

## Quimioterapia neoadjuvante com vimblastina e lomustina no tratamento de um caso de mastocitoma cutâneo canino com múltiplos fatores prognósticos negativos e sobrevida superior a dois anos

### Neoadjuvant chemotherapy with vinblastine and lomustine in the treatment of a canine cutaneous mast cell tumour with multiple negative prognostic factors and survival over two years

Paulo C. Jark<sup>1\*</sup>, Talita M.M. Raposo<sup>1</sup>, Carlos E.F. Alves<sup>2</sup>, Beatrice I. Macente<sup>1</sup>, Raquel R. Gutierrez<sup>1</sup>,  
Andriano B. De Nardi<sup>1</sup>, Renee Laufer-Amorim<sup>2</sup>, Mirela Tinucci-Costa<sup>1</sup>

<sup>1</sup>School Universidade Estadual Paulista – Unesp – Jaboticabal, SP, Brasil

<sup>2</sup> Universidade Estadual Paulista – Unesp – Botucatu, SP, Brasil

**Resumo:** O comportamento clínico e biológico do mastocitoma cutâneo canino é bastante variável, tornando o estabelecimento do prognóstico e a escolha do melhor tratamento a ser instituído um desafio para os oncologistas veterinários. Embora existam inúmeros protocolos quimioterápicos descritos para o tratamento do mastocitoma cutâneo canino, os mesmos foram avaliados comparando-se grupos heterogêneos, com diferentes fatores prognósticos clínicos e histopatológicos, dificultando desta forma a escolha do melhor protocolo a ser utilizado. Pretende-se com este relato descrever os efeitos do protocolo neoadjuvante à base de vimblastina e lomustina num caso de mastocitoma grau III/ alto grau na região do perineo, de prognóstico reservado a mau, baseado nos fatores clínicos (localização, tamanho tumoral, velocidade de crescimento), características histopatológicas (grau de Patnaik e Kiupel) e imuno-histoquímica (imunomarcagem de Ki-67, c-kit e glicoproteína P) desfavoráveis que respondeu favoravelmente ao tratamento instituído e apresenta até o presente momento uma sobrevida de 110 semanas sem sinais de recidiva da doença.

**Palavras-chave:** mastocitoma; imuno-histoquímica; fatores prognósticos; quimioterapia

**Summary:** The clinical and biological behavior of canine cutaneous mast cell tumors is highly variable, making the establishment of prognosis and choose of the best treatment to be instituted a challenge to veterinary oncologists. While there are many chemotherapeutic protocols outlined for treatment of canine cutaneous mast cell tumors, they were evaluated by comparing heterogeneous groups, with different clinical and histopathological prognostic factors, thus making it difficult to select the best protocol to use. The intention of this report is describe the effects of a neoadjuvant protocol with vinblastine and lomustine in a case of grade III / high degree mast cell tumour in perineum, with worse prognosis, based on unfavorable clinical factors (location, tumor size, growth rate), histopathological characteristics (degree of Patnaik and Kiupel) and immunohistochemistry (immunostaining of Ki-67, kit and P-glycoprotein) who responded favorably to treatment and has to date a survival of 110 weeks without signs of recurrence disease.

**Keywords:** mast cell tumour; immunohistochemistry; prognostic factors, chemotherapy

### Introdução

O comportamento clínico e biológico do mastocitoma é bastante variável, podendo se apresentar como uma lesão de caráter pouco agressivo à lesões localmente infiltrativas e com alto potencial metastático (Blackwood *et al.*, 2012). Estas características dos mastocitomas tornam-nos tumores com um comportamento biológico imprevisível. Devido a isto, alguns fatores prognósticos podem ser utilizados na tentativa de melhor prever o comportamento desta neoplasia. Estes incluem fatores clínicos como, tamanho do tumor, localização, velocidade de crescimento e presença de metástases, além de características histopatológicas e imuno-histoquímicas que também auxiliam na caracterização do prognóstico do paciente (Kiupel *et al.*, 2004; Blackwood *et al.*, 2012).

O tratamento mais comumente utilizado em mastocitomas cutâneos caninos de comportamento agressivo envolve a ressecção cirúrgica seguida de quimioterapia antineoplásica. Apesar de a cirurgia ser o tratamento de eleição, em alguns casos devido à localização e o tamanho do tumor é necessária a utilização de quimioterapia neoadjuvante na tentativa de reduzir o tamanho da lesão facilitando a ressecção com margens adequadas de segurança (Stancliff e Gilson, 2008)

A variação entre os graus histopatológicos, os diferentes fatores prognósticos e os diversos protocolos quimioterápicos utilizados no tratamento do mastocitomas fazem com que a escolha do melhor protocolo seja um desafio (Cooper *et al.*, 2009).

\*Correspondência: paulocjark@hotmail.com

Pretende-se com este relato descrever os efeitos do protocolo neoadjuvante a base de vimblastina e lomustina em um caso de mastocitoma grau III segundo a classificação proposta por Patnaik *et al.* (1984), e alto grau segundo a classificação de Kiupel *et al.* (2011) na região do períneo, com prognóstico reservado a mau, baseado nos fatores clínicos, características histopatológicas e imuno-histoquímica desfavoráveis.

## Relato de caso

Foi atendido um cão, Boxer, fêmea, de aproximadamente oito anos de idade com histórico de recidiva de tumor em região perianal. O paciente havia sido submetido a três cirurgias prévias realizadas por outro colega médico veterinário para remoção de tumor no mesmo local, porém sem realização de exame histopatológico. Segundo a proprietária o animal estava em tratamento com corticosteroides há 5 meses.

Ao exame físico, o tumor apresentava forma irregular, superfície hiperêmica, crescimento rápido, media aproximadamente 5,4x3,8x2,5 cm, estava localizado em região do períneo e apresentava caráter infiltrativo na região da vulva. Segundo a proprietária o paciente apresentava dificuldade para urinar, sendo observável a invasão local do tumor na uretra.

Foi realizada punção biopsia aspirativa do local com diagnóstico citológico de mastocitoma. Na continuidade foi realizado o estadiamento da neoplasia através da realização de exame de ultra-sonografia do abdome e radiografia torácica, no entanto, não foi observado sinais da presença de metástases a distância.

Como tratamento de suporte foi administrada ranitidina (2 mg/kg – VO) e prometazina (0,4 mg/kg – VO). Como medida de conforto e visando reduzir a compressão da uretra, o animal foi sondado para esvaziamento da bexiga e mantido com a sonda até a resolução do quadro compressivo.

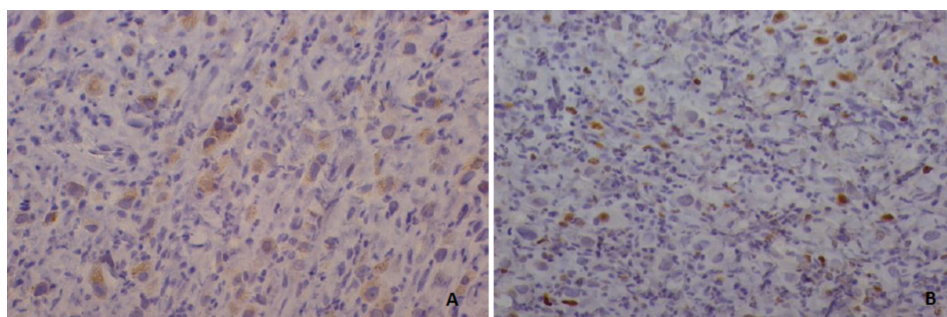
O paciente foi submetido à biopsia incisional para graduação da neoplasia, com achado histopatológico de proliferação neoplásica de células, com pleomorfismo acentuado, citoplasma amplo e granular, núcleos poligonais, presença de multinucleações, nucléolo grande e proeminente, caracterizando um mastocitoma de grau III segundo os critérios propostos por Patnaik

*et al.* (1984) e alto grau segundo os critérios de Kiupel *et al.* (2011). As células neoplásicas foram positivas para coloração de Azul de Toluidina.

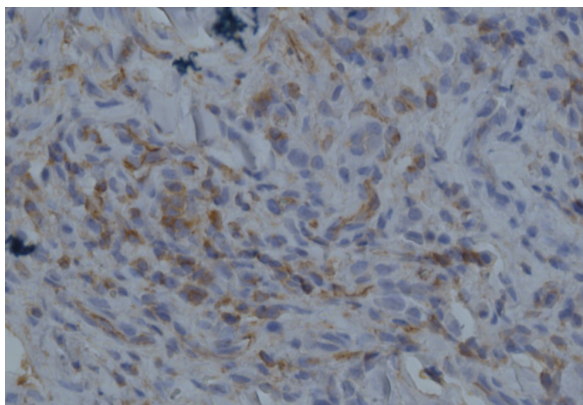
Para uma valiação mais precisa do grau de malignidade do tumor, realizou-se o exame imuno-histoquímico. Os cortes histológicos foram desparafinizados com xilol e re-hidratados. A recuperação antigênica foi conduzida com tampão citrato pH 6,0, em panela de pressão (Pascal<sup>®</sup>; Dako, Carpinteria, CA, USA). Após o arrefecimento das lâminas estas foram incubadas por três vezes em peróxido de hidrogênio 3% (10V) durante 5 min cada, para o bloqueio da peroxidase endógena e posteriormente lavadas em água corrente durante 5 min. Os cortes foram submetidos ao bloqueio de proteínas inespecíficas com caseína (Molico<sup>®</sup>) durante 20 min a 27 °C, seguido pela incubação com os anticorpos primários individualmente. Foram testados os anticorpos c-KIT, Ki-67, Glicoproteína P (gp-P) na diluição de 1:800, 1:50, 1:100, respectivamente, durante 18 horas (*overnight*) horas em câmara húmida a 4 °C. Posteriormente, as lâminas foram lavadas com tampão TRIS. A seguir, as lâminas foram incubadas com polímero Envision (Dako, Carpinteria, CA, USA) e posteriormente lavadas com TRIS por três vezes. A reação foi revelada com o 3,3' diaminobenzidine tetrachloride (DakoCytomation, Carpinteria, USA) e contra-coloração com hematoxilina Harrys. As lâminas foram então montadas com resina e laminada e observadas em microscópio de luz.

A avaliação das marcações dos anticorpos c-KIT e Ki-67 foram baseadas no descrito por Webster *et al.* (2007) e para a gp-P considerou-se o percentual de positividade das células tumorais, seguindo critérios de Miyoshi *et al.* (2002), onde: nenhuma célula marcada = 0; 1 a 10% de células marcadas = 1; 10 – 50% de células marcadas = 2 e >50% de células marcadas = 3.

A imunomarcção para a proteína c-KIT apresentou marcação citoplasmática difusa na maioria dos mastócitos neoplásicos, conferindo um padrão c-KIT 3 (Figura 1A). Para o anticorpo Ki-67 considerou-se a marcação nuclear, sendo observadas mais de 23 células positivas contadas em aumento de 400x, sugerindo a presença de um tumor com alto índice proliferativo (Figura 1B). A avaliação da glicoproteína-P recebeu *score* 3, visto que mais de 50% dos mastócitos neoplásicos apresentaram marcação citoplasmática desta proteína (Figura 2).



**Figura 1 - A** – Imunomarcção para a proteína c-KIT com marcação citoplasmática difusa na maioria dos mastócitos neoplásicos, conferindo um padrão c-KIT 3. **B** - Imunomarcção nuclear para Ki67 com mais de 23 células positivas contadas (400x).



**Figura 2** – Imunomarcção da glicoproteína-P - *score* 3, visto que mais de 50% dos mastócitos neoplásicos apresentam marcação citoplasmática desta proteína

Após a avaliação histopatológica e imuno-histoquímica, o paciente foi submetido a quimioterapia antineoplásica neoadjuvante com a associação de vimblastina ( $2\text{mg/m}^2$ - IV) e lomustina ( $80\text{ mg/m}^2$ - VO), de forma intercalada, a cada 15 dias.

Após a quarta sessão de quimioterapia neoadjuvante, o paciente apresentava redução significativa do tamanho do tumor e foi possível a realização da cirurgia para remoção do mesmo.

Após 10 dias da realização do procedimento cirúrgico, o paciente retornou ao protocolo quimioterápico, mantendo-se o mesmo protocolo, totalizando seis sessões de cada fármaco, incluindo as que foram realizadas antes do procedimento cirúrgico. Durante o protocolo quimioterápico o paciente não apresentou toxicidade hematológica ou gastrointestinal grave, as quais podem ser comuns neste tipo de terapia.

Cento e dez semanas (aproximadamente 770 dias) após o atendimento inicial o animal não apresenta sinais de recidiva da doença nas avaliações bimestrais acompanhadas através de exame físico, ultrassonografia abdominal, radiografia torácica, sendo considerado em remissão completa.

## Discussão

Devido ao comportamento extremamente variável dos mastocitomas caninos, inúmeros fatores prognósticos têm sido considerados na tentativa de prever a evolução da doença (Blackwood *et al.*, 2012).

Dentre os dados clínicos empregues na atribuição de prognóstico negativo estão: tumores maiores que 3 cm, tumores com velocidade de crescimento rápido, presença de ulceração e presença de metástase (Blackwood *et al.*, 2012). Embora não seja consensual entre autores, alguns pesquisadores sugerem que a localização tumoral nas regiões mucocutâneas, prepúcio, períneo, região inguinal e coxas está associada a pior prognóstico (Blackwood *et al.*, 2012). Baseando-se nestes conceitos, embora o paciente do presente relato apresentasse prognóstico negativo, a evolução clínica do caso, até o pre-

sente momento, tem sido satisfatória. Adicionalmente, as características histopatológicas, tal como a graduação do tumor segundo o proposto por Patnaik *et al.* (1984) e Kiupel *et al.* (2011) além das características imuno-histoquímicas da localização da expressão do receptor c-KIT no mastócito neoplásico e o índice de proliferação celular avaliado pela expressão de Ki-67 também corroboram com um prognóstico negativo para este animal proposto por vários pesquisadores (Patnaik *et al.* 1984; Kiupel *et al.* 2004; Webster *et al.* 2007)

Segundo a classificação histopatológica proposta por Patnaik *et al.* (1984), os mastocitomas de grau III como apresentado pelo paciente do presente relato, apresentam comportamento clínico altamente agressivo, com altas taxas de recidiva tumoral e metástase. O tempo médio de sobrevida dos mastocitomas de alto grau segundo a classificação de Kiupel *et al.* (2011) é inferior a 4 meses.

O paciente apresentou marcação citoplasmática difusa na maioria dos mastócitos neoplásicos, conferindo um padrão c-KIT 3. A imunomarcção para a proteína c-KIT pode ser considerada um fator prognóstico importante nos casos de mastocitomas cutâneo canino. A presença de imunomarcção perimembranosa (padrão c-KIT 1) não está associada a recorrência da doença ou a diminuição da sobrevida enquanto que as marcações citoplasmáticas focais ou difusas da proteína c-KIT (padrão c-KIT 2 e 3, respectivamente) estão associados ao aumento na taxa de recorrência da doença e diminuição da sobrevida dos pacientes (Kiupel *et al.* 2004).

Outro marcador imuno-histoquímico que pode ser utilizado na avaliação do prognóstico dos mastocitomas em cães é o Ki-67, que é um fator de proliferação celular (Webster *et al.* 2007). Webster *et al.* (2007) demonstraram que os pacientes que apresentam valor de Ki-67 acima de 23 apresentaram menor tempo de sobrevida e maior taxa de recorrência local e de metástase a distância em comparação aos cães com Ki-67 inferior a 23. A avaliação imuno-histoquímica do Ki-67 do paciente apresentado foi superior a 23 sugerindo um comportamento agressivo da neoplasia.

Outro fator importante a ser considerado na escolha do protocolo terapêutico é a resistência à quimioterapia que pode estar relacionada à superexpressão da gp-P. Esta proteína é codificada pelo gene *MDR1* e age promovendo o efluxo de certos quimioterápicos do interior das células neoplásicas para o meio extra-celular (Nakaichi *et al.*, 2007). A expressão desta proteína pode ser influenciada por tratamento quimioterápico prévio ou pela administração de certos fármacos, como os glicocorticoides (Nakaichi *et al.*, 2007), resultando assim, na ocorrência de quimiorresistência (Nakaichi *et al.*, 2007).

O paciente deste relato foi submetido a exposição crônica de glicocorticoide, durante cinco meses o que pode justificar a expressão aumentada da gp-P, evidenciada na imuno-histoquímica. Todavia esta previa exposição não resultou em resistência aos fármacos empregues no protocolo quimioterápico, uma vez que



apresentou boa resposta ao tratamento com vimblastina e lomustina, mesmo a vimblastina sendo um dos fármacos que apresentam quimiorresistência mediada pela gp-P (Gatti e Zunino, 2005).

A utilização do protocolo de associação entre vimblastina e lomustina no tratamento do mastocitomas em cães foi avaliada em num estudo com pacientes que apresentavam mastocitomas grau II e III. Os pacientes foram divididos em dois grupos, de acordo com a presença de doença macroscópica ou microscópica (Cooper *et al.*, 2009). No grupo de doença macroscópica o tempo livre de doença observado, segundo os autores, foi de 30 semanas (210 dias), com média de sobrevida de 35 semanas (245 dias). Esses dados são superiores aos descritos em outro trabalho utilizando o protocolo de vimblastina, ciclofosfamida e prednisona, o qual proporcionou tempo livre de doença de 74 dias e média de sobrevida de 145 dias (Camps-Palau *et al.*, 2007). O paciente do presente relato apresenta, até o momento, tempo livre da doença 110 semanas, superior aos dados citados nos outros trabalhos.

Embora a associação de vimblastina e lomustina apresente uma taxa de resposta superior ao protocolo de lomustina como agente único (57% versus 42%), com uma grande percentagem dos pacientes obtendo remissão completa (25% versus 5%) na comparação entre dois estudos, os autores salientam a necessidade de se ampliarem o número de animais tratados com esse protocolo para confirmar estes achados (Rassnick *et al.*, 1999; Cooper *et al.* 2009).

Apesar do paciente ter tolerado bem o protocolo quimioterápico instituído, os autores que estudaram o protocolo de vimblastina e lomustina citam uma taxa de 54% de toxicidade em relação a este tratamento, porém os mesmos citam que a gravidade dos efeitos colaterais foi leve na maioria dos casos (Cooper *et al.*, 2009). A dose de lomustina utilizada pelos autores variou de 27mg/m<sup>2</sup> a 90 mg/m<sup>2</sup>, com média de 59 mg/m<sup>2</sup>, enquanto que a dose utilizada no presente relato foi de 80 mg/m<sup>2</sup>.

## Conclusão

O comportamento clínico altamente variável dos mastocitomas caninos expõe a necessidade da utilização de marcadores prognósticos, buscando prever a evolução esperada da doença e auxiliar o Oncologista Veterinário na decisão do melhor tratamento a ser utilizado.

Embora existam inúmeros protocolos quimioterápicos descritos para o tratamento do mastocitoma cutâneo canino, os mesmos foram avaliados comparando-se grupos heterogêneos, com diferentes fatores prognósticos clínicos e histopatológicos, dificultando desta forma a escolha do melhor protocolo a ser utilizado.

Apesar de em alguns casos os fatores prognósticos apontarem para uma evolução desfavorável da doença, a escolha e a instituição de um protocolo adequado como descrito, pode resultar em maior sobrevida do paciente, com melhor qualidade de vida.

## Bibliografia

- Blackwood L, Murphy S, Buracco P, Devos JP, Fornel-Thibaud P, Hirschberger J, Kessler M, Pastor J, Ponce F, Savary-Bataille K, Argyle DJ (2012). European Consensus Document on Mast Cell Tumours in Dogs and Cats. *Veterinary and Comparative Oncology*, 10, 3, 1-29.
- Camps-Palau MA, Liebman NF, Elmslie R, Lana SE, Plaza S, Mcknight J, Ribson R, Bergman PJ (2007). Treatment of Canine Mast Cell Tumors with Vinblastine, Cyclophosphamide and Prednisolone: 35 Cases (1997-2004). *Veterinary and Comparative Oncology*, 5, 156-167.
- Cooper M, Tsai X, Bennett P (2009). Combination CCNU and Vinblastine Chemotherapy for Canine Mast Cell Tumors: 57 Cases. *Veterinary and Comparative Oncology*, 7, 3, 196-206.
- Gatti L e Zunino F (2005). Overview of Tumor Cell Chemoresistance Mechanisms. *Methods in Molecular Medicine*, 111, 127-148.
- Kiupel M, Webster JD, Kaneene JB, Miller R, Yuzbasiyan-Gurkan V (2004). The Use of kit and Tryptase Expression Patterns as Prognostic Tools for Canine Cutaneous Mast Cell Tumor. *Veterinary Pathology*, 41, 371-377.
- Kiupel M, Webster JD, Bailey KL, Best S, Delay J, Dentrisa CCJ, 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, Neyen I, O'Toole D, Ramos-Vara J, Scase TJ, Schuman FY, Sledge D, Smedley RC, Smith K, Snyder PW, Southorn E, Stedman NL, Steficek BA, Stromberg PC, Valli VE, Weisbrode SE, Yager J, Heller J, Miller R (2011). Proposal of 2-Tier Histologic Grading System for Canine Cutaneous Mast Cell Tumors to More Accurately Predict Biological Behavior. *Veterinary Pathology*, 48, 1, 147-55.
- Miyoshi N, Tojo E, Oishi A, Fujiki M, Misumi K, Sakamoto H, Kameyama K, Shimizu T, Yasuda N (2002). Immunohistochemical Detection of P-Glycoprotein (PGP) and Multidrug Resistance-Associated Protein (MRP) in Canine Cutaneous Mast Cell Tumors. *Journal of Veterinary Medical Science*, 64, 531-533.
- Nakaichi M, Takeshita Y, Okuda M, Nakamoto Y, Itamoto K, Une S, Sasaki N, Kadosawa T, Takahashi T, Taura Y (2007). Expression of the *MDR1* Gene and P-Glycoprotein in Canine Mast Cell Tumor Cell Lines. *Journal of Veterinary Medical Science*, 69, 2, 111-115.
- 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.
- Rassnick KM, Moore AS, Williams LE, London CA, Kintzer PP, Engler SJ, Cotter SM (1999). Treatment of Canine Mast Cell Tumours with CCNU (Lomustina). *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 13, 601-605, 1999.
- Stancliff RM e Gilson SD (2008). Evaluation of Neoadjuvant Prednisone Administration and Surgical Excision in Treatment of Cutaneous Mast Cell Tumors in Dogs. *Journal of Veterinary Medical Association*, 232, 1, 53-62.
- Webster JD, Yuzbasiyan-Gurkan V, Miller RA, 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.