

UNIVERSIDADE PAULISTA

**EXPRESSÃO SÉRICA DE *KIT* COMO UM POTENCIAL
MARCADOR TUMORAL EM MASTOCITOMAS
CUTÂNEOS CANINOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista - UNIP, para a obtenção do título de Doutor em Patologia Ambiental e Experimental.

BEATRIZ DE BEM KERR MARTINS

SÃO PAULO

2016

UNIVERSIDADE PAULISTA

**EXPRESSÃO SÉRICA DE *KIT* COMO UM POTENCIAL
MARCADOR TUMORAL EM MASTOCITOMAS
CUTÂNEOS CANINOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista - UNIP, para a obtenção do título de Doutor em Patologia Ambiental e Experimental.

Orientador: Prof. Dr. José Guilherme Xavier.

BEATRIZ DE BEM KERR MARTINS

SÃO PAULO

2016

Martins, Beatriz de Bem Kerr.

Expressão sérica de kit como um potencial marcador tumoral em mastocitomas cutâneos caninos / Beatriz de Bem Kerr Martins. - 2016.
46 f. : il. color.

Tese de Doutorado Apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista, São Paulo, 2016.

Área de Concentração: Biologia da Diferenciação e Transformação Celular: Modulação por Fatores Endógenos e Exógenos.
Orientador: Prof. Dr. José Guilherme Xavier.

1. Cães. 2. KIT. 3. Marcador Tumoral. 4. Mastocitoma. I.
Xavier, José Guilherme (orientador). II. Título.

BEATRIZ DE BEM KERR MARTINS

**EXPRESSÃO SÉRICA DE *KIT* COMO UM POTENCIAL
MARCADOR TUMORAL EM MASTOCITOMAS
CUTÂNEOS CANINOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista - UNIP, para a obtenção do título de Doutor em Patologia Ambiental e Experimental.

Aprovado em:

BANCA EXAMINADORA

_____/_____
Prof. Dr. José Guilherme Xavier (Orientador)
Universidade Paulista – UNIP

_____/_____
Prof. Dr. Mario Mariano
Universidade Paulista – UNIP

_____/_____
Prof. Dr. Aloisio Cunha de Carvalho
Universidade Paulista – UNIP

_____/_____
Profa. Dra. Renata Sobral
Universidade de São Paulo – USP

_____/_____
Prof. Dra. Maria Carolina Andrade de Azevedo
Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP

DEDICATÓRIA

A Deus, por ser essencial em minha vida, autor de meu destino, meu guia, socorro presente na tribulação, minha fonte de refúgio e sabedoria nas horas fáceis e difíceis.

À minha mãe, Maria Ignez de Bem, agradeço pelo apoio e amor incondicional.

À minha avó, Flora de Bem, por tanto carinho e sabedoria diante da vida.

Ao meu amado pai, Manoel Kerr Martins, que deixou eternas saudades.

AGRADECIMENTOS

Antes de tudo, quero agradecer a Deus, por ter abençoado todos os dias da minha vida, por iluminar meu caminho e me dar forças para seguir sempre em frente.

À Faculdade de Medicina Veterinária, da Universidade Paulista de São Paulo (UNIP) que proporcionou minha graduação, mestrado e agora, o doutorado.

Agradeço ao professor Dr. José Guilherme Xavier, os ensinamentos e a oportunidade de tê-lo como orientador de Doutorado.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa - CNPq que me concedeu uma bolsa, durante a realização deste doutorado, fato este que muito contribuiu para a viabilização desta tese. Portanto, deixo aqui expresso meu agradecimento.

À FAPESP, pelo auxílio financeiro concedido para a realização deste trabalho.

À toda minha família pelo apoio, torcida e confiança que sempre depositam em mim; pelos momentos que não estivemos juntos e souberam entender. Obrigada!

Às demais pessoas que contribuíram direta ou indiretamente na elaboração deste trabalho ou participaram da minha vida, e que, por ventura, eu tenha me esquecido de agradecer.

E por fim, porém não menos importante, a todos os animais que participaram deste estudo, pois doaram seu amor, carinho, respeito, lealdade, companheirismo, e principalmente confiança em nosso trabalho, fazendo com que essa pesquisa se tornasse viável.

“Miracles happen outside the comfort zone of our rational mind. To connect with them, we need to get a little illogical, and yes – a little uncomfortable.”

Yehuda Berg

RESUMO

O presente trabalho foi feito para estudar o potencial da expressão de RNAm de c-kit no soro de cães portadores de mastocitomas (MCT) como um marcador tumoral dessas neoplasias, utilizando a transcrição reversa e a reação em cadeia da polimerase quantitativa (RT-qPCR). O estudo foi realizado com 48 animais, sendo dez livres de neoplasia, usados como grupo controle e 38 portadores de MCT. As amostras de sangue desses pacientes foram obtidas por punção venosa e criopreservadas em tubos contendo EDTA. O RNA total foi extraído, realizada a transcrição reversa do cDNA e a PCR quantitativa. O diagnóstico foi feito por citologia ou histopatologia, sendo nesses casos procedida a graduação e a pesquisa da imunoexpressão de KIT. O nível de transcrição de c-kit foi normalizado usando a expressão de β 2- microglobulina, sendo a expressão relativa calculada pelo método $\Delta\Delta CT$. A expressão de c-kit foi detectada em 72,9% das amostras, incluindo todas as amostras do grupo controle e 25 dos portadores MCT, tratados ou não, com superexpressão em 76% dos casos ($p < 0,01$, teste de Mann-Whitney). Nos seres humanos com mastocitoma os níveis de KIT, em particular, parecem refletir a extensão e a gravidade da doença. Neste trabalho observamos que a expressão e quantificação do c-kit no sangue periférico destes cães é um método promissor para identificar portadores de MCT, submetidos ou não à quimioterapia.

Palavras-chave: Cães. *KIT*. Marcador Tumoral. Mastocitoma.

ABSTRACT

The present work was carried out to study the potential of serum expression of *KIT* mRNA as a tumoral marker in mast cell tumor (MCT), using reverse transcription and quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) on blood samples. This study was performed with 48 animals, 10 without tumoral disease and 38 dogs with MCT. Blood was obtained by venopuncture, and cryopreserved in tubes containing EDTA. The total RNA was extracted, reverse transcribed in cDNA and submitted to qPCR. Fifteen dogs underwent surgical excision of the tumor and the diagnosis of MCT was histologically confirmed, the lesions graduated and the immunoexpression of *KIT* evaluated. The level of *KIT* transcript was standardized using the expression of beta2-microglobulin, and the relative expression calculated by $\Delta\Delta CT$ method. The expression of *KIT* was detected in 72,9% of the samples, including all the control samples and 25 from MCT carriers, treated or not, with overexpression in 76% of the cases ($p < 0,01$, Mann-Whitney test). In humans with mastocytosis soluble *KIT* levels, in particular, seem to reflect the extent and severity of disease. Here we observed that peripheral blood *KIT* expression quantification is a promising method in order to identify MCT carriers, submitted or not to chemotherapy.

Keywords: Dogs. *KIT*. Mast Cell Tumor. Tumor Marker.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	9
1.1 Mastócito	9
1.2 Mastocitomas cutâneos em cães	10
1.2.1 Aspectos Clínicos, Incidência e Etiopatogenia.....	10
1.2.2 Etiopatogenia do Mastocitoma	13
1.2.3 Comportamento Biológico e Metástases	16
1.2.4 Diagnóstico	20
1.2.5 Marcadores Prognósticos em Mastocitomas.....	21
2 OBJETIVO(S).....	23
2.1 Geral(is)	23
2.2 Específico(s)	23
3 JUSTIFICATIVA	24
4 RELEVÂNCIA.....	25
5 ARTIGO	26
REFERÊNCIAS GERAIS	42

1 INTRODUÇÃO

1.1 Mastócito

Os mastócitos são células que compõem o tecido conjuntivo, encontrados em tecidos e órgãos que têm certo contato com o ambiente, incluído pulmões, mucosa do trato gastrintestinal, derme, região perivascular e eventualmente na medula óssea (LAVALLE et al., 2003). Estas apresentam à avaliação histológica um citoplasma repleto preenchido por material bastante abundante, as pleomórficas (variam desde fusiformes, esféricas ou estreladas). Têm núcleo redondo e grânulos citoplasmáticos nos quais estão contidos ácidos proteoglicanos, que se ligam a corante básicos. Alguns desses corantes, como os do tipo *Romanowsky*, assumem coloração diferente quando se ligam aos grânulos, do que quando ao DNA nuclear, sendo então chamados “metacromáticos” (O’KEEFE, 1990).

O mecanismo envolvido na regulação da quantidade dos mastócitos nos tecidos não é conhecido, assim como o mecanismo de acúmulo destas células sob algumas condições patológicas (O’KEEFE, 1990). Acredita-se que os mastócitos são originários de células hematopoiéticas pluripotentes (apesar de apresentarem características funcionais, morfológicas e bioquímicas diferentes) e que, elementos celulares progenitores migram da medula óssea para os tecidos periféricos como células imaturas e posteriormente, sofram diferenciação *in situ* (ABBAS et al., 2000). Os mastócitos maduros geralmente se apresentam com grânulos citoplasmáticos que podem variar em número e em conteúdo de acordo com o grau de diferenciação (O’KEEFE, 1990) e contêm substâncias biologicamente ativas, como histamina, enzimas proteolíticas, heparina, serotonina, fatores quimiotáticos e metabólitos do ácido araquidônico conferindo aos mastócitos um papel importante nas reações imunológicas, inflamatórias e alérgicas (RECH et al., 2004; GIEGER et al., 2005; TURIN et al., 2006; WELLE et al., 2008).

A ativação dos mastócitos sucede em três tipos de respostas biológicas: 1) a desgranulação, na qual o conteúdo pré-formado de seus grânulos é liberado por exocitose; 2) a síntese de mediadores químicos derivados de membranas celulares, como os metabólitos do ácido aracídônico; e 3) a transcrição, tradução e secreção de citocinas. A desgranulação pode ser desencadeada por estímulos físicos, químicos, neurológicos e imunológicos (ABBAS et al., 2000). As substâncias liberadas provocam vasodilatação, aumento de permeabilidade vascular, contração de células musculares lisas, secreção de muco, quimiotaxia de neutrófilos e eosinófilos, prurido, anticoagulação e destruição tecidual. São também capazes de produzir

leucotrienos e fator de necrose tumoral (TNF- α) quando ativados por anticorpos como IgE. Depois da desgranulação, têm membrana citoplasmática em excesso, pela fusão de membrana de grânulos (GILFILLAN; TKACZYK, 2006; TIZARD, 2009).

No homem, a proliferação de mastócitos e seu acúmulo em um ou mais órgãos é denominada mastocitose. Trata-se de uma desordem hematopoiética podendo se apresentar na forma cutânea ou sistêmica, com diversos comportamentos e formas de se manifestar clinicamente, compreendendo desde lesões de pele autolimitantes até doenças sistêmicas extremamente agressivas. Diferentemente do que ocorre em cães, sua incidência é baixa, podendo-se considerar rara (VALENT et al., 2001; HARTMANN et al., 2003; KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005).

Em cães, as principais doenças relacionadas com os mastócitos são as reações de hipersensibilidade tipo I, local e sistêmica, e os mastocitomas (CULLEN; PAGE; MISDORP, 2002; TIZARD, 2009).

Sendo assim, a mastocitoma, ou o sarcoma dos mastócitos, são as neoplasias compostas por células de mastócitos (LAVALLE et al., 2003).

1.2 Mastocitomas cutâneos em cães

1.2.1 Aspectos Clínicos, Incidência e Etiopatogenia

Mastocitomas são tumores derivados de mastócitos, compreendendo de 7% a 21% das neoplasias cutâneas de cães (MACY, 1985). A idade média de ocorrência é de 8 a 9 anos, não havendo relatos de predisposição sexual (PATNAIK et al., 1984). As raças mais predispostas são as que apresentam o buldogue como ancestral, destacando-se a Boxer, a Boston Terrier e a English Bulldog.

Merecem referência ainda os retrievers, como o Labrador e o Golden, além dos Beagles, Fox Terrier, Schnauzer, Cocker Spaniel, Staffordshire terrier, Dachshund, Schnauzer, Rhodesian Ridgebacks e cães sem raça definida (PATNAIK et al., 1984; SIMÕES et al., 1994; GOLDSCHIMIDT; HENDRICK, 2002; SÉGUIN, 2001; STREFEZZI et al., 2003; MISDORP, 2004; RECH et al., 2004; WELLE et al., 2008). Nos animais da raça Sharpei, contrariamente ao relatado à dos Boxers, o surgimento da neoplasia é mais precoce, com comportamento biológico mais agressivo e prognóstico mais reservado (MACY, 1985; MILLER, 1995).

Figura 1 – Cão da raça Sharpei com mastocitoma cutâneo de Grau 3/Alto Grau na forma disseminada. Diversas lesões ulcerativas, nodulares e eritematosas



Fonte: Arquivo pessoal.

Embora haja relatos de mastocitomas primários de vísceras, como o baço, fígado, rins, laringe, trato gastrintestinal e linfonodos, os sítios primários mais importantes e frequentes são a derme e o subcutâneo, sendo raras as manifestações primárias em outros sítios (O'KEEFE, 1990), apesar de serem encontradas inúmeras células de mastócitos no trato gastrintestinal e no trato respiratório (LONDON; SÉGUIN, 2003). Os tumores viscerais, na sua maioria, são precedidos de tumores cutâneos indiferenciados, representando uma disseminação tumoral (LONDON; THAMM, 2013).

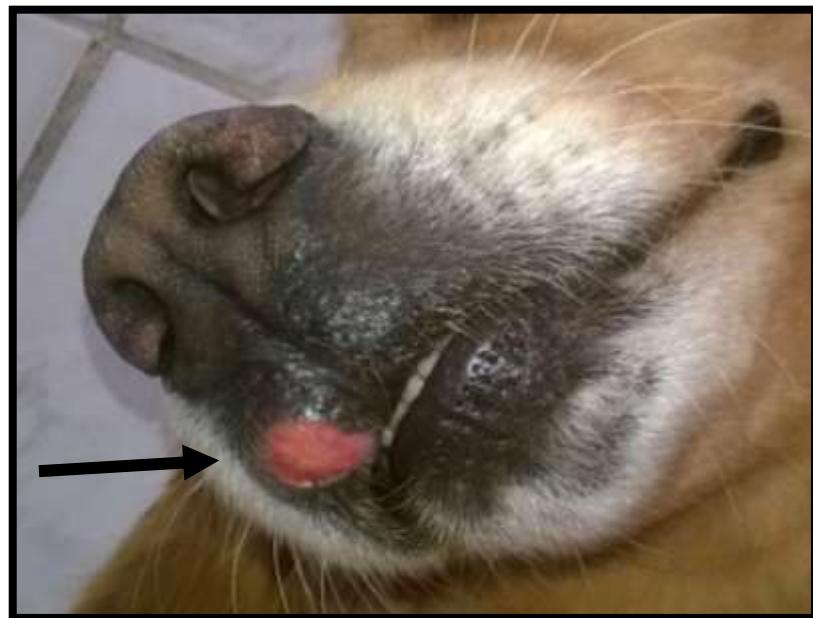
Também rara é a ocorrência de leucemia primária de mastócitos, mais comumente sendo resultado da disseminação sistêmica de mastocitomas cutâneos (MCMANUS, 1999; LONDON; SÉGUIN, 2003).

O mastocitoma não tem um padrão em seu aspecto clínico. Em geral, apresentam-se clinicamente como massas teciduais pequenas, firmes e bem circunscritas, podendo ou não serem eritematosos, alopecicos e/ou ulcerados, formando nódulos ou placas (GOLDSCHIMIDT; HENDRICK, 2002). Porém, podem também se apresentar com formas pouco definidas, macias e como lesões flutuantes, assemelhando-se a outros tumores, como o lipoma, por exemplo. Podem também serem grandes, difusas e envolver outros órgãos (LAVALLE et al., 2003).

A maioria dos relatos é de formações solitárias, porém há relatos entre 5% e 25% do acometimento de formações múltiplas. Esse evento não está bem elucidado; não se sabe se os tumores múltiplos são focos metastáticos ou se há alguma origem multicêntrica (TURIN et al., 2006). As raças mais predispostas a apresentarem a forma múltipla da doença são Pugs,

Boxers, Weimaraners, Goldens Retrievers e os Sharpeis (PATNAIK et al., 1984; GOLDSCHIMIT; HENDRICK, 2002). Strefezzi (2003) relatou uma incidência maior do acometimento em cães por lesões múltiplas (42,8%), enquanto os cães que apresentavam lesão única era de 57,2%.

Figura 2 – Cão da raça Golden Retriever com lesão de mastocitoma em região perilabial. Lesão única, em forma de placa e eritematosa



Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 3 – Pinscher apresentando mastocitoma em região posterior de membro posterior direito



Fonte: Arquivo pessoal.

O mastocitoma na forma cutânea já foi relatado em diversos locais de acometimento, porém as regiões mais afetadas são tronco e períneo em 50% a 63% dos casos; as extremidades correspondem a 33-40% dos casos, cabeça e pescoço de 10% a 15%. As lesões múltiplas em apenas 3-14% dos relatos (SIMÕES et al., 1994; ABADIE; ARMADEILH; DELVERDIER, 1999; LONDON; SÉGUIN, 2003).

Relatos mais recentes de Strefezzi (2001) encontram a região de extremidades/membros como os locais mais comum de acometimento dos mastocitomas (54,2%).

Uma correlação entre grau de agressividade e localização da neoplasia pode ser estabelecida. É o que sugerem Ogilvie e Moore (1995) e Kiupel et al. (2005). Tumores localizados em região prepucial, inguinal e perineal apresentam um comportamento mais agressivo e um pior prognóstico (OGILVIE; MOORE, 1995, KIUPEL et al., 2005) complementam com a região de junção mucocutânea.

1.2.2 Etiopatogenia do Mastocitoma

A etiopatogenia, os eventos moleculares e genéticos que cooperam para tumorigênese, desenvolvimento e progressão do mastocitoma, ainda são desconhecidos, porém, acredita-se que haja um embasamento multifatorial (LONDON; THAMM, 2013). Algumas das etiologias aventadas estão associadas com a inflamação cutânea crônica que poderia levar ao surgimento do mastocitoma. Porém, na literatura, é escasso o relato de casos correlacionados a dermatite crônica, feridas crônicas ou aplicação de substâncias irritantes com o desenvolvimento do mastocitoma (GOVIER, 2003).

Misdorp (2004) correlaciona a causa hereditária e/ou viral com a inflamação crônica, uma vez que esse tumor apresentaria uma capacidade de ser transplantado para cães de experimentação imunocomprometidos por meio de extrato celulares, porém partículas virais não foram evidenciadas, o que desembasa essa possível etiologia.

Raças descendentes de Bulldog têm alta incidência de mastocitoma, e esta pode estar relacionada com uma fragilidade cromossômica. Foram detectadas fragilidades cromossômicas, com instabilidades nos cromossomos 3, 4 e 15, o que poderia justificar uma possível etiologia hereditária. Porém essas alterações foram interpretadas como consequências da idade avançada dos animais, e não uma síndrome racial específica ou doença familiar transmitida hereditariamente (STONE; JACKY; PRIEUR, 1991; GINN et al., 2000).

Possivelmente o desenvolvimento do tumor deriva de outros fatores, como agentes virais ou agentes carcinogênicos (MACY, 1985).

Algumas pesquisas salientam que um dos possíveis fatores de risco para o mastocitoma seriam as mutações nos receptores de estrógeno e progesterona. Porém, ainda sem um completo entendimento na etiopatogênese do tumor, alguns estudos destacam uma influência destes hormônios na função dos mastócitos (ELLING; UNGEMACH, 1982), o que não foi confirmado por Gerritsen et al. (1998) e que não encontrou diferenças de expressão dos receptores de estrógeno e progesterona nestes animais.

As possíveis alterações genéticas que predispõem o animal ao desenvolvimento do mastocitoma ainda não são bem elucidadas. Em alguns relatos foram encontradas mutações no gene supressor da apoptose P53 de mastocitoma, porém o sequenciamento em poucos casos não revelou essa mutação (GINN et al., 2000). Em alguns relatos, a presença de p53 no interior de células de mastocitomas não oferece uma indicação consistente ou confiável do curso clínico da doença do cão. Os tumores que não tinham células positivas para p53 ou tumores com uma elevada percentagem de células coradas para p53 foram dispersos através de todos os tipos histológicos de tumor avaliada. Isto indica que mesmo achados, imuno-histoquímicos negativos não são indicadores confiáveis (JAFFE et al., 2000).

Alterações na expressão das proteínas P21 e P27, inibidores de ciclina dependentes que contribuem para regulação do ciclo celular têm sido identificados em muitos mastocitomas caninos. A P21 pode ser induzida por vias P53-dependentes e independentes e sua expressão está relacionada com a diferenciação terminal. Em vários tipos tumores com comportamento agressivo, a expressão da P21 diminui, sendo causada por perda de função do P53. Isso poderia explicar o aumento do número de mastócitos por não permitir que estas células entrem em apoptose (WU; HAYASHI; INOUE, 2004).

É ampla a literatura que relata a existência de mutações no proto-oncogene KIT (c-kit/CD117), que codifica o receptor KIT, também denominado de receptor de *stem cell fator* (SCF) (LONDON et al., 1996; MISDORP, 2004; WU; HAYASHI; INOUE, 2004; WELLE et al., 2008). A principal mutação encontrada foi a duplicação (ITD-Internal Tandem Duplication), porém podem haver também deleções e mutações pontuais do domínio justamembrânico de KIT, principalmente encontradas no exon 11, intron 11 e exon 12 (LONDON et al., 1999).

KIT é um receptor de fator de crescimento localizado na membrana da célula que desencadeia proliferação e diferenciação celular. Normalmente é expresso nas células hematopoiéticas e mastócitos e codifica para o proto-oncogene *C-KIT* (MISDORP, 2004). Ma

et al. (1999) estudaram tecidos tumorais de sete cães e revelaram que três dos tumores continham um total de quatro mutações e pequenas deleções na justamembrana intracelular. Além disso, duplicação em duas de três linhagens celulares foram relatadas. London et al. (1999) também encontraram duplicações em aproximadamente 50% dos tumores estudados (5 de 11) envolvendo os exons 11 e 12, mas não foi evidenciado nenhum outro tipo de mutações. Ambos os grupos encontraram mutações em aproximadamente 50% dos tumores estudados e, embora não tenham sido idênticas, elas se encontravam na mesma área aproximada do C-KIT, sugerindo que essas mutações podem contribuir para o desenvolvimento ou progressão do mastocitoma canino.

Letard et al. (2008) avaliaram os tipos e as frequências das mutações do KIT em mastocitomas de 191 cães. O sequenciamento de transcrição reversa (RT-PCR) revelou alterações em 50 (26,2%) dos cães do estudo. A maior parte das mutações era no exon 11 (32). Porém, ainda sim, nove cães tinham mutações no exon 8 e oito tinham mutações no exon 9.

Zavodovskaya e equipe (2004) relataram mutação no exon 11, consistindo em duplicações cooperativas internas em 30% a 50% dos mastocitomas caninos grau II e III. A observação da presença da mutação no proto-oncogene do ckit do mastocitoma pode ser utilizada como marcador para determinar a origem molecular dos múltiplos tumores.

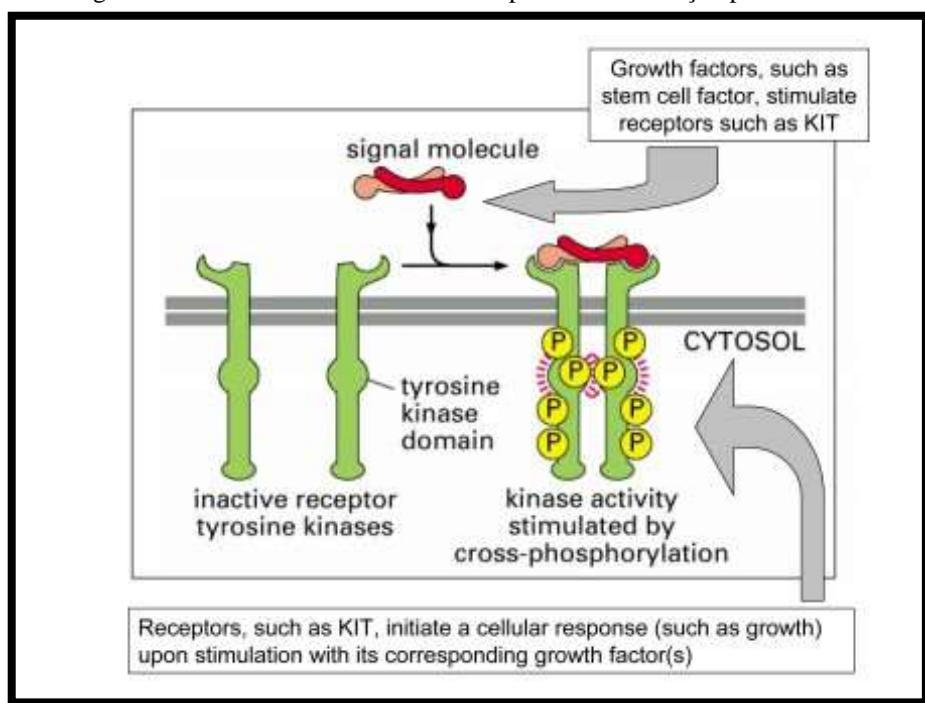
Pesquisas mostram que 15-40% dos cães com mastocitoma apresentam mutações no domínio justamembrana no gene do C-KIT (REGUERA et al., 2002; DOWNING et al., 2002; KIUPEL et al., 2004; WEBSTER et al., 2006;) e que a presença dessas mutações está altamente relacionada com neoformações de alto grau, pois consistem em ativação do KIT, o que resulta em cascadas de sinalização que levam a proliferação, sobrevivência e invasão tumoral (MA et al., 1999; LONDON; SEGUIN, 2003).

Há dois mecanismos propostos para a proliferação dos mastócitos: uma ligação dependente e a outra, uma ligação independente. Pouco se sabe sobre o mecanismo ligante dependente em mastocitomas. Porém o mecanismo ligante independente está associado a dois tipos de alterações: 1) a alteração do sequenciamento do gene do C-KIT(CD117) dentro do domínio da justamembranal do domínio conduzindo a sinalização constitutiva ou amplificada do KIT, o qual definitivamente resulta em uma proliferação e sobrevivência aberrante destas células que expressam estas mutações e desenvolvimento da neoplasia (ZAVODOVSKAYA et al., 2004); e 2) o mecanismo é explicado por uma superexpressão do C-KIT induzindo um aumento constante dos níveis dos receptores KIT ativado (RIVA et al., 2005; TURIN et al., 2006). O ligante específico para o receptor KIT (SCFR) é o SCF, uma citocina que, entre

outras funções, se liga no domínio extracelular causando dimerização do receptor, o qual induz a autofosforilação do domínio cinase e inicia respostas biológicas múltiplas sinalizando as vias (proliferação, migração, diferenciação dos mastócitos para a sobrevivência e ativação celular, as *stem cells* hematopoiéticas, as células germinativas, e os melanócitos) (WALTER, 2001; OZAKI et al., 2002; ZAVODOVSKAYA et al., 2004; TURIN et al., 2006).

Como apenas células hematopoiéticas e mastócitos expressam C-KIT, e histiócitos e melanócitos não, então tem sido usado como marcador imunoistoquímico para mastocitomas e também relacionadas com o prognóstico da doença no animal (LONDON et al., 1996, KIUPEL et al., 2004).

Figura 4 – Imagem ilustrativa de C- kit inativado e depois de sua ativação por fatores de crescimento



Fonte: <http://alfa-img.com/show/c-kit-cd117.html>

1.2.3 Comportamento Biológico e Metástases

O comportamento biológico dos mastocitomas em cães é extremamente variável, fazendo com que clínicos e cirurgiões os considerem como neoplasias potencialmente malignas (O'KEEFE, 1990; SIMÕES et al., 1994). Tumores bem diferenciados (constituídos por células semelhantes às células do tecido de origem) apresentam um comportamento geralmente benigno, com maior tempo de evolução, sem sinais clínicos sistêmicos e na maioria, encontram-se confinados à derme (GIEGER et al., 2005).

Tumores indiferenciados (assemelham-se à célula primitiva que lhe deu origem) têm uma evolução mais rápida, podendo manifestar sinais clínicos sistêmicos (isolados ou múltiplos), com maior taxa de metástase. Frequentemente apresentam macroscopicamente edema peritumoral, ulceração e eritema, podendo haver prurido local e/ou lambadura (GIEGER et al., 2005).

A maioria das complicações relacionadas ao mastocitoma geralmente advém da degranulação e liberação de substâncias vasoativas presentes nos grânulos, como a heparina, histamina, fator quimiotático de eosinófilo, enzimas proteolíticas e serotonina (GOLDSCHIMDT; HENDRICK, 2002).

Uma manifestação clássica em alguns relatos de mastocitoma é o *Sinal de Darier*, que se manifesta depois da manipulação mecânica durante o exame físico no paciente. Este degranula libera histamina e outras substâncias vasoativas que levam à vasodilatação local. Depois da manipulação são observados eritema e edema no tecido ao redor. Esse sinal também pode ocorrer de forma espontânea. Tutores relatam o aumento de tamanho e posteriormente diminuição do tumor. Formações de grau intermediário podem exibir comportamento dos tumores diferenciado ou indiferenciados (LONDON; THAMM, 2013).

Em relação às síndromes paraneoplásicas, úlceras gastrintestinais, distúrbio na coagulação e retardo na cicatrização são as mais relatadas. Uma das mais comuns é a ulceração gastrintestinal, porém raramente evolui para perfuração, podendo levar o paciente à anorexia, à emese, à hematoquesia, à melena, à anemia, à dor abdominal e, em casos mais graves, à perfuração gástrica ou duodenal e à peritonite (BLACKWOOD et al., 2012; LONDON; THAMM, 2013; MISDORP, 2004). A hipótese mais aceita para explicar o aparecimento dessas lesões é a de que a histamina liberada pelos mastócitos provocaria lesões endoteliais levando à liberação de fibrolisina e à lesão na vasculatura da submucosa gástrica, com consequente trombose e infarto nestas áreas (O'KEEFE, 1990). Hottendorf e Nielsen (1968), ao avaliarem 29 cães com mastocitoma na necropsia, encontram 24% (7/29) de cães com úlceras gastrintestinais. Um ano mais tarde, em 1969, Howard relatou ulcerações gastrintestinais em 83% (20/24) dos cães submetidos à necropsia.

Distúrbios de coagulação também podem ocorrer principalmente durante a manipulação cirúrgica, quando há excesso de desgranulação de histamina e outras substâncias vasoativas, o que pode resultar em uma hipotensão rebote, podendo evoluir para o choque, e trombocitopenias por coagulação intravascular disseminada. A liberação de heparina pelas células neoplásicas leva a uma alteração no tempo de coagulação, podendo ser observado principalmente durante o ato operatório e no pós-operatório imediato. O retardo na

cicatrização das áreas acometidas pelo tumor é atribuído aos efeitos das enzimas proteolíticas e aminas vasoativas liberadas pelo tumor levando à deiscência de sutura do local onde foi removido o tumor. A histamina se ligaria a receptores H1 e H2 de macrófagos resultando em liberação de fator supressor de fibroblastos, situação que prejudica a cicatrização local (MACY, 1985; BALDI et al., 2006).

Glomerulonefrite multifocal foi observada em 69% dos cães, caracterizada por infiltrados pericorpusculares de plasmócitos, acúmulo focal de material amorfo em membrana basal glomerular e espessamento da cápsula de Bowmann (HOTTENDORF; NIELSEN; 1968).

Em casos mais graves podemos encontrar choque anafilático resultante da degranulação súbita e liberação massiva de histamina das células neoplásicas. Apesar de incomum, é relatado na literatura nos animais que continham formas disseminadas da doença (LONDON; THAMM, 2013). A maioria destas complicações pode ser evitada com a diminuição da manipulação tumoral (MACY, 1985; O'KEEFE et al., 1990; LEMARIE et al., 1995; LONDON; THAMM, 2013).

Como já dito, o comportamento e a progressão do mastocitoma é bem variável, no entanto o grau histológico é o fator prognóstico mais importante para o mastocitoma (BLACKWOOD et al., 2012). Sendo assim, a histopatologia é necessária para confirmar o diagnóstico, graduar o tumor e determinar se as margens cirúrgicas estão livres de células neoplásicas, além de ser, muitas vezes, a única forma de fazer o diagnóstico definitivo de neoplasias pouco diferenciadas (O'KEEFE, 1990; FOX, 1998; SUEIRO et al., 2002; LAVALLE et al., 2003; RECH et al., 2004).

Em 1973, Bostock desenvolveu um critério de classificação em que os mastocitomas eram classificados em três categorias incluindo o diâmetro nuclear e citoplasmático, frequência de figuras de mitose, grau de pleomorfismo celular, natureza dos grânulos citoplasmáticos e celularidade. Em 1984, Patnaik et al. desenvolveram um trabalho semelhante, estabelecendo a classificação mais aceita hoje em dia: mastocitoma de grau I, II, e III, conforme o grau crescente de anaplasia celular. Mastocitoma grau I (bem diferenciado), II (moderadamente diferenciado) ou III (tumores pouco diferenciados). Ambos os pesquisadores relacionavam o prognóstico do portador dessa neoplasia com sua sobrevida, sendo sempre menor quanto maior o grau de malignidade do tumor.

Tabela 1 – Sistema de Graduação Patnaik et al. (1984).

Grau	Critérios Histológicos
I Bem Diferenciado	Células redondas monomórficas com citoplasma distinto, grânulos intracitoplasmáticos médios, ausência de figuras de mitoses, grupos compactos ou linhas de células neoplásicas confinadas a derme.
II Moderadamente Diferenciado	Algumas células pleomórficas na forma redondas à ovóides. Algumas células apresentam menos distinção citoplasmática com grânulos intracitoplasmáticos grandes e hiperchromáticos, porém outras possuem citoplasma distinto com pequenos grânulos. Áreas de edema ou necrose são notados. Figuras mitóticas são 0-2 por campo de grande aumento. Tumor infiltrando derme inferior / tecido subcutâneo.
III Pouco Diferenciado	Folhas densas de células pleomórficas com citoplasma indistinto com pequenos ou ausência de grânulos intracitoplasmáticos. Figuras de mitoses são de 3-6 por campos de grande aumento. Edema, hemorragia, necrose e ulceração são comuns. Tumor infiltrando derme inferior / tecido subcutâneo.

Fonte: Sistema de Graduação Patnaik et al. (1984).

A maioria dos mastocitomas grau I é benigna, se desenvolve lentamente e pode persistir até por anos, sem apresentar evolução ou progressão. Menos de 10% desses tumores metastatizam, e tumores de grau I, em geral, não são susceptíveis de causar a morte do paciente. Tumores de grau III mostram um crescimento agressivo e têm alta porcentagem de recidivas. Mais de 80% de tumores de grau III metastatizam e frequentemente levam o paciente ao óbito. O prognóstico para a classe de mastocitomas grau II é bem variável. Muitos podem ser curados por cirurgia e 5-22% dos tumores de grau II metastatizam. No entanto, os tumores de grau II podem levar à morte em 17-56% dos casos devido à falha do tratamento local ou doença metastática. Além do comportamento imprevisível de tumores de grau II, classificação histopatológica é subjetiva, resultando em variação de classificação entre patologistas. Vários estudos, incluindo um recente estudo em 95 cães, mostraram que a concordância entre patologistas foi de 75% para o diagnóstico da classe III MCT, e menos de 64% para o diagnóstico de grau I e II. O sistema de estadiamento clínico da Organização Mundial da Saúde (OMS) para os mastocitomas caninos não se correlaciona claramente com prognóstico, por isso, não é usado rotineiramente. Para melhorar a concordância entre patologistas, um sistema de graduação histológica de dois níveis tem sido sugerido

recentemente. Nesse sistema, o diagnóstico de alto grau de mastocitomas é baseado na presença de qualquer um dos seguintes critérios:

- (1) Pelo menos 7 figuras de mitose em 10 campos de grande aumento (HPF);
- (2) Pelo menos 3 células multinucleadas (3 ou mais núcleos) células em 10 HPF;
- (3) Pelo menos 3 núcleos bizarros em 10 HPF; e
- (4) Cariomegalia (diâmetros nucleares aumentados em pelo menos 10% do tamanho de células neoplásicas).

Todos os outros tumores são considerados de baixo grau. De acordo com o sistema de classificação, os mastocitomas de alto grau são significativamente associados com menor tempo de aparecimento de metástases ou desenvolvimento de novos tumores e com menor tempo de sobrevida. Relata-se que a média de sobrevida é inferior a quatro meses para os mastocitomas de alto grau, e mais do que dois anos para os tumores de baixo grau (BLACKWOOD et al., 2012). Tumores indiferenciados têm maior chance de fazer metástase, apresentando uma taxa de aproximadamente 55% a 96% de ocorrência (LEMARIE et al., 1995; CAHALANE et al., 2004; THAMM; VAIL, 2007).

Atualmente o sistema de Patnaik ainda é o mais usado sistema de classificação para o mastocitoma canino. No entanto, o sistema de duas vertentes descrito por Kiupel pode tornar-se mais amplamente adotado pelos patologistas (BLACKWOOD et al., 2012).

1.2.4 Diagnóstico

O mastocitoma integra o grupo dos tumores de células redondas juntamente com o linfoma, o histiocitoma, o tumor venéreo transmissível e o melanoma (DUNCAN; PRASSE, 1979). Recomenda-se a associação de métodos citológicos, histopatológicos e imuno-histoquímicos para o estabelecimento do diagnóstico e prognóstico dos mastocitomas. Em estudo retrospectivo com tumores de células redondas demonstrou-se elevada eficácia da citologia no diagnóstico desses processos (DUNCAN; PRASSE, 1979). As técnicas histológicas são menos eficientes na evidenciação de granulação citoplasmática de mastócitos, mas fundamentais para a caracterização da distribuição das células tumorais, aspecto central na graduação de uma neoplasia infiltrativa como este (BOSTOCK, 1973; PATNAIK et al., 1984). Embora vários autores tenham proposto classificações histológicas para os mastocitomas, a mais adotada até o momento é a de Patnaik et al., 1984 (MACY, 1985; O'KEEFE, 1990; PULLEY; STANNARD, 1990; ROGERS, 1996; STREFEZZI et al., 2003),

constituindo-se o fator prognóstico mais importante nesses processos (GIEGER et al., 2005). Nesta, os tumores são divididos em graus de acordo com a distribuição e as características morfológicas das células tumorais. Assim, neoplasmas de grau I apresentam baixa celularidade, sendo compostos por mastócitos bem diferenciados, distribuídos em fileiras, com limites citoplasmáticos bem definidos e núcleo hiperchromático restritos à derme superficial e interfolicular. Os de grau II exibem celularidade moderada, sendo compostos por células moderadamente pleomórficas, com núcleos redondos ou indentados, cromatina frouxa e limites citoplasmáticos imprecisos, distribuídos difusamente pela derme e/ou tecido subcutâneo e musculatura. Já os de grau III são hipercelulares, constituídos por população celular pleomórfica, com eventuais células gigantes e elevada atividade mitótica. Extensas áreas de hemorragia e necrose acompanham o tumor que invade o tecido subcutâneo e adjacências (PATNAIK et al., 1984). A sobrevida média relaciona-se com o grau histológico tumoral, assim animais com tumor de grau I apresentam sobrevida média de 51 semanas depois do diagnóstico, os de grau II, 28 semanas e os de grau III, 18 semanas (SIMÕES et al., 1994). Mais recentemente, em razão da elevada incidência e da baixa eficácia prognóstica em mastocitomas cutâneos de grau II, uma nova classificação foi proposta por Kiupel et al. (2011) dividindo as neoplasias em processos de alto e baixo grau de malignidade, admitindo-se como critérios centrais para distinção a atividade proliferativa e as atipias celulares no tecido tumoral. Os cães portadores de mastocitomas de alto grau exibiram redução no período livre de doença e na sobrevida.

1.2.5 Marcadores Prognósticos em Mastocitomas

A avaliação histológica encerra certo grau de subjetividade, existindo variações interobservador (STREFEZZI et al., 2003), além de casos com características limítrofes entre graus distintos. Assim, é importante o emprego de métodos auxiliares com valor prognóstico. São particularmente relevantes nos mastocitomas os marcadores de proliferação celular, destacando-se as AgNORs e o Ki-67. Em estudo de Scase et al. (2006), evidenciou-se a possibilidade de predizer a evolução da doença com o uso de dois marcadores de proliferação celular: as AgNORs e o Ki-67. Abadie et al. (1999) demonstraram a relação inversa entre a expressão de Ki-67 e a sobrevida em cães portadores de mastocitomas. A identificação de mutação em p53 mostrou-se de pouca utilidade prognóstica em mastocitomas de cães (GINN et al., 2000). Ranieri et al. (2003) evidenciaram correlação entre grau de malignidade, densidade microvascular, densidade mastocitária e prognóstico em mastocitomas caninos.

Preziosi et al. (2004), Carreira et al., (2007) corroboraram a diferença entre a vascularização em tumores de grau I e III de malignidade. Estudos recentes têm evidenciado também uma relação inversa entre a expressão de c-kit nas células tumorais e a sobrevida do animal (KIUPEL et al., 2004). Também na nova classificação proposta por Kiupel et al. (2011) animais com tumores de baixo grau apresentaram sobrevida média superior a dois anos, enquanto os portadores de mastocitomas de alto grau exibiram sobrevida média inferior a quatro meses.

2 OBJETIVO(S)

2.1 Geral(is)

Promover o bem-estar animal qualificando o diagnóstico laboratorial de doenças oncológicas em pequenos animais por meio da pesquisa de parâmetros prognósticos em neoplasias de elevada incidência em cães.

2.2 Específico(s)

- Investigar, quantitativamente, a expressão de KIT no sangue periférico de cães hígidos;
- Investigar, quantitativamente, a expressão de KIT no sangue periférico de cães portadores de mastocitomas, por PCR-RT;
- Comparar os níveis sanguíneos de KIT em cães hígidos e em portadores de mastocitomas; e
- Comparar padrão de imunomarcação no tecido neoplásico com expressão de KIT no sangue.

3 JUSTIFICATIVA

Os mastocitomas cutâneos estão entre os processos oncológicos mais frequentes em cães, justificando-se, em razão da elevada morbidade e mortalidade, a busca por indicadores prognósticos e potenciais alvos terapêuticos.

4 RELEVÂNCIA

Com o crescimento do número de cães domiciliados, associado ao aprimoramento das técnicas de manejo, alimentação, profilaxia e terapêutica de condições mórbidas, proporcionando uma elevação na expectativa de vida dos animais, a procura pelo atendimento oncológico vem crescendo, suscitando o desenvolvimento de recursos diagnósticos, prognósticos, preditivos e terapêuticos adicionais. Nesse sentido, este projeto visa contribuir com a aplicação de um potencial marcador de agressividade biológica, já empregado em diversas malignidades na espécie humana, em pacientes oncológicos caninos, averiguando sua adequação e aplicabilidade nessa espécie. Salienta-se que essa é uma informação inédita, apresentando potencial para publicação em periódicos internacionais da área.

5 ARTIGO

Expressão sérica de *KIT* como um potencial marcador tumoral em mastocitomas cutâneos caninos¹

Beatriz B. Kerr Martins,^{2*} Lucia Maria Guedes Silveira,³ Silvia Regina Kleeb,⁴ Flavio Canellas Canavez,⁵ Juliana Moreira de Sousa Canavez⁵ e José Guilherme Xavier.^{2,4}

MARTINS, B. B. K.; KLEEB, S. R.; CANAVEZ, F. C.; CANAVEZ, J. M. S.; SILVEIRA, L. M. G. et al., 2016. [Serum expression of *KIT* in canine cutaneous mast cell tumor as a potential tumor marker.] Expressão sérica de *KIT* como um potencial marcador tumoral. Pesquisa Veterinária Brasileira 00(0):00-00. Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Paulista de São Paulo, Rua Dr. Bacelar, 1212, Vila Clementino, SP 04026-002, Brasil. E-mail: biakerr86@gmail.com

Abstract: The present work was carried out to study the potential of serum expression of *KIT* mRNA as a tumoral marker in canine cutaneous mast cell tumor (MCT), using reverse transcription and quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) on blood samples. This study was performed with 48 animals, 10 without tumoral disease and 38 dogs with MCT. Blood was obtained by venopuncture, and cryopreserved in tubes containing EDTA. The total RNA was extracted, reverse transcribed in cDNA and submitted to qPCR. Fifteen dogs underwent surgical excision of the tumor and the diagnosis of MCT was histologically confirmed, the lesions graduated and the immunoexpression of *KIT* evaluated. The level of *KIT* transcript was standardized using the expression of β 2-microglobulin, and the relative expression calculated by $\Delta\Delta CT$ method. The expression of *KIT* was detected in 72,9% of the samples, including all the control samples and 25 from MCT carriers, treated or not, with overexpression in 76% of the cases ($p<0,01$, Mann-Whitney test). In humans with mastocytosis soluble *KIT* levels, in particular, seem to reflect the extent and severity of disease. Here we observed that peripheral blood *KIT* expression quantification is a promising method in order to identify MCT carriers, submitted or not to chemotherapy.

Keywords: Dogs; *KIT*; Mast Cell Tumor; Tumor Marker.

¹ Recebido em.....

Aceito para publicação em.....

² Programa de Pós-graduação em Patologia Ambiental e Experimental, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Paulista de São Paulo (UNIP), Rua Dr. Bacelar, 1212, Vila Clementino, SP 04026-002, Brasil. Pesquisa de doutorado com apoio CAPES e FAPESP.

* Autor para correspondência: biakerr86@gmail.com

³ Hospital Veterinário Universidade Paulista, Av. Tenente Júlio Prado Neves, 965 - São Paulo - SP, 02370-000.

⁴ Escola de Ciências Médicas, Universidade Metodista de São Paulo (UMESP), Av. Dom Jaime de Barros Câmara 1000, Bairro Planalto, São Bernardo do Campo, SP.

⁵ Laboratório Genoa Biotecnologia. Av. Angélica, 2318 - Consolação, São Paulo - SP, 01228-904.

Resumo: Neste trabalho buscou-se avaliar o potencial da expressão de RNAm de *KIT* no soro de cães portadores de mastocitomas cutâneos (MCT) como um marcador tumoral dessas neoplasias, usando a transcrição reversa e a reação em cadeia da polimerase quantitativa (RT-qPCR). O estudo foi conduzido com 48 animais, sendo 10 livres de neoplasia, usados como grupo controle, e 38 portadores de MCT. As amostras de sangue desses pacientes foram obtidas por punção venosa e criopreservadas em tubos contendo EDTA. O RNA total foi extraído, feita a transcrição reversa do cDNA e a PCR quantitativa. O diagnóstico foi feito por citologia ou histopatologia, sendo nesses casos procedida a graduação e a pesquisa da imunoexpressão de *KIT*. O nível de transcrição de *KIT* foi normalizado usando a expressão de β 2-microglobulina, sendo a expressão relativa calculada pelo método $\Delta\Delta CT$. A expressão de *KIT* foi detectada em 72,9% das amostras, incluindo todas as amostras do grupo controle e 25 dos portadores MCT, tratados ou não, com superexpressão em 76% dos casos ($p<0,01$, teste de Mann-Whitney). Os seres humanos com mastocitoma, nos níveis de *KIT*, em particular, parecem refletir a extensão e gravidade da doença. Neste trabalho observamos que a expressão e a quantificação do *KIT* no sangue periférico desses cães é um método promissor para identificar portadores de MCT, submetidos ou não à quimioterapia.

Palavras-chave: Cães; *KIT*; Marcador Tumoral; Mastocitoma.

1. INTRODUÇÃO

Mastocitomas são tumores derivados de mastócitos, compreendendo de 7% a 21% das neoplasias cutâneas de cães (MACY, 1985). As raças mais acometidas são as que apresentam o buldogue como ancestral, destacando-se a Boxer e a Boston Terrier. Merecem referência ainda os retrievers, como o Labrador e o Golden, e animais da raça Sharpei, nas quais, em oposição ao relatado para os Boxers, o surgimento da neoplasma é mais precoce e o prognóstico mais reservado (MACY, 1985). Embora haja relatos de mastocitomas primários de vísceras, como o baço, o fígado, os rins, a laringe, o trato gastrintestinal e os linfonodos, os sítios primários mais importantes são a pele e o tecido subcutâneo, constituindo os mastocitomas cutâneos. Recomenda-se a associação de métodos citológicos, histopatológicos e imuno-histoquímicos para o estabelecimento do diagnóstico e prognóstico desses processos, sendo as classificações mais usadas as de Patnaik et al. (1984) considerando três graus, e a Kiupel et al. (2011) dividindo as neoplasias em processos de alto e baixo grau de malignidade. Turin et al. (2006) evidenciaram a expressão de *KIT* em animais portadores de mastocitomas, no tecido tumoral, e, em menor quantidade, no sangue periférico.

O proto-oncogene *KIT* codifica para um receptor transmembranal de 14,5kD denominado KIT ou receptor do fator de célula tronco, CD117 (MORINI et al., 2004). KIT desempenha várias funções durante o desenvolvimento fetal, sendo sua expressão constitutivamente preservada em células tronco embrionárias, relacionada à manutenção de seu estado indiferenciado e sua pluripotencialidade (LU et al., 2007). Em cães, a expressão de *KIT* é intensa em mastócitos, células intersticiais de Cajal e células de Purkinje, e de moderada a fraca em células epiteliais ductais e acinares mamárias e em epitélio endometrial (MORINI et al., 2004), apresentando-se em algumas neoplasias, como mastocitomas, tumores estromais gastrintestinais (GIST), carcinoma ovariano, mamários, seminomas e tumores melanocíticos (LONDON et al., 1996; BETTINI et al., 2003; FROST et al., 2003).

Neste estudo é quantificada a expressão de *KIT* no sangue periférico de cães portadores de mastocitomas cutâneos, avaliando-se seu potencial como um marcador tumoral.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Paulista-UNIP, sob o protocolo 004/09. Foram usadas amostras de tecido tumoral e de sangue de 38 cães portadores de mastocitomas cutâneos e de sangue de dez animais hígidos. Os dez animais do grupo controle foram provenientes do canil da Escola de Ciências Médicas e da Saúde da Universidade Metodista de São Paulo, sendo submetidos rotineiramente à avaliação clínica. No transcurso do projeto, dois destes vieram a óbito, corroborando-se a ausência de mastocitoma pela avaliação necroscópica. As amostras de sangue e tumorais dentro do grupo experimental foram predominantemente provenientes do setor de Cirurgia do HVET/UNIP e do setor de Oncologia do HOVET/UMESP. Foram critérios de inclusão a existência de diagnóstico prévio de mastocitoma, citológico ou histopatológico, e a presença do tumor, admitindo-se animais com ou sem tratamento. Os últimos receberam a associação de prednisona na dose de 1 mg/kg ao dia por via oral e vimblastina na dose de 2 mg/m², semanalmente, por via endovenosa, com número variado de ciclos no momento da amostragem. Foram excluídos do estudo cães com diagnóstico de mastocitoma que já haviam realizado a exérese tumoral. As amostras de tecido neoplásico, proveniente de biópsia ou de exérese, foram imediatamente imersas em solução de formol a 10%, procedendo-se posterior inclusão em parafina, sendo os blocos submetidos à microtomia, produzindo-se cortes com 4µm de espessura, corados pela hematoxilina-eosina. As lâminas foram examinadas em foto microscópio óptico Olympus BX60, com câmara Sony CCD-IRIS-RGD, procedendo-se o diagnóstico histopatológico e a graduação neoplásica por dois observadores (JGX, SRK), segundo os critérios estabelecidos por Patnaik et al. (1984) e Kiupel et al. (2011). As amostras neoplásicas foram submetidas à avaliação imuno-histoquímica pesquisando-se a expressão de *KIT*, empregando-se anticorpo policlonal de coelho anti-humano CD-117, DAKO, na diluição 1:200. Cortes histológicos de 4 µm foram dispostos em lâminas e submetidos à recuperação antigênica pelo calor em panela de pressão, contendo solução tampão de citrato de sódio a 0,01M, pH 6,5, por 5 minutos em ebulição. Após resfriamento da solução foi feita lavagem das lâminas em solução salina tamponada (PBS). Seguiu-se o bloqueio da peroxidase endógena através da incubação por 30 minutos em solução contendo 80% de álcool metílico e 20% de peróxido de hidrogênio 30 volumes, seguindo-se lavagem das lâminas por 3 vezes em PBS. A etapa seguinte foi a incubação com o anticorpo primário diluído em solução composta por 0,5 ml de azida sódica a 5%, 0,25 ml de albumina bovina fração V (Sigma) a 5% e 12 ml de PBS. As lâminas permaneceram em câmara úmida por 12 h a 4 °C. Retiradas as lâminas da

câmara úmida foi realizada a lavagem com pisseta contendo tampão TRIS-HCl ph 7,6. Seguiu-se a incubação com anticorpo secundário (ADVANCE HRP Link) e complexo peroxidase (ADVANCE HRP Enzyme). Depois da incubação as lâminas foram lavadas com pisseta contendo tampão TRIS-HCl pH 7,6. Para a revelação foi empregada solução contendo 20 µL do cromógeno diaminobenzidina para cada mL de cloridrato de imidazol ph 7,5 (Dako) sobre a lâmina, deixando reagir por um minuto. Seguiu-se a lavagem com tampão TRIS-HCl pH 7,6, contracorando-se pela hematoxilina, lavagem das lâminas em água corrente e um banho rápido em água amoniacal a 0,2%, desidratação, diafanização e montagem em resina sintética e lamínula. As amostras foram consideradas positivas a partir da expressão de *KIT* em ao menos 5% das células neoplásicas. A intensidade foi referida como forte, moderada ou fraca e a distribuição como focal (menor do que 30% das células), intermediária (entre 30% e 70% das células) e difusa (superior a 70% das células). Foi referida também a localização celular da marcação, considerando-se como alternativas a marcação citoplasmática, nuclear, membranal e paranuclear. As amostras de sangue periférico foram obtidas por punção venosa, recolhendo-se 2,0 ml de sangue em frasco contendo EDTA, sendo a amostra mantida sob congelação em nitrogênio líquido ou em solução de RNALater®, seguindo-se a realização da extração de RNA. O RNA total foi extraído a partir de 250 µL de sangue com Trizol (Invitrogen Life Technologies), segundo protocolo do fabricante. Em resumo, a amostra foi misturada com 750 µL de Trizol e incubada por cinco minutos à temperatura ambiente. Após esse período, adicionamos 0,2 volumes de clorofórmio, seguindo-se de agitação vigorosa e incubação por mais três minutos à temperatura ambiente. Após centrifugação da amostra (12.000 xg, 15 minutos, 4 °C), a fase aquosa superior foi transferida para outro tubo. A esta fase adicionamos um volume de isopropanol e incubamos por dez minutos. A amostra foi centrifugada (12.000 xg, 10 minutos, 4 °C), o sobrenadante desprezado e o precipitado lavado com 1 mL de etanol 75% (v/v) por centrifugação (7.500 xg, 5 minutos, 4 °C). Por fim, o etanol foi desprezado e o precipitado seco por 5 min à temperatura ambiente antes de ser ressuspensos em H₂O livre de RNase/DNase. A pureza e concentração do RNA foram mensuradas em espectrofotômetro (260/280 nM). Seguiu-se a síntese do cDNA: até 5µg de cada amostra de RNA total foi reversamente transcrita utilizando-se a enzima M-MLV transcriptase reversa e oligonucleotídeos randômicos (Invitrogen Life Technologies). Neste protocolo, o RNA total foi diluído em H₂O livre de nucleases em um volume final de 11 µL. A este volume foram acrescentados 1 µL de oligonucleotídeos randômicos (3 µg/µL) e 1 µL do mix de dNTPs (10nM). A amostra foi submetida a aquecimento a 65 °C por 5 minutos, e

em seguida colocada em gelo antes da adição de 4 μ L do tampão da enzima (5X) e 3 μ L de DTT (0,1M). Após incubação a 37 °C por 3 minutos, 1 μ L (200U) da enzima M-MLV transcriptase reversa foi adicionado, e a reação permaneceu a 37 °C por uma hora. Após este período a enzima foi inativada a 95 °C por 5 minutos. Ao volume final da reação de 20 μ L foram adicionados 80 μ L de água e o cDNA armazenado a –20 °C até o uso. A quantificação da expressão do gene *KIT* foi realizada em experimentos de PCR em tempo real. Para isso usamos a plataforma 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Este protocolo adota dois iniciadores não fluorescentes e uma sonda com dupla marcação que se anela à região localizada entre os iniciadores. Essa marcação dupla é formada por um fluoróforo que emite luz quando excitado e um *quencher* que absorve a luz emitida pelo fluoróforo. Durante os ciclos da PCR, a sonda é quebrada pela *Taq* polimerase na etapa de extensão do iniciador anelado. Esta quebra da sonda elimina a absorção pelo *quencher* da fluorescência emitida que pode ser então medida através de uma câmera situada na parte superior do equipamento. A quantificação da emissão absorvida pela câmera depois da quebra da sonda permite a quantificação indireta do DNA alvo contido na reação após cada ciclo da PCR. Experimentos iniciais de quantificação absoluta com o gene controle β 2-microglobulina validaram o cDNA antes da realização dos experimentos de quantificação do gene de interesse. Para quantificação relativa do gene *KIT* em estudo normalizamos a expressão deste em relação à expressão do gene controle β 2-microglobulina. Para cada animal foi feito um ensaio em duplicata. O nível de expressão de *KIT* foi obtido pela quantificação relativa através do método $\Delta\Delta CT$. Para tanto, empregamos a equação $\Delta\Delta CT = (CT$ gene alvo, mastocitoma – CT controle endógeno, mastocitoma) – (CT gene alvo, normal – CT controle endógeno, normal). Os níveis de expressão em vezes foram determinados por $2^{\Delta\Delta CT}$. Os iniciadores e sondas utilizados nas reações de qRT-PCR foram encomendados a Applied Biosystems. Os experimentos de qRT-PCR foram realizados em reações contendo 10 μ L do mix TaqMan Universal PCR Master Mix 2X, 1 μ L do ensaio 20X composto por sonda e iniciadores específicos, e 2 μ L de cDNA em um volume final de 20 μ L. A condição usual de programação dos ciclos foi um passo a 50 °C por 2 minutos, um passo a 94 °C por 10 minutos seguidos de 40 ciclos de 95 °C por 30 segundos e 60 °C por 60 segundos. Foi usado o *threshold* automático.

A comparação entre a expressão sérica de *KIT* nos grupos foi procedida por meio da análise de variância (ANOVA-Mann-Whitney).

3. RESULTADOS

Os dados referentes aos integrantes dos grupos controle e experimental, como raça, sexo, idade, presença ou não de tumor, graduação histológica, emprego ou não de quimioterapia, expressão de *KIT* no tumor e presença no sangue estão expressos no Quadro 1.

Quadro 1 – Relação de amostras avaliadas, considerando-se raça, sexo, idade, presença de mastocitoma, grau histológico tumoral, tratamento quimioterápico, imunomarcação de *KIT* no tumor e detecção de *KIT* no sangue, sendo: (-): ausente (+): presente, NA: não avaliado

Animal	Raça	Sexo	Idade (anos)	Tumor	Grau	Quimio	KIT tumor	KIT sangue
01	srd	F	5	-	-	-	NA	+
02	srd	F	3	-	-	-	NA	+
03	srd	M	4	-	-	-	NA	+
04	srd	M	6	-	-	-	NA	+
05	Labrador	M	4	-	-	-	NA	+
06	srd	M	7	-	-	-	NA	+
07	srd	M	8	-	-	-	NA	+
08	srd	M	5	-	-	-	NA	+
09	srd	M	7	-	-	-	NA	+
10	srd	F	12	-	-	-	NA	+
11	srd	F	8	+	I	-	I	-
12	srd	M	11	+	II	-	II	-
13	Labrador	M	9	+	II	-	III	-
14	srd	M	9	+	NA	-	NA	+
15	srd	F	NA	+	NA	-	NA	-
16	Boxer	M	NA	+	NA	-	NA	+
17	srd	M	14	+	II	-	II	-
18	Cocker Spaniel	F	10	+	III	-	II	+
19	Pit Bull	M	6	+	NA	-	NA	+
20	Boxer	M	7	+	I	-	I	-
21	Boxer	M	9	+	II	-	II	+
22	srd	M	NA	+	III	-	II	+
23	vizsla	F	5	+	NA	-	NA	+
24	srd	F	5	+	NA	-	NA	+
25	Dachshund	F	11	+	NA	-	NA	+
26	Rottweiler	M	11	+	I	-	I	+
27	Rottweiler	M	6	+	NA	-	NA	+
28	Dachshund	M	11	+	NA	+	NA	+
29	Cocker Spaniel	F	10	+	III	+	II	-
30	SRD	M	12	+	II	+	II	+
31	Boxer	M	8	+	II	+	I	-
32	Boxer	M	10	+	II	+	II	-
33	Bernese	M	7	+	II	+	II	-
34	srd	M	9	+	III	+	NA	-
35	srd	M	NA	+	II	+	II	-
36	Pinscher	M	14	+	NA	+	NA	+
37	srd	M	15	+	NA	+	NA	+
38	Pinscher	F	12	+	II	+	NA	-
39	Beagle	M	11	+	NA	+	NA	+
40	Terrier Brasileiro	M	6	+	NA	+	NA	+
41	Boxer	M	10	+	NA	-	NA	+
42	Boxer	F	10	+	NA	+	NA	+
43	Pit Bull	F	9	+	NA	-	NA	+
44	Labrador	M	6	+	NA	+	NA	+
45	srd	F	6	+	NA	-	NA	+
46	srd	F	11	+	NA	-	NA	+
47	Dachshund	M	9	+	NA	-	NA	+
48	srd	M	NA	+	II	+	NA	+

O grupo experimental foi subdividido em animais não tratados (24 casos), e tratados com quimioterapia neoadjuvante (14 casos). As amostras citológicas foram utilizadas para o diagnóstico tumoral em 52,6% dos casos (20/38), caracterizando-se pelo predomínio de células redondas, dotadas de granulação citoplasmática, distribuídas isoladamente ou em aglomerados, sem arquitetura preferencial. Nesses casos não foi realizada a graduação histológica e a imunomarcação, restritas aos casos em que foram procedidas biópsias incisionais. Estes compreenderam 47,4% dos processos avaliados (18/38), predominando os tumores de grau II de Patnaik (Figura 1), correspondendo a 61,1% dos casos (11/18), seguindo-se os de grau III (4/18) (Figura 2) e finalmente os de grau I (3/18) (Figura 3). Empregando-se a classificação de Kiupel foram nove casos de baixo e nove de alto grau de malignidade. Buscou-se ainda a caracterização da imunoexpressão de *KIT* nas células neoplásicas e a mensuração do mRNA de *KIT* no sangue circulante.

O anticorpo policlonal de coelho anti-*KIT* (CD117), DAKO, apresenta reatividade cruzada com o equivalente canino, resultando em imunomarcação de boa qualidade. Neste estudo foram submetidos à imunomarcação 15 casos de mastocitomas, identificando-se imunopositividade para *KIT* em todas as amostras, predominando o padrão II de marcação, caracterizado pela marcação citoplasmática leve com positividade paranuclear intensa (figura 4), presente em 66,7% dos casos (KIUPEL et al., 2004). Padrão membranal e citoplasmático intenso (Figuras 5 e 6) de imunoexpressão de *KIT* foram identificados, respectivamente, em 26,7% e 6,6% dos casos analisados.

Figura 1 – Fotomicrografia de mastocitoma cutâneo, grau II de malignidade (Amostra 12), exibindo subversão arquitetural local por população de mastócitos distribuída solidamente, com anisocariose e infiltração eosinofílica. Hematoxilina-eosina, 40x.

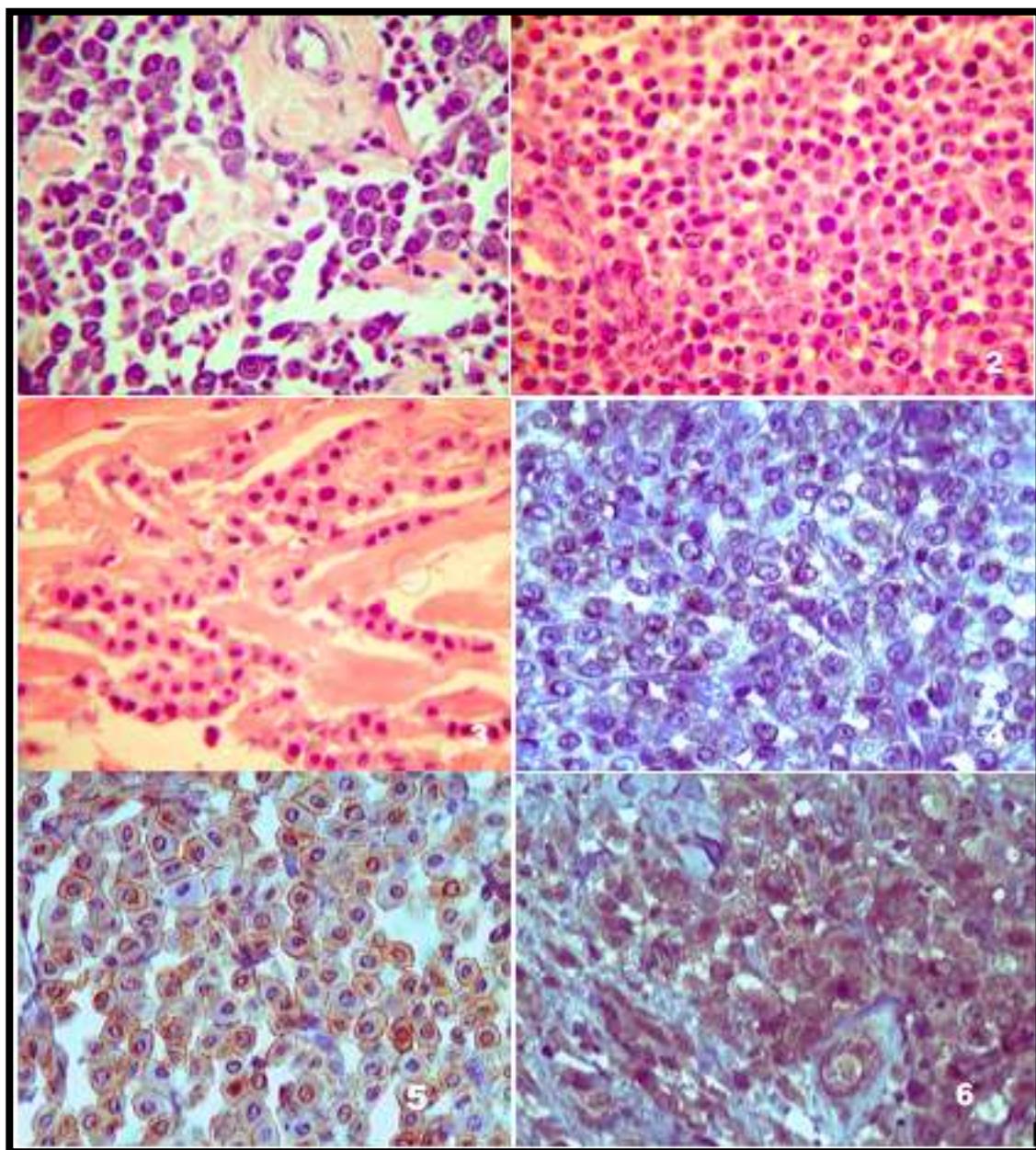
Figura 2 – Fotomicrografia de mastocitoma cutâneo, grau III de malignidade (Amostra 18), com elevada densidade celular, associada a perda de granulação citoplasmática e incremento mitótico. Hematoxilina-eosina, 40x.

Figura 3 – Fotomicrografia de mastocitoma cutâneo, grau I de malignidade (Caso 11), apresentando cordões de mastócitos, exibindo núcleo basofílico homogêneo. Hematoxilina-eosina, 40x.

Figura 4 – Fotomicrografia de mastocitoma cutâneo (Amostra 32), exibindo elevada densidade celular com imunomarcação paranuclear para KIT, compatível com padrão II de imunomarcação, ADVANCE HRP, contracorado com hematoxilina, 40x.

Figura 5 – Fotomicrografia de mastocitoma cutâneo (Amostra 26), exibindo positividade membranal das células neoplásicas para KIT, compatível com padrão I de imunomarcação, LSAB, contracorado com hematoxilina, 40x.

Figura 6 – Fotomicrografia de mastocitoma cutâneo (Amostra 13), exibindo intensa positividade citoplasmática difusa das células neoplásicas para KIT, compatível com padrão III de imunomarcação, ADVANCE HRP, contracorado com hematoxilina, 40x.



Para a pesquisa do mRNA de *KIT* no *sangue* utilizou-se tanto o congelamento da amostra quanto uma solução para preservação do RNA, com maior emprego da primeira. Evidenciou-se um padrão de expressão semelhante do marcador endógeno em amostras de sangue de animais controle em relação a cães com tumor que expressaram *KIT* (Figura 7). Em paralelo identificou-se diferença na expressão de β 2-microglobulina quando se comparou os grupos de animais portadores de neoplasia que expressaram ou não *KIT* (Figura 8). Nestes casos observou-se uma amplificação tardia de β 2-microglobulina nos animais que não expressaram no sangue periférico (Figura 8). Tal fato ocorreu em 41,2% das amostras preservadas sob congelamento e em 30% das amostras mantidas em solução.

Foi detectada expressão de *KIT* no sangue de todos os animais do grupo controle, permitindo a utilização desse nível basal como parâmetro para interpretação da expressão em cães portadores de mastocitomas, estabelecendo-se níveis superiores e inferiores, respectivamente, de super e de subexpressão do gene. Vale destacar que, proporcionalmente, a população negativa para *KIT* dentro do grupo de animais submetidos à quimioterapia foi superior à dos animais sem tratamento, correspondendo, respectivamente, a 42,9% (6/14) e 29,2% (7/24) dos casos. Houve diferença estatisticamente significativa entre a expressão de *KIT* em animais hígidos e portadores de mastocitomas cutâneos, com $p < 0,01$, teste de Mann Whitney (Figura 9).

Figura 7 – Expressão de β 2-microglobulina no sangue de cães normais e de portadores de mastocitoma com expressão sérica de *KIT* (diferença estatisticamente não significativa com $p = 0,7778$, Mann-Whitney). Todos os valores estão distribuídos entre as barras (os quartis 25, 50 e 75 dentro das caixas), exceto os valores extremos.

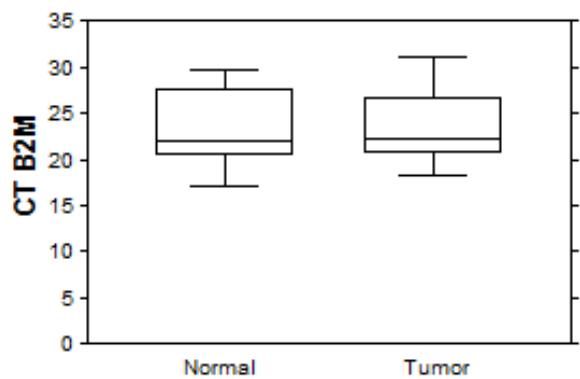


Figura 8 – Expressão de β 2-microglobulina em sangue de cães portadores de mastocitomas com ou sem expressão sérica de *KIT* (diferença estatisticamente significativa com $p = 0,0145$, Mann-Whitney). Todos os valores estão distribuídos entre as barras (os quartis 25, 50 e 75 dentro das caixas), exceto os valores extremos.

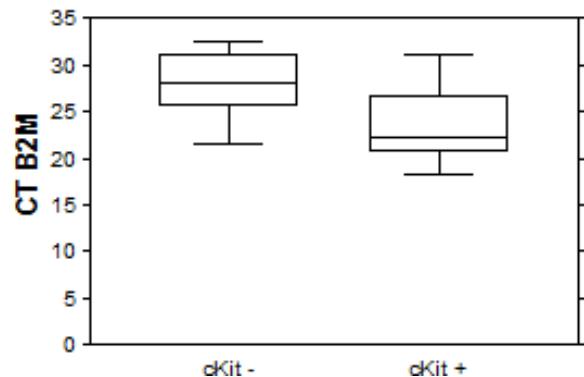


Figura 9 – Níveis de expressão sérica de KIT em cães dos grupos hígido ($n = 10$) e tumoral ($n = 25$), com diferença estatisticamente significante entre eles ($p < 0,01$, Mann Whitney).

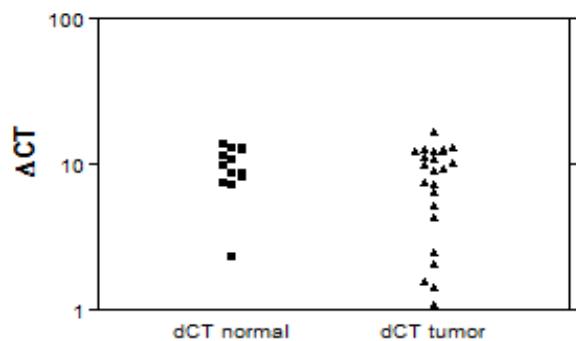
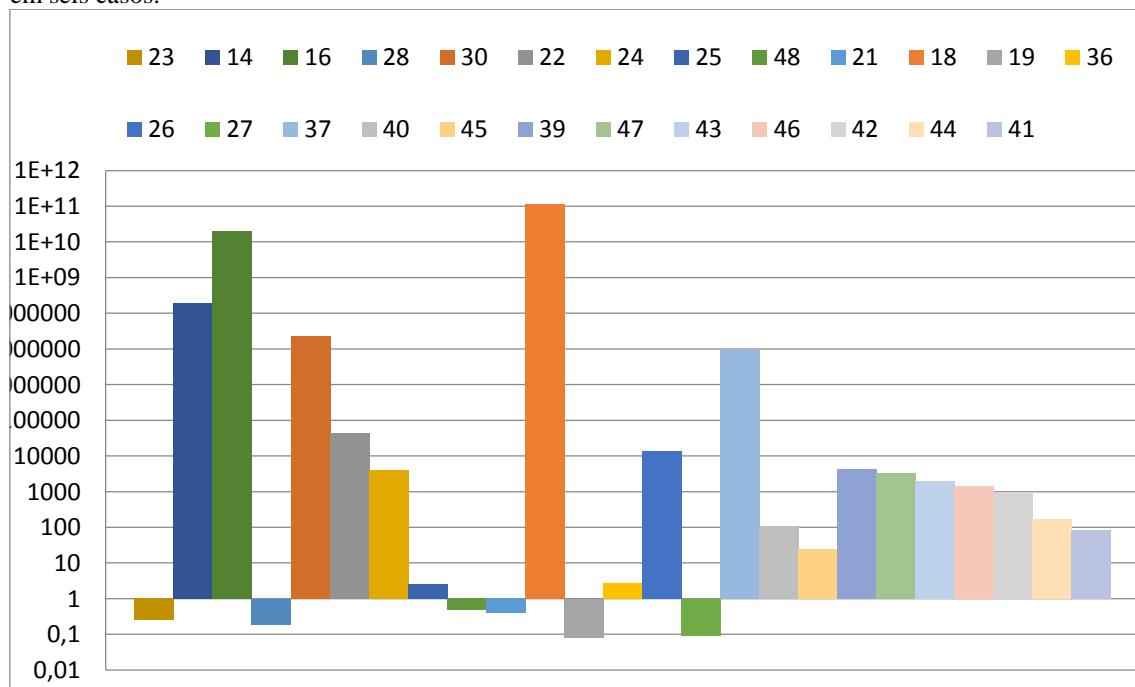


Figura 10 – Expressão relativa de KIT no sangue de cães portadores de mastocitomas em relação à expressão média no sangue de cães não portadores, mostrando superexpressão (> 1) em 19 casos, ou subexpressão (< 1), em seis casos.



Conforme apresentado na Figura 10, considerando-se apenas os animais que expressaram o gene *KIT*, evidenciou-se superexpressão no sangue de 76% dos animais (19/25) e subexpressão nas amostras de 24% (6/25) dos cães portadores de mastocitoma. Se considerarmos também animais com tumor que não expressaram *KIT* no sangue, o que representaria o máximo da subexpressão, teríamos um percentual de 50% dos animais com tumor apresentando redução na expressão de *KIT* (19/38). Os cães portadores de tumor submetidos à quimioterapia apresentaram expressão de *KIT* no sangue em 57,1% dos casos. Dentre eles 25% tiveram subexpressão, havendo 75% de superexpressão sérica de *KIT*. Já dentre os animais não tratados identificou-se *KIT* no sangue em 70,8% das amostras, com superexpressão em 76,5% dos casos.

Devido ao baixo número de casos, não foi possível estabelecer uma correlação entre padrão de expressão celular de *KIT* e nível plasmático do mesmo, observando-se que em apenas cinco animais foi possível a obtenção de imunoexpressão tumoral associada à identificação plasmática de *KIT*. Sendo evidenciada superexpressão em quatro dos casos, sendo um com padrão I de imunoexpressão e três com padrão II. Em apenas um caso evidenciou-se, em paralelo padrão II de *KIT* em células neoplásicas e redução nos níveis séricos de *KIT*.

Em relação à graduação histológica e expressão sérica, observou-se superexpressão sérica nos três casos de tumores de alto grau em que foi identificado o marcador no sangue. Nos três casos de tumores de baixo grau, evidenciou-se subexpressão em 2, com elevação do nível sérico em apenas 1 caso.

4. DISCUSSÃO

Com a incidência crescente de neoplasias associada à maior expectativa de vida dos cães, a busca por marcadores tumorais tem se intensificado, em particular para as condições mais frequentes, como as neoplasias de mama e pele. No caso dos mastocitomas os principais marcadores utilizados relacionam-se ao prognóstico do processo, requisitando para a sua detecção amostra do tecido neoplásico (STREFEZZI et al., 2012; CASAGRANDE et al., 2013). Neste estudo se buscou uma alternativa para essa limitação, pesquisando-se a possibilidade do uso do sangue periférico como veículo de um potencial marcador, o gene *KIT*. Estudos em Medicina Veterinária utilizando o PCR para a quantificação da expressão de *KIT* são escassos, particularmente em termos quantitativos. London et al. (1996) empregaram o PCR para a pesquisa de *KIT* em amostras de biópsia em casos de mastocitomas caninos,

enquanto Kubo et al. (1998) realizaram PCR competitivo-quantitativo para evidenciar elevada expressão de *KIT* em mastocitomas caninos comparativamente a expressão em carcinoma mamário e baço normal. Um aspecto central nessa abordagem é a preservação da integridade do RNA, destacando-se na literatura a adoção do congelamento da amostra ou de sua imersão em soluções de preservação do RNA (BEEKMAN et al., 2009). Em nosso estudo usou-se tanto o congelamento quanto a solução para preservação do RNA, com maior emprego da primeira. Identificou-se diferença na expressão de β 2-microglobulina quando comparados os grupos de animais portadores de neoplasias que expressaram ou não *KIT*, com amplificação tardia de β 2-microglobulina nos animais que não expressaram *KIT* no sangue periférico, sugerindo a possibilidade de uma menor qualidade da amostra nessas situações. A presença de *KIT* no sangue periférico não guardou relação com a graduação histológica, ou com o grau de diferenciação das células neoplásicas, identificando-se hiperexpressão de *KIT* em neoplasias dos três graus possíveis, porém, considerando-se a graduação de Kiupel et al. (2011) nos casos de alto grau em que houve mensuração observou-se hiperexpressão sérica de *KIT*.

A estrutura e sequência de aminoácidos de *KIT* é bem preservada filogeneticamente, existindo grande analogia entre a proteína de ratos e a humana (MA et al., 1999). Tal semelhança fundamenta a reatividade imuno-histoquímica do anticorpo policlonal de coelho anti *KIT* humano, previamente empregado em estudos com cães (FROST et al., 2003; MORINI et al., 2004) que reconhece a porção C-terminal de um domínio intracelular, altamente preservado entre as espécies. O padrão de imunomarcação para *KIT* nas células neoplásicas foi caracterizado por Kiupel et al. (2004) evidenciando-se uma correlação entre padrão de expressão da oncoproteína e o prognóstico de mastocitomas caninos, achado variável segundo a amostragem (PASSANTINO et al., 2008; CASAGRANDE et al., 2013).

Neste estudo foi detectada expressão de *KIT* no sangue de todos os animais do grupo controle, permitindo a utilização desse nível basal de expressão como parâmetro para interpretação da expressão em cães portadores de mastocitomas estabelecendo-se níveis superiores e inferiores, respectivamente, de super e de subexpressão do gene. Tais achados contrastam com o trabalho de Turin et al. (2006) no qual não foi evidenciada expressão de *KIT* no sangue periférico de cães não portadores de mastocitomas. A ausência de expressão de *KIT* no sangue periférico de animais portadores de mastocitomas ocorreu em 34,2% dos casos (13/38), principalmente em animais submetidos à quimioterapia.

Em portadores de leucemia mieloide crônica e em pacientes com GIST é relatada uma discreta elevação nos níveis séricos de *KIT* em comparação com homens hígidos (BONO et al., 2004). Akin et al. (2000) identificaram uma correlação direta entre a elevação dos níveis

plasmáticos de sKIT e a severidade do quadro em pacientes com mastocitose. Tais achados suscitaram a hipótese de uma potencial elevação nos níveis de *KIT* no sangue de portadores de mastocitomas, evento demonstrado em 76% dos casos em que houve expressão do gene. A explicação para a subexpressão nos demais casos pode relacionar-se à restrição da população de células neoplásicas ao sítio de crescimento tumoral, com eventual clivagem do KIT membranal e ingresso de sua fração extracelular para o plasma, porém sem a liberação das células ou de seu genoma íntegro para o sangue periférico. Proporcionalmente houve redução na expressão do gene em animais submetidos à quimioterapia. Dados da literatura referem à queda nos níveis de KIT solúvel durante terapia com imatinib, sendo a hipotética explicação para esse evento a redução no volume tumoral. Porém, essa queda ocorre também em pacientes que não apresentam invalação tumoral. Em consonância, considerando-se pacientes com melanoma-KIT+, evidenciou-se o declínio nos níveis séricos de KIT mediante a terapia, mesmo com a progressão da doença, evento de patogênese ainda pouco compreendida (BONO et al., 2004).

Apesar do número restrito de casos estudados e do padrão heterogêneo de expressão, foi possível observar uma tendência à elevação na expressão de *KIT* no sangue de cães portadores de mastocitoma em comparação aos não portadores, ocorrendo, particularmente em cães não submetidos à quimioterapia. Tais achados sugerem que a utilização do nível sanguíneo de *KIT* como sinalizador de recorrência tumoral ou de doença mínima residual em animais submetidos à quimioterapia é um procedimento promissor.

5. CONCLUSÃO

Cães portadores de mastocitomas apresentam uma tendência à hiperexpressão do gene *KIT* no sangue periférico, tornando sua mensuração sérica um procedimento promissor para o acompanhamento dos pacientes, permitindo a pesquisa de recorrência e doença mínima residual.

AGRADECIMENTOS

À FAPESP pelo auxílio financeiro: processo 2008/58679-0.

A CAPES/PROSUP pela bolsa de doutorado fornecida.

6. REFERÊNCIAS

- AKIN, C.; SCHWARTZ, L. B.; KITO, T.; OBAYASHI, H.; WOROBEC, A. S. et al. Soluble stem cell factor receptor (CD117) and IL-2 alpha chain (CD25) levels in the plasma of patients with mastocytosis: relationships to disease severity and bone marrow pathology. **Blood**, v. 96, p. 1267-273, 2000.
- BEEKMAN, J. M.; REISCHL, J.; HENDERSON, D.; BAUER, D.; TERNES, R. et al. J.F.Recovery of microarray-quality RNA from frozen EDTA blood samples. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 1, p. 44-49, 2009.
- BETTINI, G.; MORINI, M.; MARCATO, P. S. Gastrointestinal spindle cell tumors of dog: histological and immunohistochemical study. **Journal of Comparative Pathology**, v. 129, p. 283-93, 2003.
- BONO, P.; KRAUSE, A.; VON MEHREN, M.; HEINRICH, M. C.; BLANKE, C. D. et al.; Serum KIT and KIT ligand levels in patients with gastrointestinal stromal tumors treated with imatinib. **Blood**, v. 103, p. 2929-935, 2004.
- BOSTOCK, D. E. The prognosis following surgical removal of mastocytomas in dogs. **Journal of Small Animal Practice**, v. 14, n. 1, p. 27-41, 1973.
- CARREIRA, V. S.; KLEEB, S. R.; STREFEZZI, R. F.; CATÃO-DIAS, J. L.; XAVIER, J. G. Morfometria vascular como potencial marcador prognóstico em mastocitomas cutâneos caninos. In: **XIII ENAPAVE**, 2007, Campo Grande. Anais do XIII ENAPAVE, 2007.
- CASAGRANDE, T. A. C.; BARROS, L. M. O.; FUKUMASU, H.; COGLIATI, B.; CHAIBLE, L. M. et al. The value of molecular expression of KIT and KIT ligand analyzed using real-time polymerase chain reaction and immunohistochemistry as a prognostic indicator for canine cutaneous mast cell tumors. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 13, p. 1-10, 2013.
- FROST, D.; LASOTA, J.; MIETTINEN, M. Gastrointestinal stromal tumors and leiomyomas in the dog: a histopathologic, immunohistochemical, and molecular genetic study of 50 cases. **Veterinary Pathology**, v. 40, p. 42-54, 2003.
- GOVIER, S. M. Principles of treatment for mast cell tumors. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**, v. 18, n. 2, p. 103-06, 2003.
- KIUPEL, M.; WEBSTER, J. D.; BAILEY, K. L. et al. Proposal of a 2-tier histologic grading system for canine cutaneous mast cell tumors to more accurately predict biological behavior, **Veterinary Pathology**, v. 48, p. 147-55, 2011.
- KIUPEL, M.; WEBSTER, J. D.; KANEENE, J. B., MILLER, R.; YUZBASIYAN-GURKAN, V. The use of KIT and tryptase expression patterns as prognostic tools for canine cutaneous mast cell tumors, **Veterinary Pathology**, v. 41, p. 371-77, 2004.
- KUBO, K.; MATSUYAMA, S.; KATAYAMA, K.; TSUTSUMI, C.; YONEZAWA, K. et al. Frequent expression of the KIT prot-oncogene in canine malignant mammary tumor. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 60, p. 1335-340, 1998.

- LONDON, C. A.; KISSEBERTH, W. C.; GALLI, S. J.; GEISSLER, E. N.; HELFAND, S. C. Expression of stem cell factor receptor (KIT) by malignant mast cells from spontaneous canine mast cell tumours. **Journal of Comparative Pathology**, v. 115, p. 399-414, 1996.
- LU, M.; GLOVER, C. H.; TIEN, A. H.; HUMPPHRIES, R. K.; PIRET, J. M. et al. Involvement of a tyrosine kinase signaling in maintaining murine embryonic stem cell functionality. **Experimental Hematology**, v. 35, p. 1293-302, 2007.
- MA, Y.; LONGLEY, B. J.; WANG, X.; BLOUNT, J. L.; LANGLEY, K. et al. Clustering of activating mutations in KIT's juxtamembrane coding region in canine mast cell neoplasms. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 112, p. 165-70, 1999.
- MACY, D. W. Canine mast cell tumors. **Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice**, v. 15, p. 783-803, 1985.
- MORINI, M.; BETTINI, G.; PREZIOSI, R.; MANDRIOLI, L. KIT gen product (CD117) immunoreactivity in canine and feline paraffin sections, **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 52, p. 705-08, 2004.
- PASSANTINO, L.; PASSANTINO, G.; CIANCIOTTA, A.; RIBAUD, M. R.; LO PRESTI, G. et al. Expression of proto-oncogene KIT and correlation with morphological evaluations in canine cutaneous mast cell tumors. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v. 30, p. 609-21, 2008.
- PATNAIK, A. K.; EHLER, W. J.; MACEWEM, E. G. Canine mast cell tumor: morphologic grading and survival time in 83 dogs. **Veterinary Pathology**, v. 21, p. 469-74, 1984.
- PREZIOSI, R.; SARLI, G.; PALTRINIERI, M. Prognostic value of intratumoral vessel density in cutaneous mast cell tumours of the dog. **Journal of Comparative Pathology**, v.130, p. 143-51, 2004.
- STREFEZZI, R. F.; KLEEB, S. R.; XAVIER, J. G.; FUKUMASU, H.; CATÃO-DIAS, J. L. The value of immunohistochemical expression of BAX in formulating a prognosis for canine cutaneous mast cell tumours. **Journal of Comparative Pathology**, v.146, p. 314-19, 2012.
- TURIN, L.; ACOCELLA, F.; STEFANELLO, D.; OSELIERO, A.; FONDRINI, D. et al. Expression of KIT proto-oncogene in canine mastocytoma: a kinetic study using real-time polymerase chain reaction. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.18, p. 343-49, 2006.

REFERÊNCIAS GERAIS

- ABADIE, J. J.; AMARDEILH, M. A.; DELVERDIER, M. E. Immunohistochemical detection of proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 in mast cell tumors from dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 215, n. 11, p. 1629-634, Dec. 1999.
- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. **Cellular and molecular immunology**. 4. ed. London: W.B. Saunders, 2000, 553 p.
- BALDI, A.; COLLOCA, E.; SPUGININI, E. P. Lomustine for the Treatment of Gastrointestinal Mast Cell Tumours in a Dog. **Journal of the Small Animal Practice**, v. 47, n. 8, p. 465-67, 2006.
- BLACKWOOD, L.; MURPHY, S.; BURACCO, P.; DEVOS, J. P.; DE FORNEL-THIBAUD, P. et al. European consensus document on mast cell tumours in dogs and cats, **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 10, p. e1-e29, 2012.
- CAHALANE, A. K.; PAYNE, S.; BARBER, L. G.; DUDA, L. E.; HENRY, C. J.; et al. Prognosticfactors for survival of dogs with inguinal and perineal mast cell tumors treated surgically with or without adjunctive treatment: 68 cases (1994-2002). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 225, n. 3, p. 401-08, 2004.
- CULLEN, J. M.; PAGE, R.; MISDORP, W. An overview of cancer pathogenesis, diagnosis, and management. In: MEUTEN, D. J. **Tumors in domestic animals**. 4. ed. Iowa: Iowa State Press, p. 3-27, 2002.
- DOWNING, S.; CHIEN, M. B.; KASS, P. H.; MOORE, C. E.; LONDON, C. A. Prevalence and importance of internal tandem duplication in exons 11 and 12 of C-KITin mast cell tumors in dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 63, p. 1718-723, 2002.
- DUNCAN, J. R. & PRASSE, K. W. Cytology of canine cutaneous round cell tumors. **Veterinary Pathology**, v. 16, n. 6, p. 673-79, 1979.
- ELLING, H. & UNGEMACH, F.R. Sexual hormone receptors in canine mast cell tumor cytosol. **Journal of Comparative Oncology**, v. 92, n. 4, p. 629-30, 1982.
- FOX, E. L. Mast Cell Tumors. In: MORRISON, B.W. **Cancer in dogs and cats medical and surgical management**. Philadelphia: Williams & Wilkins, p. 479-88, 1998.
- GERRITSEN, R. J.; TESKE, E.; KRAUS, J. S.; RUTTEMAN, G. R. Multi-agent chemotherapy for mast cell tumours in the dog. **The Veterinary Quartely**, v. 10, n. 1, p. 28-31, 1998.
- GIEGER, T.; NORTHRUP, N.; WALL, M. Clinical management of mast cell tumors in dogs. **Compendium on Continuing Education of the Practicing Veterinarian**, v. 27, n. 1, p. 56-67, 2005.

GILFILLAN, A. M.; TKACZYK, C. Integrated signaling pathways for mast-cell activation. **Nature reviews. Immunology**, v. 6, n. 3, p. 218-203, Mar. 2006.

GINN, P. E.; FOX, L. E.; BROWER, J. C.; GASKIN, A.; KURZMAN, I. D. et al. Immunohistochemical detection of p53 tumor-suppressor protein is a poor indicator of prognosis for canine cutaneous mast cell tumors. **Veterinary Pathology**, v. 37, n. 1, p. 33-39, 2000.

GOLDSCHMIDT, M. H. & HENDRICK, M. J. Tumors of the Skin and Soft Tissues. In: MEUTEN, D. J. **Tumors in domestic animals**. 4. ed. Iowa: Iowa State Press, p. 105-107, 2002.

HARTMANN, K.; ARTUC, M.; BALDUS, S. E.; ZIRBES, T. K.; HERMES, B. et al. Expression of Bcl-2 and Bcl-xL in cutaneous and bone marrow lesions of mastocytosis. **American Journal of Pathology**, v. 163, n. 3, p. 819-26, Sep. 2003.

HOTTENDORF, G. H.; NIELSEN, S. W. **Pathologic Report of 29 Necropsies on Dogs with Mastocytoma Path.** **Vet.**, v. 5, p. 102-121, 1968.

HOWARD, E. B.; SAWA, T. R.; NIELSEN, S. W.; KENYON, A. J. Mastocytoma and gastroduodenal ulceration. Gastric and duodenal ulcers in dogs with mastocytoma. **Pathologia Veterinaria**, v. 6, p. 146-58, 1969.

JAFFE, M. H.; HOSGOOD, G.; TAYLOR, H. W. Immunohistochemical and clinical evaluation of P53 in canine cutaneous mast cell tumors. **Veterinary Pathology**, v. 37, n. 1, p. 37-40, 2000.

KIUPEL, M.; WEBSTER, J. D.; KANEENE, J. B.; MILLER, R.; YUZBASIYAN-GURKAN, V. The use of KIT and tryptase expression patterns as prognostic tools for canine cutaneous mast cell tumors. **Veterinary Pathology**, v. 41, p. 371-77, 2004.

KIUPEL, M.; WEBSTER, J. D.; MILLER, R. A.; KANEENE, J. B. Impact of tumors depth, tumors location and multiple synchronous masses on the prognosis of canine cutaneous mast cell tumors. **Journal of Veterinary Medicine Series A. Physiology, Pathology and Clinical Medicine**, v. 52, n. 6, p. 280-86, Aug. 2005.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. **Robbins e Cotran – patologia – bases patológicas das doenças**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005, 1592 p.

LAVALLE, G. E.; ARAÚJO, R. B.; CARNEIRO, R. A. Tratamento clínico e cirúrgico de mastocitomas em cães. **A Hora Veterinária**, v. 22, p. 6-14. 2003.

LAVALLE, G. E.; ARAÚJO, R. B.; CARNEIRO, R. A.; PEREIRA, L. C. Punção aspirativa por agulha fina para diagnóstico de mastocitoma em cães. **Arquivos Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 55, n. 4, p. 500-02, Aug. 2003.

LETARD, S.; YANG, Y.; HANSENS, K.; PALMÉRINI, F.; LEVENTAL, P. S. et al. Gain of function mutations in the extracellular domain of KIT are common in mast cell tumors. **Molecular Cancer Research**, v. 6, p. 1137-145, 2008.

- LONDON, C. A.; KISSEBERTH, W. C.; GALLI, S. J.; GEISSLER, E. N.; HELFAND, S. C. Expression of stem cell factor receptor (c-kit) by the malignant mast cell from spontaneous canine mast cell tumors. **Journal of Comparative Pathology**, v. 115, n. 4, p. 399-414, 1996.
- LONDON, C. A.; GALLI, S. J.; YUUKI, T.; HU, Z.; HELFAND, S. C. et al. Spontaneous canine mast cell tumors express tandem duplications in the proto-oncogene *c-kit*. **Experimental Hematology**, v. 27, p. 689-97, 1999.
- LONDON, C. A.; SEGUIN, B. Mast cell tumors in the dog. **Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice**, v. 33, n. 3, p. 473-89, May 2003.
- LONDON, C. A.; THAMM, D. H. Mast cell tumors. In: WITHROW, S. J. & MACEWEN'S, E. G. **Small animal clinical oncology**. 5. ed. St. Louis, MO: Saunders Elsevier, 2013, p. 335-55.
- MA, Y.; LONGLEY, B. J.; WANG, X.; BLOUNT, J. L.; LANGLEY, K. et al. Clustering of activating mutations in c-KIT's juxtamembrane coding region in canine mast cell neoplasms. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 112, pp. 165-70, 1999.
- MACY, D. W. Canine mast cell tumors. **Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice**, v. 15, n. 4, p. 783-803, Jul. 1985.
- MCMANUS, P. M. Frequency and severity of mastocitemia in dogs with and without mast cell tumors: 120 cases (1995-1997). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 215, n. 3, Aug. 1999.
- MILLER, D. M. The occurrence of mast cell tumors in young Shar Peis. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 7, p. 360, 1995.
- MISDORP, W. Mast cell and canine mast cell tumours. A review. **The Veterinary Quarterly**, v. 26, n. 4, p. 156-69, Dec. 2004.
- OGILVIE, G. K.; MOORE, A. S. Mast Cell Tumors. In: OGILVIE, G. K. & MOORE, A. S. **Managing the Veterinary Cancer Patient: A Practice Manual**. New Jersey: Veterinary Learning Systems, p. 503-510, 1995.
- O'KEEFE, D. A. Canine mast cell tumors. **Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice**, v. 20, n. 4, p. 1105-115, Jul. 1990.
- OZAKI, K.; YAMAGAMI, T.; NOMURA, K.; NARAMA, I. Mast cell tumors of the gastrointestinal tract in 39 dogs. **Veterinary Pathology**, v. 39, n. 5, p. 557-64, 2002.
- PATNAIK, A. K.; EHLER, W. J.; MACEWEN, E. G. Canine cutaneous mast cell tumor: morphologic grading and survival time in 83 dogs. **Veterinary Pathology**, v. 21, n. 5, p. 469-74, 1984.
- PULLEY, L. T.; STANNARD, A. A. Skin and soft tissues. In: MOULTON, J. E. **Tumors in domestic animals**. 3. ed. Los Angeles: University of California Press, p. 38-44, 1990.

RECH, R. R.; GRAÇA, D. L.; KOMMERS, G. D.; SALLIS, E. S. V.; RAFFI, M. B. et al. Mastocitoma cutâneo canino. Estudo de 45 casos. **Arquivos Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 56, n. 4, p. 441-48, 2004.

REGUERA, M. J.; RABANAL, R. M.; PUIGDEMONT, A.; FERRER, L. Canine mast cell tumors express stem cell factor receptor. **American Journal of Dermatopathology**, v. 22, p. 49-54, 2002.

ROGERS, K. S. Mast cell tumors: dilemmas of diagnosis and treatment. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 26, n. 1, p. 87-102, 1996.

SÉGUIN, B.; LEIBMAN, N. F.; BREGAZZI, V. S.; OGILVIE, G. K.; POWERS, B. E. et al. Clinical outcome of dogs with grade-II mast cell tumors treated with surgery alone: 55 cases (1996-1999). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 218, n. 7, p. 1120-123, Apr. 2001.

SIMOES, J. P.; SCHONING, P.; BUTINE, M. Prognosis of canine mast cell tumors: a comparasion of three methods. **Veterinary Pathology**, v. 31, n. 6, p. 637-47, Nov. 1994.

STREFEZZI, R. F. S.; XAVIER, J. G.; CATÃO-DIAS, J. L. Morphometry of canine cutaneous mast cell tumors. **Veterinary Pathology**, v. 40, n. 3, p. 268-75, 2003.

STONE, D. M.; JACKY, P. B.; PRIEUR, D. J. Chromossomal fragile site expression in dogs: II.Expression in Boxer dogs with mast cell tumors. **American Journal of Medical Genetics**, v. 40, p. 223-29, 1991.

SUEIRO, F. A. R.; DALECK, C. R.; ALESSI, A. C. Ultra-estrutura dos mastócitos de diferentes tipos histológicos de mastocitoma em cães. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 54, n. 3, p. 255-58. Jun. 2002.

TIZARD, I. R. Cómo se Activa la Inflamación. In: TIZARD, I. R. **Introducción a La Inmunología Veterinaria**. 8. ed. Barcelona: Elsevier Saunders, p. 11-27, 2009.

TURIN, L.; ACOCELLA, F.; STEFANELLO, D.; OSELIERO, A.; FONDRINI, D. et al. Expression of C-KITproto-oncogene in canine mastocytoma: a kinetic study using real-time polymerase chain reaction. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 18, n. 4, p. 343-49, Jul. 2006.

VALENT, P.; HORNY, H. P.; LI, C. Y.; LONGLEY, B. J.; METCALFE, D. D. et al. (eds.) **World Health Organization classification of tumors: pathology and genetics of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues**. Lyon, França: IARC Press, p. 293-302, 2001.

WALTER, J. H. Cytokeratins in the canine epidermis. **Veterinary Dermatology**, v. 12, n. 2, p. 81-87, 2001.

WEBSTER, J. D.; YUZBASIYAN-GURKAN, V.; KANEENE, J. B.; MILLER, R.; RESAU, J. H. et al. The role of C-KITin tumorigenesis: evaluation in canine cutaneous mast cell tumors. **Neoplasia**, v. 8, p. 104-11, 2006

WELLE, M. M.; BLEY, C. R.; HOWARD, J.; RÜFENACHT, S. Canine mast cell Tumours: a review of the pathogenesis, clinical features, pathology and treatment. **Journal of Veterinary Oncology**, v. 19, n. 6, p. 321-39, 2008.

WU, H.; HAYASHI, T.; INOUE, M. Immunohistochemical expression of p27 and p21 in canine cutaneous mast cell tumors and histiocytomas. **Veterinary Pathology**, v. 41, n. 3, p. 296-99, 2004.

ZAVODOVSKAYA, R.; CHIEN, M. B.; LONDON, C. A. Use of kit internal tandem duplications to establish mast cell tumor Clonality in 2 dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 18, n. 6, p. 915-17, 2004.