell tumours. *Journal of Comparative Pathology*. **147**: 419-429.

**Goodsell DS** (2004). The molecular perspective: cytochrome c and apoptosis. *The Oncologist*. **9**: 226-227.

**Gown AM, Willingham MC** (2002). Improved Detection of Apoptotic Cells in Archival Paraffin Sections: Immunohistochemistry Using Antibodies to Cleaved Caspase 3. *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. **50 (4)**: 449-454.

**Greenhalgh DG** (1998). The role of apoptosis in wound healing. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. **30**: 1019-1030.

**Greystoke A, Hughes A, Ranson M, Dive C, Cummings J, Ward T** (s/d). Serum biomarkers of apoptosis. Não publicado.

**Griffin JS, Scott DW, Erb HN** (2010). Prevalence of apoptotic epidermal keratinocytes in eosinophilic dermatoses of the cat: a retrospective light-microscopic study of 145 skin-biopsy specimens. *Journal of Feline Medicine and Surgery*. **12**: 86-90.

**Grivicich I, Regner A, Rocha AB** (2007). Morte Celular por Apoptose. *Revista Brasileira de Cancerologia*. **53 (3)**: 335-343.

**Gross TL, Ihrke PJ, Walder EJ, Affolter VK** (2005). *Skin diseases of the dog and cat clinical and histopathologic diagnosis*. (2ª edição). Oxford, Blackwell Science Ltd: 853-855.

**Gupte SS, Hachenbrock CR** (1987). The role of cytochrome c diffusion in mitochondrial electron transport. *The Journal of Biological Chemistry*. **263 (11)**: 5248-5253.

**Hadzijasufovic E, Peter B, Rebuzzi L, Baumgartner CGleixner KV, Gruze A, Thaiwong T, Pickl WF, Yuzbasiyan- Gurkan V, 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**: 243-250.

**Hartmann K, Hermes B, Rappersberger K, Sepp N, Mekoris YA, Henz BM** (2003). Evidence for altered mast cell proliferation and apoptosis in cutaneous mastocytosis. *British Journal of Dermatology*. **149**: 554-559.

**Hayworth D** (s/d). Overview of Crosslinking and Protein Modification. Piercenet. com. <http://piercenet.com/method/overview-crosslinking-protein-modification#crosslinking>

**Hershko, AY, Rivera J**, (2010). Mast cell and T cell communication; amplification and control of adaptive immunity. *Immunology Letters*. **128**: 98-104.

**Hill MM, Adrain C, Duriez PJ, Creagh EM, Martin SJ** (2004). Analysis of the composition, assembly kinetics and activity of native Apaf-1 apoptosomes. *The Embo Journal*. **23**: 2134-2145.

**Hirsch T, Marchetti P, Susin SA, Dallaporta B, Zamzami N, Marzo I, Geuskens M, Kroemer G** (1997). The apoptosis-necrosis paradox. Apoptogenic proteases activated after mitochondrial permeability transition determine the mode of cell death. *Oncogene*. **15**: 1573-1581.

**Hoepfner DJ, Hengartner MO, Schanbel R** (2001). Engulfment genes cooperate with ced-3 to promote cell death in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. **412**: 202-6.

**Hoetelmans RWM, van Slooten H-J, Keijzer R, Erkeland S, van de Velde CJH, van Dierendonck JG** (2000). Bcl-2 and Bax proteins are present in interphase nuclei of mammalian cells. *Cell Death and Differentiation*. **7**: 384-392.

**Hua ZJ, Xu M** (2000). DNA fragmentation in apoptose. *Cell Research*. **10**: 205-211.

**Huber HJ, Duessmann H, Wenus J, Kilbride SM, Prehn JHM** (2011). Mathematical modelling of the mitochondrial apoptosis pathway. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1813**: 608-615.

**Huerta S, Goulet EJ, Huerta-Yepez S, Livingston EH** (2007). Screening and detection of apoptosis. *Journal of Surgical Research*. **139**: 143-156.

**Hughes J, Gobe G** (2007). Identification and quantification of apoptosis in the kidney using morphology, biochemical and molecular markers. *Nephrology*. **12**: 452-458.

**Indran IR, Tufo G, Pervaiz S, Brenner C** (2011). Recent advances in apoptosis, mitochondria and drug resistance in cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1807**: 735-745.

**Ioannou YA, Chen FW** (1996). Quantitation of DNA fragmentation in apoptosis. *Nucleic Acids Research*. **24 (5)**: 992-993.

**Iwamoto S, Burrows RC, Born DE, Piepkorn M, Bothwell M** (2000). The application of direct immunofluorescence to intraoperative neurosurgical diagnosis. *Biomolecular Engineering*. **17**: 17-22.

**Jaffe MH, Hosgood G, Taylor HW et al.** (2000). Immunohistochemical and clinical evaluation of p53 in canine cutaneous mast cell tumors. *Veterinary Pathology*. **37**: 40-466.

**Janicke RU, Sprengart ML, Wati MR, Porter AG** (1998). Caspase-3 is required for DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry*. **273**: 9357-9360.

**Jayawardana STM, Ushio H, Niyonsaba F, Gondokaryno SP, Takenaka H, Ikeda S, Okumura K, Ogawa H** (2008). Monomeric IgE and lipopolysaccharide synergistically prevent mast-cell apoptosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **365**. 137-142.

**Jesus SOTS** (2011). Estudo de gliomas cerebrais no cão, padrões imagiológicos, estudo das mutações de p53, expressão dos receptores do factor de crescimento epidérmico (egfr), e marcadores imunohistoquímicos. *Tese de doutoramento em ciências veterinárias*. Universidade técnica de Lisboa, Lisboa: 17, 24, 25.

**Jordan JA, Butchko AR** (2002). Apoptotic activity in villous trophoblast cells during B19 infection correlates with clinical outcome: assessment by the caspase-related M30 cytodeath antibody. *Placenta*. **23**: 547-553.

**Jubb KVF, Kennedy PC, Palmer N** (1993). *Pathology of domestic animals*. (3ª edição). California, Academy Press.1: 727-729.

**Junqueira LC, & Carneiro J** (2004). *Histologia Básica* (10 ed.). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A.

**Kaneco Y, Tsukamoto A** (1995). Apoptosis and nuclear levels of p53 protein and proliferating cell nuclear antigen in human hepatoma cells cultured with tumor promoters. *Cancer Letters*. **91**: 11-17.

**Kataoka T, Schroter M, Hahne M, Schneider P, Irmeler M, Thome M, Froelich CJ, Tschopp J** (1998). FLIP prevents apoptosis induced by death receptors but not by perforin/granzyme B, chemotherapeutic drugs, and gamma irradiation. *The Journal of Immunology*. **161**: 393–3942.

**Kelly KJ, Sandoval RM, Dunn KW, Molitoris BA, Dagher PC** (2003). A novel method to determine specificity and sensitivity of the TUNEL reaction in the quantitation of apoptosis. *The American Journal Physiology Cell Physiology*. **284**: 1309-1318.

**Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR** (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*. **26**: 239

**Kerr JFR** (2002). History of the events leading to the formulation of the apoptosis concept. *Toxicology*. **181**: 471-474.

**Kindt N, Menzebach A, Van de Wouwer M, Betz I, De Vriese A, Conway EM** (2008). Protective role of the inhibitor of apoptosis protein, survivin, in

toxin-induced acute renal failure. *The FASEB Journal, Research Communication*. **22**: 510-521.

**Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Krammer PH, Peter ME** (1995). Cytotoxicity- dependent APO-1 (Fas/CD95)- associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *The Embo Journal*. **14 (22)**: 5579-5588.

**Kiupel M, Webster JD, Bailey KL, Best S, DeLay J, Detrisac CJ, Fitzgerald SD, Gamble D, Ginn PE, Goldschmidt MH, Hendrick MJ, Howerth EW, Janovitz EB, Langohr I, Lenz SD, Lipscomb TP, Miller MA, Misdorp W, Moroff S, Mullaney TP, Neyens I, O'Toole D, Ramos-Vara J, Scase TJ, Schulman FY, Sledge RC, Smedley RC, Smith K, Snyder PW, Southorn E, Stedman NL, Stficek BA, Stromberg VE, Valli VE, Weisbrode SE, Yager J, Heller J, Miller R** (2011). Proposal of a 2-tier histologic grading system for canine cutaneous mast cell tumors to more accurately predict biological behavior. *Veterinary Pathology*. **48**: 147-155.

**Kohler C, Orrenius S, Zhivotovsky B** (2002). Evaluation of caspase activity in apoptotic cells. *Journal of Immunological Methods*. **265**: 97–110.

**Komaki R ,Fujii T, Perkins P, Ro JY, Allen PK, Mason KA, Mountain CF, Milas L** (1996). Apoptosis and mitosis as prognostic factors in pathologically staged N1 nonsmall cell lung cancer. *International Journal of Radiation Biology Physics*. **36 (36)**: 601-605.

**Kun L, Zhengxuan J, Bi-qing D, Ping C, Da-ke H, Li-ming T** (2011). Expression of cell proliferation and apoptosis biomarkers in pterygia and normal conjunctiva. *Molecular Vision*. **17**: 1687-1693

**Kumar R, Herbert P.E., Warrens A.N.** (2005). An introduction to death receptors in apoptosis. *International Journal of Surgery*. **3**: 268-277.



**Kurosaka K, Takahashi M, Watanabe N, Kobayashi Y** (2003). Silent cleanup of very early apoptotic cells by macrophages. *The Journal of Immunology*. **171**: 4672-4679.

**Labat-Moleur F, Guillermet C, Lorimier P, Robert C, Lantuejoul S, Brambilla E, Negoescu A** (1998). TUNEL Apoptotic Cell Detection in Tissue Sections: Critical Evaluation and Improvement. *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. **46 (3)**: 327-334.

**Lamm CG, Stern AW, Smith AJ, Cooper EJ, Ullom SW, Campbell GA** (2009). Disseminated cutaneous mast cell tumors with epitheliotropism and systemic mastocytosis in a domestic cat. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. **21**: 710-715.

**Laskoski** (2009). Alterações morfológicas, apoptose e expressão de metaloproteinases no tecido laminar de equinos submetidos à obstrução intestinal experimental. Efeitos da hidrocortisona. *Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Cirurgia Veterinária junto ao programa de Pós-graduação em Cirurgia Veterinária*. Faculdade de Ciências Veterinárias, Jaboticabal: 23-26, 37, 38.

**Lavrik I, Golks A, Krammer PH** (2005). Death receptor signaling. *Journal of Cell Science*. **118**: 265-267.

**Lazebnik YA, Cole S, Cooke CA, Nelson WG, Earnshaw WC** (1993). Nuclear events of apoptosis in vitro in cell-free mitotic extracts: a model system for analysis of the active phase of apoptosis. *The Journal of Cell Biology*. **123, (1)**: 7-22.

**Leist S, Nicotera P** (1996). Breakthroughs and views the shape of cell death. *Biochemical and Biophysical Research communications*. **236**: 1-9.

**Lemasters JJ** (2005). Dying a thousand deaths: redundant pathways from different organelles to apoptosis and necrosis. *Gastroenterology*. **129**. 351-360.

**Li H, Zhu H, Xu C, Yuan J** (1998). Cleavage of BID by Caspase 8 Mediates the Mitochondrial Damage in the Fas Pathway of Apoptosis. *Cell*. **94**: 491-501.

**Li Y, Liantang W, Juemin Z, Shangwu C** (2010). Diagnostic value of p16INK4A, Ki-67, and Human Papillomavirus L1 Capsid Protein Immunochemical staining on Cell Blocks from Residual Liquid-Based Gynecologic Cytology Specimens. *Cancer Cytopathology*. **118**: 47–55.

**Liang K, Jiang Z, Ding B, Cheng P, Huang D, Tao L** (2011). Expression of cell proliferation and apoptosis biomarkers in pterygia and normal conjunctiva. *Molecular Vision*. **17**: 1687-1693.

**Linder S, Havelka AM, Ueno T, Shoshan MC** (2004). Determining tumor apoptosis and necrosis in patient serum using cytokeratin 18 as a biomarker. *Cancer Letters*. **214**: 1-9.

**London C, Seguin B** (2003). Mast cell tumors in the dog. *Veterinary Clinic of Small Animals*. **33 (3)**: 473-89.

**Lourenço L** (2009). *Protocolos do laboratório de histologia e anatomia patológica*. Vila Real, UTAD, Serviços Gráficos da UTAD: 18, 19, 42.

**Lowe SW, Mak TW** (1998). Essential contribution of caspase 3/ CPP32 to apoptosis and its associated nuclear changes. *Genes & Development*. **12**: 806-819.

**Lucinda LMF** (2009). Mecanismos de indução da apoptose por glicocorticóides e seus efeitos no câncer. *Monografia de Conclusão de Curso de Especialização em Parasitologia e Microbiologia e Imunologia do*

ICB da UFJF, para obtenção do Título de Especialista em Parasitologia, Microbiologia e Imunologia. Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora: 22-26.

**Mackowiak II, Gentile LB, Chaible LM, Nagamine MK, Guerra JM, Mota EFF, Matera JM, Mennecier G, Sanches DS, Dagli MLZ** (2012). E-cadherin in canine mast cell tumors: Decreased expression and altered subcellular localization in Grade 3 tumors. *The Veterinary Journal*. **194**: 405-411.

**Maglennon GA, Murphy S, Adams, V, Miller J, Smith K, Blunden A, Scase TJ** (2008). Association of Ki-67 index with prognosis for intermediate-grade canine cutaneous mast cell tumors. *The Authors Journal compilation*. 6: 268-274.

**Majno G, Joris I** (1995). Apoptosis, oncosis, and necrosis an overview of cell death. *American Journal of Pathology*. **146 (1)**: 3-15.

**Maltby S, Khazaie K, McNagny KM** (2009). Mast cells in tumor growth: Angiogenesis, tissue remodelling and immune-modulation. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1796**: 19-26.

**Markaryan A, Nelson EG, Tretiakova M, Hinojosa R** (2008). Technical report: Immunofluorescence and TUNEL staining of celloidin embedded human temporal bone tissues. *Hearing Research*. **241**: 1-6.

**Martin SJ, Finucane DM, Amarante-Mendes GP, O'Brien GA, Green DR** (1996). Phosphatidylserine externalization during CD95-induced apoptosis of cell and cytoplasts requires ICE/CED-3 protease activity. *Journal Biological Chemistry*. **271**: 28753-28756.

**McCarthy NJ, Whyte MKB, Gilbert CS, Evan GI** (1997). Inhibition of Ced-3/ICE-related proteases does not prevent cell death induced by oncogenes,

DNA damage, or the Bcl-2 homologue bak. *The Journal of cell Biology*. **136** (1): 215-227.

**McConkey, DJ, Zhivotovsky B, Orrenius S** (1996). Apoptosis- molecular mechanisms and biomedical implications. *Molecular Aspects of Medicine*. **17**: 1-100.

**McGavin MD, Thomson RG, Carlton W** (2001). *Thomson's special veterinary pathology* (3ª edição). Missouri, Mosby Inc: 348.

**Metcalf DD, Baram D, Mekori YA** (1997). Mast cells. *Physiological Reviews*. **77**: 1033-1079.

**Meuten DJ** (2002). *Tumors in domestic animals*. (4ª edição). Iowa, Blackwell Publishing Company: 105-107.

**Mok KH, Pettersson J, Orrenius S, Svanborg C** (2007). Hamlet, protein folding, and tumor cell death. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **354**: 1-7.

**Mucci J, Hidalgo A, Mocetti E, Argibay PF, Leguizamón MS, Campetella O** (2002). Thymocyte depletion in *Trypanosoma cruzi* infection is mediated by trans-sialidase-induced apoptosis on nurse cells complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **99** (6): 3896-3901.

**Nagata S** (2000). Apoptotic DNA fragmentation. *Experimental Cell Research*. **256**: 12-18.

**Nasir L, Krasner H, Argyle DJ, Williams A** (2000). Immunocytochemical analysis of the tumor suppressor protein (p53) in feline neoplasia. *Cancer Letters*. **155**: 1-7.

**Navega P** (2011). Mastocitomas em canídeos: estudo retrospectivo. *Dissertação de Mestrado integrado em Medicina Veterinária*. Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa: 6-8, 14-18, 37.

**Negoescu A, Guillermet Ch, Lorimier Ph, Robert C, Lantuejoul S, Brambilla E, Labat-Moleur F** (1998). TUNEL Apoptotic Cell Detection in Archived Paraffin-embedded Tissues. *Biochemica*. **3**: 36-41.

**Niki H, Hosokawa S, Nagaike K, Tagawa T** (2004). A new immunofluorostaining method using red fluorescence of PerCP on formalin-fixed paraffin-embedded tissues. *Journal of Immunological Methods*. **293**: 143–1.

**Norbury CJ, Hickson ID** (2001). Cellular responses to DNA damage. *Annual Review Pharmacology and Toxicology*. **41**: 367-401.

**Oliveira J** (2008). Aspetos cutâneos do mastocitoma canino: relação com caraterísticas epidemiológicas e clínicas e seu valor prognóstico. *Dissertação de candidatura ao grau de Doutor em Ciências Veterinárias*. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real: 16-44, 71, 99.

**Ong YL, McMullin MF, Bailie KEM, Lappin TRJ, Jones FGC, Irvine AE** (2000). High bax expression is a good prognostic indicator in acute myeloid leukaemia. *British Journal of Haematology*. **111**: 182-189.

**Orkin M, & Schwartzman R M** (1959). A Comparative Study of Canine and Human Dermatology. *The Journal of Investigative Dermatology* . **32**: 451-466.

**Otsuki Y, Li Z, Shibata M** (2003). Apoptotic Detection Methods- from Morphology to gene. *Progress in Histochemistry and Cytochemistry*. **38 (3)**: 275-340.

**Park BS, Baek SJ, Song KH, Ki-Ho K, Jeong SJ, Jeong MH, Seo SY, Lee SW, Yoo KS, Yoo YH** (2002). Genistein-induced apoptosis of p815

mastocytoma cells is mediated by Bax and augmented by a proteasome inhibitor, lactacystin. *Nutrition and Cancer*. **42 (2)**: 248-255.

**Patnaik AK, Ehler WJ, MacEwen EG** (1984). Canine cutaneous mast cell tumor: morphologic grading and survival time in 83 dogs. *Veterinary Pathology*. **21**: 469-474.

**Pelzer ES, Harris JE, Allan JA, Waterhouse MA, Ross T, Beagley KW, Knox CI** (2013). TUNEL analysis of DNA fragmentation in mouse unfertilized oocytes: The effect of microorganisms within human follicular fluid collected during IVF cycles. *Journal of Reproductive Immunology*. **99**: 69-79.

**Penault-Llorca F, Bouabdallah R, Devilard E, Charton-Bain MC, Hassoun J, Birg F, Xerri L** (1998). Analysis of Bax Expression in human tissues using the anti-bax, 4F11, monoclonal antibody on paraffin sections. *Pathology Research and Practice*. **194**: 457-464.

**Pereira ks, Zuccari DAPC, Cury PM, Cordeiro JA** (2003). Apoptosis as a prognostic marker in canine mammary tumors by TUNEL. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*. **40**: 359-365.

**Perik PJ, de Vries EGE, Gietema JA, van der Graaf WTA, Sleijfer DTh, Suurmeijer AJH, van Veldhuisen DJ** (2005). The dilemma of the strive for apoptosis in oncology: mind the heart. *Critical Reviews Oncology/Hematology*. **53**: 101-113.

**Pervaiz S, Hirpara JL, Clément MV** (1998). Caspase proteases mediate apoptosis induced by anticancer agent preactivated MC540 in human tumor cell lines. *Cancer Letters*. **128**: 11-22.

**Peter ME, Krammer PH** (1998). Mechanisms of CD95 (APO-1/Fas)-mediated apoptosis. *Current Opinion in Immunology*. **10**: 545-551.



**Piro FR, di Gioia CRT, Gallo P, Giordano C, d'Amati G** (2000). Is apoptosis a Diagnostic Marker of Acute Myocardial Infarction? An Autopsy Study Comparing Histologic, Immunohistochemical, TUNEL, and DNA electrophoresis Evidence. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*. **124**: 827-831.

**Porichi O, Nikolaidou ME, Apostolaki A, Tserkezoglou A, Arnogiannaki N, Kassanos D, Margaritis L, Panotopoulou E** (2009). BCL2, BAX and P53 Expression Profiles in Endometrial Carcinoma as Studied by Realtime PCR and Immunohistochemistry. *Anticancer Research*. **29**: 3977-3982 .

**Portt L, Norman G, Clapp C, Greenwood M, Greenwood MT** (2011). Anti-apoptosis and cell survival: A review. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1813**: 238-259.

**Preziosi R, Sarli G, Paltrinieri M** (2004). Prognostic value of intratumoral vessel density in cutaneous mast cell tumors of the dog. *Journal of Comparative Pathology*. **130**: 143-151.

**Rai NK, Tripathi K, Sharma D, Shukla VK** (2005). Apoptosis: a basic physiologic process in wound healing. *International Journal of Lower Extremity Wounds*. **4**: 138-144.

**Rastogi RP, Richa, Sinha RP** (2009). Apoptosis: Molecular mechanisms and pathogenicity. *EXCLI Journal*. **8**: 155-181.

**Rech RR, Graça DL, Kommers GD, Sallis ESV, Raffi MB, Garmatz SL** (2004). Mastocitoma cutâneo canino. Estudo de 45 casos. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. **56 (4)**: 441-448.

**Rehman AG, Booth C, Potten CS** (2001). What is apoptosis, and why is it important? *British Medical Journal*. **322**: 1536-1538.

**Ressel L, Poli A** (2010). Simultaneous double labelling of routinely processed paraffin tissue sections using combined immunoperoxidase, immunofluorescence, and digital image editing. *Research in Veterinary Science*. **88**: 122-126.

**Réssio RA** (2010). Avaliação da imuno-expressão de proteínas da via da apoptose mediadas pela proteína p53 no Carcinoma Hepatocelular. *Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências*. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo: 7, 8, 9-17, 38-40.

**Roosje PJ, Koeman JP, Thepen T, Willemse T** (2004). Mast Cells and Eosinophils in Feline Allergic Dermatitis: A Qualitative and Quantitative Analysis. *Journal of Comparative pathology*. **131**: 61-69.

**Rubio-Moscardo F, Blesa D, Mestre C, Siebert R, Balasas T, Benito A, Rosenwald A, Climent J, Martinez JI, Schilhabel M, Karran EL, Gesk S, Esteller M, deLeeuw R, Staudt LM, Fernandez-Luna JL, Pinkel D, Dyer MJS, Martinez-Climent JA** (2005). Characterization of 8p21.3 chromosomal deletions in B-cell lymphoma: TRAIL-R1 and TRAIL-R2 as candidate dosage-dependent tumor suppressor genes. *Blood*. **106**: 3214-3222.

**Saelens X, Festjens N, Walle LV, van Gurp M, van Loo G, Vandenameele P** (2002). The role of mitochondrial factors in apoptosis: a Russian roulette with more than one bullet. *Cell Death and Differentiation*. **9**: 1031 - 1042.

**Saelens X, Festjens N, Walle LV, van Gurp M, van Loo G, Vandenameele P** (2004). Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene*. **23**: 2861-2874.

**Sandra F, Hendarmin L, Nakamura S** (2006). Osteoprotegerin (OPG) binds with tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL):

suppression of TRAIL- induced apoptosis in ameloblastomas. *Oral Oncology*. **42**: 415-420.

**Scaffidi C, Schmitz I, Krammer PH, Peter ME** (1999). The role of c-FLIP in modulation of CD95-induced apoptosis. *The Journal of Biology Chemistry*. **274**: 1541-1548.

**Schimmer AD** (2004). Inhibitor of apoptosis proteins: translating basic knowledge into clinical practice. *Cancer Research*. **64**: 7183-7190.

**Scholzen T & Gerdes J** (2000). The Ki-67 Protein: From the Known and the Unknown. *Journal of Cellular Physiology*. **182**: 311-322.

**Schug ZT, Gonzalez F, Houtkooper RH, Vaz FM, Gottlieb** (2011). BID is cleaved by caspase-8 within a native complex on the mitochondrial membrane. *Cell Death and Differentiation*. **18**: 538-548.

**Schulze-Osthoff K, Ferrari D, Los M, Wesselborg S, Peter ME** (1998). Apoptose signaling by death receptors. *European Journal of Biochemistry*. **254**: 439-459.

**Sakagami H** (2010). Apoptosis-inducing activity and tumor-specificity of antitumor agents against oral squamous cell carcinoma. *Japanese Dental Science Review*. **46**: 173-187.

**Sakai N, Noda A, Shirai N et al.** (2002). Proliferative activity of canine mast cell tumors evaluated by bromodeoxyuridine incorporation and Ki-67 expression. *Journal of Comparative Pathology*. **127**: 233-8.

**Saraste A, Pulkki K** (2000). Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovascular Research*. **45**: 528-537.

**Sasaki R, Aoki S, Yamato M, Uchiyama H, Wada K, Ogiuchi H, Okano T, Ando T.** A protocol for immunofluorescence staining of floating neurospheres. *Neuroscience Letters*. **479**: 126–127.

**Schutte B, Henfling M, Kolgen W, Bouman M, Meex S, Leers MPG, Nap M Bjorklund V, Bjorklund P, Bjorklund B, Lane EB, Omary MB, Jornvall H, Ramaekers FCS** (2004). Keratin 8/18 breakdown and reorganization during apoptosis. *Experimental Cell Research*. **297**: 11–26.

**Scott DW, Muller GH, Kirk RW, Miller WH, Griffin CE** (2001). *Small animal dermatology*. (6ª edição). Philadelphia, Saunders Elsevier: 1320-1330.

**Sfiligoi G, Rassnick KM, Scarlett JM et al.** (2005). Outcome of dogs with mast cell tumors in the inguinal or perineal region versus other cutaneous locations: 124 cases (1990-2001). *Journal of the American Veterinary Medical Association*. **225**: 1368-1374.

**Sheri A, Dowsett M** (2012). Developments in Ki67 and other biomarkers for treatment decision making in breast cancer. *Annals of Oncology*. **23** (10): 219-227.

**Sheridan MT, West CML** (2001). Ability to undergo apoptosis does not correlate with the intrinsic radiosensitivity (SF2) of human cervix tumor cell lines. *International Journal of Radiation Biology Physics*. **50 (2)**: 503-509

**Shucaí A, Yoshitaka H, Takehiko K** (2005). Induction of cell death in rat small intestine by ischemia reperfusion: differential roles of Fas/Fas ligand and Bcl-2/Bax systems depending upon cell types. *Histochemistry and Cell Biology*. **123**: 249-261.

**Simões JPC, Schoning P, Butine M** (1994). Prognosis of canine mast cell tumors: a comparison of three methods. *Veterinary Pathology*. **31**: 637-647.

**Slee EA, Harte MT, Kluck RM, Wolf BB, Casiano CA, Newmeyer DD, Wong-Gang W, Reed JC, Nicholson DW, Alnemri ES, Green DR, Martin SJ** (1999). Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, 3, 6, 7,8, and -10 in a caspase- 9-dependent manner. *The Journal of Cell Biology*. **144 (2)**: 281-292.

**Slee EA, Adrain C, Martin SJ** (2001). Executioner caspase-3, - 6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. *The Journal of Biology Chemistry*. **276**: 7320-7326.

**Smith KB, Ellis SA** (1999). Standardisation of a procedure for quantifying surface antigens by indirect immunofluorescence. *Journal of Immunological Methods*. **228**: 29–36.

**Solá S, Castro RE, Laires PA, Rodrigues CMP** (2003). Apoptose e lesão hepática. *Jornal Português de Gastreterologia*. **10**: 33-40.

**Solary E, Bertrand R, Kohn KW, Pommier Y** (1993). Differential induction of apoptosis in undifferentiated and differentiated HL-60 cells by DNA topoisomerase I and II inhibitors. *Blood*. **81**: 1359-1368.

**Soler AP, Mullin JM, Knudsen KA, Marano CW** (1996). Tissue remodeling during tumor necrosis factor-induced apoptosis in LLC-PK<sub>1</sub> renal epithelial cells. *The American Journal of Physiology*. **39**: 869-879.

**Spielman J, Lee RK, Podack ER** (1998). Perforin/fas-ligand double deficiency is associated with macrophage expansion and severe pancreatitis. *The Journal of Immunology*. **161**: 7063-7070.

**Spies M, Chappell VL, Dasu MR, Herndon DN, Thompson JC, Wolf SE** (2002). Role of TNF- $\alpha$  in gut mucosal changes after severe burn. *The American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. **283**: 703-708.

**Spirkoski J, Melo FR, Grujic M, Calounova G, Lundequist A, Wernersson S, Pejler G** (2012). Mast cell apoptosis induced by siramesine, a sigma-2 receptor agonist. *Biochemical Pharmacology*. **84**: 1671-1680.

**Srinivasula SM, Ahmad M, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES** (1997). Autoactivation of procaspase-9 by apaf-1-mediated oligomerization. *Molecular Cell*. **1**: 949-957.

**Strebel A, Bachmann F, Wernli M, Erb P** (2002). Tumor necrosis factor-related, apoptosis-inducing ligand supports growth of mouse mastocytoma tumors by killing tumor-infiltrating macrophages. *International Journal of Cancer*. **100**: 627-634.

**Strefezzi RF** (2007). Indicadores prognósticos para mastocitomas: estudo morfométrico e imunoistoquímico. *Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências*. Universidade de São Paulo, São Paulo: 17-23, 47-49, 69-71, 78-81.

**Strefezzi RF, Kleeb SR, Xavier JG, Catão-Dias JL** (2009). Prognostic indicators for mast cell tumors. *Brazilian Journal of Veterinary Pathology*. **2** (2): 110-121.

**Strefezzi RF, Kleeb SR, Xavier JG, Catão-Dias JL** (2010). Avaliação da proliferação celular como indicador prognóstico para mastocitomas cutâneos caninos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. **30** (7): 559-565.

**Strefezzi RF, Kleeb SR, Xavier JG, Fukumasu H, Catão-Dias JL** (2012). The value of immunohistochemical expression of BAX in formulating a prognosis for canine cutaneous mast cell tumours. *Journal of Comparative Pathology*. **146**: 314-319.



**Suliman A, Lam A, Datta R, Srivastava RK** (2001). Intracellular mechanisms of TRAIL: apoptosis through mitochondrial-dependent and -independent pathways. *Oncogene*. **20**: 2122-2133.

**Sun C, Wang B, Hu C, Peng R, Gao Y, Gu Q, Wang D** (2002). Expression of the bcl-2 gene and its significance in human pancreatic carcinoma. *Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International*. **1**: 306-308.

**Sun H, Li H, Zou Z, Shi X** (2011). Protective effects of hydroxyethyl starch 130/0.4 against myocardial ischemia/reperfusion injury rats. *Chinese Medical Journal*. **124** (2): 291-297.

**Sung-Hye P, Han KK, Hanseong K, Jae YR** (2002). Apoptosis in Thymic Epithelial Tumors. *Pathology, Research & Practice*. **198**: 461-467.

**Susin SA, Daugas E, Ravagnan L, Samejima K, Zamzami N, Loeffler M, Costantini P, Ferri KF, Irinopoulou T, Prévost MC, Brothers G, Mak TW, Penninger J, EARNSHAW WC, Kroemer G** (2000). Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis. *Journal of Experimental Medicine*. **192** (4): 571-579.

**Taheri ZM, Mehrafza M, Mohammadi F, Khoddami M, Bahadori M, Masjedi MR** (2008). The Diagnostic Value of Ki-67 and repp86 in Distinguishing Between Benign and Malignant Mesothelial Proliferations. *Archives of Pathology & Laboratory*. **132**: 694-697.

**Takeuchi Y, Fujino Y, Watanabe W, Takahashi M, Nakagawa T, Takeuchi A, Bonkobara M, Kobayashi T, Ohno K, Uchida K, Asano K, Nishimura R, Nakayama H, Sugano S, Ohashi Y, Tsujimoto H** (2013). Validation of the prognostic value of histopathological grading or c-Kit mutation in canine cutaneous mast cell tumours: A retrospective cohort study. *The Veterinary Journal*. **196**: 492-498.

**Teng S, Hsu W, Chiu C, Wong M, Chang S** (2012). Overexpression of P-glycoprotein, STAT3, phospho-STAT3 and KIT in spontaneous canine cutaneous mast cell tumours before and after prednisolone treatment. *The Veterinary Journal*. **193**: 551-556.

**Theoharides TC, Conti P** (2004). Mast cells: the Jekyll and Hyde of tumor growth. *Trends in Immunology*. **25 (5)**: 235-241.

**Tóth Š, Pomfy M, Wohlfahrt P, Pingorová S, JánKišš J, Baláž P, Rokošný S, Beňačka R, Veselá J** (2007). Detection of early stages of apoptosis in experimental intestinal ischemia-reperfusion injury. *Biologia, Bratislava*. **62(4)**: 491-497.

**Trump BE, Berezsky IK, Chang SH, Phelps PC** (1997). The pathways of cell death : oncosis, apoptosis, and necrosis. *Toxicologic Pathology*. **25 (1)**: 82-88.

**Tzu-Yin L, London CA** (2006). A functional comparison of canine and murine bone marrow derived cultured mast cells. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. **114**: 320-334.

**Valva P, Matteo E, Galoppo M, Pedreira A, Giacove G, Lezama C, Marco I, Galoppo MC, Preciado MV** (2008). Apoptosis markers in liver biopsy of nonalcoholic steatohepatitis in pediatric patients. *Human Pathology*. **39**: 1816-1822.

**Vanags DM, Porn-Ares MI, Coppola S, Burgess DH, Orrenius S** (1996). Protease involvement in fodrin cleavage and phosphatidylserine exposure in apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry*. **271**: 31075-31085.

**Vascellari M, Giantin M, Capello K, Carminato A, Morello EM, Vercelli A, Granato A, Buracco P, Dacasto M, Mutinelli F** (2012). Expression of Ki-67, BCL-2 and COX-2 in Canine Cutaneous Mast Cell Tumors: Association With Grading and Prognosis. *Veterinary Pathology*. 1-12.

**Vempati UD, Diaz F, Barrientos A, Narisawa S, Mian AM, Millán JL, Boise LH, Moraes CT** (2007). Role of cytochrome c in apoptosis: increased sensitivity to tumor necrosis factor alpha is associated with respiratory defects but not with lack of cytochrome c release. *Molecular and Cellular Biology*. **27 (5)**: 1771-1783.

**Wang KKW, Posmantur R, Nath R, McGinnis K, Whitton M, Talanian RV, Glantz SB, Morrow JS** (1998). Simultaneous Degradation of  $\alpha$ - and  $\beta$ -Spectrin by Caspase 3(CPP32) in Apoptotic Cells. *The Journal of Biological Chemistry* . **273 (35)**: 22490-22497.

**Webster JD, Yuzbasiyan V, Miller RA, Kaneene JB, Kiupel M** (2007). Cellular Proliferation in Canine Cutaneous Mast Cell Tumors: Associations with c-KIT and Its Role in Prognostication. *Veterinary Pathology*. **44**: 298-308.

**Weinmann M, Marini P, Jendrossek V, Betsch A, Goecke B, Budach W, Belka C** (2004). Influence of trail-induced apoptosis in tumor cells. *International Journal of Radiation Oncology Biology and Physics* . **58 (2)**: 386-396.

**Welle M** (1197). Development, significance, and heterogeneity of mast cells with particular regard to the mast cell-specific proteases chymase and tryptase. *Journal of Leukocyte Biology*. **61**: 233-45.

**Whitfield SG, Fekadu M, Shaddock JH, Niezgodá M, Warner CK, Messenger SL, Group RW** (2011). A comparative study of the fluorescent antibody test for rabies diagnosis in fresh and formalin-fixed brain tissue specimens. *Journal of Virological Methods*. **95**: 145–151.

**Withrow SJ, Vail DM** (2007). *Small animal clinical oncology*. (4<sup>a</sup> edição). Missouri, Saunders Elsevier: 402-416.

**Woldehiwet Z** (2004). Clinical laboratory advances in the detection of rabies virus. *Clinica Chimica Acta*. **351**: 49–63.

**Wong RS** (2011). Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. **30**: 87.

**Woo M, Hakem R, Soengas MS, Duncan GS, Shahinian A, Kagi D, Hakem A, McCurrach M, Khoo W, Kaufman SA, Senaldi G, Howard T, Lowe SW, Mak TW** (1998). Essential contribution of caspase 3/ CPP32 to apoptosis and its associated nuclear changes. *Genes & Development*. **12**: 806-819.

**Zappulla JP, Arock M, Mars LT, Liblau RS** (2002). Mast cells: new targets for multiple sclerosis therapy?. *Journal of Neuroimmunology*. **131**: 5-20.

**Zarnescu O, Brehar FM, Bleotu C, Gorgan RM** (2011). Co-localization of PCNA, VCAM-1 and caspase-3 with nestin in xenografts derived from human anaplastic astrocytoma and glioblastoma multiforme tumor spheres. *Micron*. 1-8.

**Zeiss CJ** (2003). The apoptosis-necrosis continuum: insights from genetically altered mice. *Veterinary Pathology*. **40**: 481-495.

**Zemke D, Yamini B, Yuzbasyan-Gurkan V** (2002). Mutations in the Juxtamembrane Domain of c-kit are Associated with Higher Grade Mast Cell Tumors in Dogs. *Veterinary Pathology*. **39 (5)**: 529-35.