

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**EXPRESSÃO PROTEICA DA VIA PI3K/ AKT/ mTOR EM
MASTOCITOMAS CUTÂNEOS CANINOS**

Marília Gabriele Prado Albuquerque Ferreira

Médica Veterinária

2014

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**EXPRESSÃO PROTEICA DA VIA PI3K/ AKT/ mTOR EM
MASTOCITOMAS CUTÂNEOS CANINOS**

Marília Gabriele Prado Albuquerque Ferreira

Orientador: Prof. Dr. Andriago Barboza De Nardi

Coorientador (a): Prof^a. Dr^a. Mirela Tinucci Costa

Coorientador (a): Prof^a. Dr^a. René Laufer Amorim

**Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP –
Câmpus de Jaboticabal, como parte das
exigências para a obtenção do título de
Mestre em Medicina Veterinária.**

2014

F383e Ferreira, Marília Gabriele Prado Albuquerque
Expressão proteica da via PI3K/AKT/mTOR em mastocitomas
cutâneos caninos/ Marília Gabriele Prado Albuquerque Ferreira. --
Jaboticabal, 2014
xvi, 98 p. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2014

Orientadora: Andriago Barboza De Nardi

Banca examinadora: Rosemeri de Oliveira Vasconcelos/ Daniel
Guimarães Gerardi.

Bibliografia

1.AKT Thr 308. 2. S6K1. 3. Prognóstico. 4. Imuno-histoquímica. 5.
Neoplasias. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e
Veterinárias.

CDU 619:616-006:636-7

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

MARÍLIA GABRIELE PRADO ALBUQUERQUE FERREIRA – nascida no dia 08 de maio de 1985, natural de São Paulo – SP. Graduada no curso de Medicina Veterinária na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Câmpus de Araçatuba, no ano de 2009. Desenvolveu um projeto de iniciação científica, com bolsa de IC – Fapesp, sob orientação da Prof^a. Adjunto Valéria Marçal Felix de Lima, na área de imunologia veterinária. Durante a graduação, participou de vários cursos e estágios, sendo a maioria relacionada com as áreas de Clínica Médica e Cirúrgica de Pequenos Animais. No período de 2010 a 2012 foi residente do Programa de Aprimoramento Profissional do Centro Universitário de Rio Preto – UNIRP, sob orientação do Prof. MSc. Rodrigo Pereira Storti, na área de Clínica Médica e Cirúrgica de Pequenos Animais. Neste Período, publicou vários resumos científicos em anais de congressos, além de participar de projetos de pesquisa científica. Em Agosto de 2012 foi aprovada no Programa de Pós-Graduação (Mestrado) em Medicina Veterinária (Clínica Médica), na FCAV/UNESP de Jaboticabal, sob orientação do Prof. Dr. Andriago Barboza De Nardi e Coorientação da Prof^a. Dr^a. Mirela Tinucci Costa e da Prof^a. Dr^a. Reneé Laufer Amorim. Palestras e aulas foram ministradas, durante o período de residência e de mestrado, abordando temas relacionados às áreas de Clínica Médica e Cirúrgica de Pequenos Animais e de Oncologia Veterinária. Iniciou em 2012 o curso *latu senso* de Oncologia Veterinária, pelo Instituto Bioethicus em Botucatu. Durante este período também participou do atendimento especializado no Serviço de Oncologia Veterinária do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” da FCAV/UNESP de Jaboticabal, sob a orientação do Prof. Dr. Andriago Barboza De Nardi. Em outubro de 2013 foi aprovada no curso de Doutorado pelo mesmo programa de Pós-Graduação.

AGRADECIMENTOS

Inicialmente agradeço a Deus, por sempre estar ao meu lado, por olhar por mim, e por ter me abençoado com a maravilhosa família que tenho. E peço que continue me acompanhando sempre.

A meus pais, Manoel e Marisa, e minha irmã, Lígia, por todo carinho, preocupação, dedicação e por sempre estarem ao meu lado apoiando e incentivando as minhas decisões.

A meus parentes, em especial à minha avó Aida e ao meu avô Ronalde (*in memoriam*) por toda atenção, carinho e ensinamentos.

A meu orientador Professor Andriago Barboza De Nardi por sempre estar disposto a ajudar, por toda a paciência, atenção e dedicação. O senhor, com certeza, é um exemplo a ser seguido.

À minha coorientadora Professora Reneé Laufer Amorim, por toda atenção, paciência e ajuda na elaboração deste trabalho.

À minha coorientadora Professora Mirela Tinucci Costa pelo apoio e por todos os ensinamentos compartilhados.

A todos os colegas do Serviço de Oncologia Veterinária Érika Terra, Letícia Anai, Livia semolin, Rosana Lino, Giovanna Rossi, Talita Morata, Rafael Huppes, Paulo Jark, Reinaldo Garrido, Thiago Munhoz, Giovanni Vargas, Josiane Pazzini e Rafaela Viéra, por toda ajuda no acompanhamento dos casos e nas coletas.

Às minhas queridas amigas, Samantha Sequetin, Amanda Rivelis, Simone Rivelis, Fernanda Carvalho e Carla Silva, por estarem sempre presentes mesmo que, em grande parte dos momentos, estejamos longe.

Às amigas de Jaboticabal Livia Semolin, Giovanna Rossi, Mayara Rosolem, Talita Morata. Em especial à Ana Paula Gering, Thuanny Lopes e Rosana Lino por dividirem bons momentos, conversas, conselhos, festas, risadas, e pela amizade tão especial. Muito obrigada.

À minha amiga Karina Ferreira de Castro que, com certeza, contribuiu e muito para minha formação e me incentivou a estar onde estou hoje.

Ao amigo Carlos Eduardo Fonseca, e a estagiária Bianca Martins por toda colaboração e ajuda na elaboração deste trabalho.

Aos funcionários Val, Cidinha, Eugênio, por toda ajuda e disposição.

Aos funcionários do programa de pós-graduação e aos funcionários do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), UNESP Jaboticabal, por toda ajuda e colaboração.

Aos meus filhos de quatro patinhas Cindy, Jerry, Madonna, Mel (in memorian) e Aidolem, vocês, com certeza, contribuíram e muito com as minhas escolhas. Em especial, a minha paixão, Electra, que está presente em minha vida desde o primeiro ano de faculdade, que dividiu comigo bons e maus momentos. Aprendo com você a cada dia.

À querida Tatiana Hesse por toda paciência, carinho, atenção, e por ser tão especial na minha vida.

A todos os pacientes que colaboraram com a realização deste trabalho. E que, com certeza, fazem da nossa profissão algo tão especial.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa concedida e à FAPESP (FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA NO ESTADO DE SÃO PAULO) pelo auxílio financeiro, que permitiu a realização deste trabalho.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

| | Página |
|---|--------|
| CERTIFICADO CEUA | viii |
| LISTA DE ABREVIATURAS | ix |
| LISTA DE TABELAS | xi |
| LISTA DE FIGURAS | xiii |
| CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS | 1 |
| Introdução | 1 |
| Revisão da literatura | 2 |
| Referências | 9 |
| | |
| CAPÍTULO 2 – ASSOCIAÇÃO ENTRE A IMUNOMARCAÇÃO DAS PROTEÍNAS DA VIA PI3K/AKT/mTOR E OS ACHADOS CLÍNICOS DE CÃES COM MASTOCITOMA CUTÂNEO: DETERMINAÇÃO DE NOVOS MARCADORES PROGNÓSTICOS | 18 |
| Resumo | 18 |
| Abstract | 19 |
| Introdução | 20 |
| Material e Métodos | 22 |
| Amostras | 22 |
| Reação de imuno-histoquímica | 24 |
| Análise estatística | 26 |
| Resultados | 26 |
| Dados epidemiológicos | 26 |
| Imunomarcação das proteínas da via PI3K/AKT/mTOR | 28 |
| Associação da imunomarcação das proteínas da via PI3K/AKT/mTOR com os achados clínicos dos pacientes e características tumorais | 30 |
| Análise de sobrevida dos pacientes | 36 |
| Discussão | 39 |
| Conclusão | 47 |
| Referências | 47 |

| | |
|--|----|
| CAPÍTULO 3 – ASSOCIAÇÃO ENTRE A IMUNOMARCAÇÃO DAS PROTEÍNAS DA VIA PI3K/AKT/mTOR E OS ACHADOS PATOLÓGICOS DE CÃES COM MASTOCITOMA CUTÂNEO: DETERMINAÇÃO DE NOVOS MARCADORES PROGNÓSTICOS | 56 |
| Resumo | 56 |
| Abstract | 57 |
| Introdução | 58 |
| Material e métodos | 61 |
| Amostras | 61 |
| Reação imuno-histoquímica | 62 |
| Análise estatística | 64 |
| Resultados | 64 |
| Classificação histopatológica e imunomarcação de KIT e Ki-67 | 64 |
| Imunomarcação das proteínas da via PI3K/AKT/mTOR | 66 |
| Associação da imunomarcação das proteínas da via PI3K/AKT/mTOR com os achados patológicos | 71 |
| Análise da sobrevida dos pacientes | 73 |
| Discussão | 76 |
| Conclusão | 81 |
| Referências | 81 |
| APÊNDICE 1 | 90 |

CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 004846/13 do trabalho de pesquisa intitulado "**Expressão proteica da via PI3K/Akt/mTOR em mastocitomas caninos**", sob a responsabilidade do Prof. Dr. Andriago Barboza De Nardi, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 11 de Abril de 2013.

Jaboticabal, 11 de Abril de 2013.



Prof. Dr. Mateus José Rodrigues Paranhos da Costa
Vice-Coordenador - CEUA

LISTA DE ABREVIATURAS

- 4EBP1 – Fator de iniciação eucariótico 4E ligante de proteína
- AgNORs – Região organizadora nucleolar argirofílica
- AKT – Proteína quinase B
- AMPK – Proteína-quinase ativadora de adenosina monofosfato
- cm³ – Centímetros cúbicos
- GβL – Subunidade β da proteína G
- IF4E – Fator de iniciação da tradução eucariótica 4E
- IM – Índice mitótico
- ITK – Inibidor de receptor de tirosina quinase
- LKB1 – Serina treonina quinase 11
- M – Monoclonal
- M0 – Ausência de metástase à distância
- M1 – Presença de metástase à distância
- MCT – Mastocitoma
- mSin 1 – Proteína quinase associada à proteína mitogênica ativada 1
- mTOR – Alvo da rapamicina em mamíferos
- N0 – Ausência de metástase em linfonodos regionais
- N1 – Presença de metástase em linfonodos regionais
- P – Policlonal
- PDK1 – Proteína-quinase 1 dependente de fosfoinosítídeo
- PH – Pleckistrina
- PI3K – Fosfatidil inositol 3 quinase
- PIP2 – Fosfatidilinositol-4, 5-bifosfato
- PIP3 – Fosfatidilinositol-3, 5-trifosfato

PTEN – Fosfatase e tensina homóloga deletada do cromossomo 10

Raptor – Proteína regulatória associada à TOR

Rictor – Proteína associada à TOR insensível a rapamicina

RNA – Ácido ribonucleico

S6K1 – Quinase ribossomal S6

SCF – Fator de células tronco

SRD – Sem raça definida

SV – Sobrevida

TSC1 – Hamartina

TSC2 – Tuberina

LISTA DE TABELAS

Página

CAPÍTULO 2

Tabela 1: Diluições, clones, procedência e tempo de incubação dos anticorpos primários utilizados em MTC caninos. Jaboticabal, 2014 25

Tabela 2: Associação entre a intensidade de marcação de p-AKT Thr 308 com as variáveis clínicas dos pacientes e características tumorais. Jaboticabal, 2014..... 33

Tabela 3: Associação entre a intensidade de marcação de p-S6K1 com as variáveis clínicas dos pacientes e características tumorais. Jaboticabal, 2014 34

CAPÍTULO 3

Tabela 1: Diluições, clones, procedência e tempo de incubação dos anticorpos utilizados em mastocitomas caninos (cortes parafinizados). Jaboticabal, 2014..... 62

Tabela 2: Parâmetros histopatológicos e imuno-histoquímicos dos mastocitomas do grupo de alto grau (KIUPEL et al., 2011). Jaboticabal, 2014 65

Tabela 3: Parâmetros histopatológicos e imuno-histoquímicos dos mastocitomas do grupo de baixo grau (KIUPEL et al., 2011). Jaboticabal, 2014..... 65

| | |
|---|----|
| Tabela 4: Resultado da análise de intensidade de marcação da proteína p-AKT Thr 308 nos dois grupos estudados (alto e baixo grau) ($P = 0,0022$). Jaboticabal, 2014..... | 67 |
| Tabela 5: Resultado da análise de intensidade de marcação da proteína p-S6K1 nos dois grupos estudados (alto e baixo grau) ($P < 0,0001$). Jaboticabal, 2014..... | 69 |
| Tabela 6: Associação entre a intensidade de imunomarcação de p-AKT Thr 308 com as variáveis patológicas das amostras de mastocitomas caninos. Jaboticabal, 2014..... | 72 |
| Tabela 7: Associação entre a intensidade de imunomarcação de p-S6K1 com as variáveis patológicas das amostras de mastocitomas caninos, Jaboticabal, 2014..... | 72 |

LISTA DE FIGURAS

| | Página |
|---|--------|
| CAPÍTULO 1 | |
| Figura 1: Ilustração da via PI3K/AKT/mTOR | 8 |
| CAPÍTULO 2 | |
| Figura 1: Fotomicrografia mostrando a intensidade e localização da imunomarcação de p-AKT Thr 308 em MCT caninos. A: MCT com marcação fraca, nuclear e citoplasmática. B: MCT com marcação moderada, nuclear e citoplasmática C: MCT com marcação forte, nuclear e citoplasmática. Imuno-histoquímica, DAB, contra-coloração Hematoxilina. Barra = 50 µm. Jaboticabal, 2014..... | 31 |
| Figura 2: Fotomicrografia mostrando a intensidade e localização da imunomarcação de p-S6K1 em MCT canino. A: MCT com marcação fraca, nuclear e citoplasmática. B: MCT com marcação moderada, nuclear e citoplasmática. C: MCT com marcação forte, nuclear e citoplasmática. Imuno-histoquímica, DAB, contra-coloração Hematoxilina. Barra = 50 µm. Jaboticabal, 2014..... | 32 |
| Figura 3: Comparação entre o tempo de sobrevida dos pacientes dos grupos: SV ≤ 6 meses e SV > 6 meses. Jaboticabal, 2014..... | 37 |
| Figura 4a: Comparação do tempo de sobrevida dos pacientes amostrados com os parâmetros clínicos e características tumorais. A. Comparação entre | |

pacientes em estádios I, II, III, IV e V. (*) diferença estatisticamente significativa. B. Comparação entre pacientes com tumores maiores ou menores que 3 cm. C. Comparação entre o tempo de sobrevida dos pacientes com presença de metástases em linfonodos regionais (N1) e pacientes com linfonodos livres de células tumorais (N0). D. Comparação entre o tempo de sobrevida dos pacientes com presença de metástases à distância (M1) e pacientes sem metástases à distância (M0). Jaboticabal, 2014..... 37

Figura 4b: Comparação do tempo de sobrevida dos pacientes com os parâmetros clínicos e características tumorais. E. Comparação entre a presença ou não de ulcerações tumorais. F. Comparação entre a localizações tumorais, divididas segundo as regiões anatômicas. (*) diferença estatisticamente significativa. G. Comparação entre as principais raças acometidas. (*) diferença estatisticamente significativa. H. Comparação entre as velocidades de crescimento tumoral (rápido e lento). I. Comparação entre as consistências tumorais (macia e firme). J. Comparação entre os tratamentos instiuidos (Cirurgia, Cirurgia + Quimioterapia antineoplásica ou ITK: inibidor de receptor tirosina quinase). (*) diferença estatisticamente significativa. Jaboticabal, 2014. 38

Figura 5: Avaliação do tempo de sobrevida dos pacientes em relação à intensidade de imunomarcção de p-AKT Thr 308 e p-S6K1. A. Imunomarcção de p-AKT Thr 308. B. Imunomarcção de p-S6K1. Jaboticabal, 2014..... 39

CAPÍTULO 3

Figura 1: Fotomicrografia mostrando a intensidade e localização da imunomarcção de p-AKT Thr 308 em MCT caninos. A: MCT com marcação fraca, nuclear e citoplasmática. B: MCT com marcação moderada, nuclear e citoplasmática. C: MCT com marcação forte, nuclear e citoplasmática. Imuno-histoquímica, DAB, contra-coloração Hematoxilina. Barra = 50 µm.

Jaboticabal, 2014..... 68

Figura 2: Fotomicrografia mostrando a intensidade e localização da imunomarcção de p-S6K1 em MCT canino. A: MCT com marcação fraca, nuclear e citoplasmática. B: MCT com marcação moderada, nuclear e citoplasmática. C: MCT com marcação forte, nuclear e citoplasmática. Imuno-histoquímica, DAB, contra-coloração Hematoxilina. Barra = 50 µm.

Jaboticabal, 2014..... 70

Figura 3a: Avaliação do tempo de sobrevida dos pacientes em relação aos parâmetros histopatológicos e imuno-histoquímicos. A. Comparação com o grau histopatológico, segundo a classificação de Patnaik, que divide os tumores em graus I, II e III. (*) diferença estatisticamente significativa. B. Grau histopatológico, segundo a classificação de Kiupel, que divide os tumores em alto e baixo grau. C. Comparação entre tumores com índice mitótico superior ou inferior a cinco. D. Comparação em relação a classificação do receptor c-KIT (KIT I, II e III). (*) diferença estatisticamente significativa. Jaboticabal, 2014..... 74

Figura 3b: Avaliação do tempo de sobrevida dos pacientes em relação ao parâmetro imuno-histoquímico. E. Ki-67 comparação entre tumores com contagem superior e inferior a 23..... 75

Figura 4: Avaliação do tempo de sobrevida dos pacientes em relação à intensidade de imunomarcção de p-AKT Thr 308 e p-S6K1. A. Imunomarcção de p-AKT Thr 308. (*) diferença estatisticamente significativa. B. Imunomarcção de p-S6K1. (*) diferença estatisticamente significativa. Jaboticabal, 2014 75

CAPÍTULO 1 – Considerações gerais

Introdução

O câncer, atualmente, é a principal causa de óbito em cães e gatos, caracterizando-se como um processo complexo decorrente de um desequilíbrio entre o crescimento e divisão celular, os quais por sua vez, são resultantes do acúmulo de inúmeras mutações genéticas que provocam alterações no ciclo celular normal (DALECK et al., 2009).

Segundo Hanahan e Weinberg (2011), oito alterações na fisiologia celular estão incriminadas na indução de transformações celulares malignas, tais como, evasão da apoptose, potencial replicativo ilimitado, insensibilidade à inibição de fatores de crescimento, angiogênese contínua, mecanismos de invasão e metástase celular, autossuficiência dos fatores de crescimento, reorganização do metabolismo energético e evasão da destruição celular pelo sistema imune.

Atualmente inúmeros estudos têm sido conduzidos tanto na medicina humana como na veterinária, visando desvendar mecanismos que possam estar envolvidos na etiologia do câncer. E com isso, desenvolver novas moléculas antitumorais, ou mesmo, candidatar pacientes portadores de uma determinada neoplasia, a terapias já empregadas em pacientes portadores de outras neoplasias, que sabidamente respondem àquela terapia específica (McAULIFFE et al., 2010; HANAHAN e WEINBERG, 2011; CHEN et al., 2012).

O mastocitoma (MCT), uma neoplasia cutânea muito comum no cão, se encaixa neste perfil, visto que sua etiologia não está completamente elucidada e a busca por fármacos mais efetivos aumenta a cada ano (BLACKWOOD et al., 2012; LONDON e THAMM, 2013).

Nos últimos anos a via de sinalização PI3K/AKT/mTOR vem atraindo a atenção de diversos pesquisadores, pois é sabido que esta via está implicada na etiologia de diversas neoplasias (GHAYAD e COHEN, 2010). Além disso, alguns dos componentes da via supracitada apresentam inibidores específicos já desenvolvidos, que atualmente encontram-se em ensaios clínicos (GHAYAD e COHEN, 2010; McAULIFFE et al., 2010).

Desta forma, o presente estudo teve como objetivo avaliar se as proteínas que compõe a via PI3K/AKT/mTOR encontram-se ativadas no MCT canino, visando com isso determinar possíveis marcadores prognósticos para esta neoplasia. Para isso, buscou-se verificar a associação da imunomarcção das proteínas dessa via com os parâmetros clínicos, patológicos e com o tempo de sobrevida dos pacientes deste estudo.

Revisão da literatura

O mastócito surge como um precursor na medula óssea, migrando para os tecidos periféricos, onde, sob influência de citocinas locais, se diferencia em mastócitos maduros. Em animais saudáveis, os mastócitos estão presentes na maioria dos tecidos, especialmente em locais nos quais há o contato do organismo com o meio ambiente (pele e mucosas). Ocasionalmente, o mastócito pode ser observado na medula óssea, porém quase nunca na circulação (SCOTT e STOCKHAM, 2000).

O mastocitoma (MCT) é uma neoplasia caracterizada pela proliferação neoplásica de mastócitos (BLACKWOOD et al., 2012), sendo considerado como o segundo tumor maligno mais frequente no cão (DALECK et al., 2009).

Estudos referem que cães da raça Boxer, Boston Terrier, Bulldog, Labrador Retriever, Golden Retriever, Beagle e Schnauzer apresentam uma maior predisposição ao desenvolvimento deste tipo tumoral (GOLDSCHMIDT e HENDRICK, 2002; BAKER-GABB et al., 2003; GIEGER et al., 2003; LONDON e THAMM, 2013). A literatura não descreve uma predisposição sexual para a ocorrência desta neoplasia e sua incidência aumenta de acordo com a idade, com média em torno de 8,5 anos (STREFEZZI et al., 2010). Entretanto, alguns autores relatam haver uma maior incidência de MCT em cães jovens da raça Sharpei (MILLER, 1995).

Com características macroscópicas extremamente variadas, os MCTs podem se apresentar de maneira agressiva, como nódulos, massas ou placas eritematosas, com grandes dimensões, firmes, ulceradas, aderidas e infiltrativas, com múltiplos nódulos, à lesões com características benignas como nódulos únicos e pequenos, bem delimitados, não ulcerados, macios e não aderidos (GOLDSCHMIDT e HENDRICK, 2002; DALECK et al., 2009;

LONDON e THAMM, 2013). Essa peculiaridade lhes confere o título de “o grande imitador”, visto que podem mimetizar inúmeras outras lesões (MURPHY, 2007).

O diagnóstico, geralmente, é estabelecido por meio de exames cito e histopatológico, associados aos sinais clínicos (RECH et al., 2004). A citologia aspirativa por agulha fina é capaz de sugerir o diagnóstico em 92 a 96% dos casos (BAKER-GABB et al., 2003). As células que compõe o MCT, geralmente, são arredondadas, com núcleo centralizado e ovalado, que dependendo da quantidade de grânulos intracitoplasmáticos, pode não ser visualizado. Dentre os diferenciais para os tumores que possuem pouca granulação intracitoplasmática incluem-se os tumores de células redondas tais como linfoma, o histiocitoma, o plasmocitoma, o melanoma amelanico e o tumor venéreo transmissível (LONDON e SEGUIN, 2003).

A citologia é um método de triagem bastante sensível (ILAVALLE et al., 2003), entretanto, o exame histopatológico é imperativo para o diagnóstico definitivo (FURLANI et al., 2008). O grau histológico está fortemente relacionado com a sobrevida dos animais, porém não permite estimar o comportamento tumoral em todos os casos (GOLDSCHMIDT e HENDRICK, 2002; WEBSTER et al., 2007), visto que no cão, o comportamento biológico do MCT cutâneo é extremamente variável, de pouco agressivo a altamente maligno.

Atualmente duas classificações vêm sendo utilizadas na determinação do grau histológico dos MCTs. A primeira delas, divide os MCTs em três graus, de acordo com as características das células neoplásicas, número de figuras de mitose e invasão do tumor nos tecidos subjacentes, sendo os MCTs de grau I bem diferenciados, os de grau II moderadamente diferenciados e os de grau III pouco diferenciados. Segundo os autores, pacientes com MCT grau I apresentam uma sobrevida superior a 1500 dias em 94% dos casos, a mesma sobrevida é observada em 56% e 7% dos pacientes com MCTs grau II e III, respectivamente (PATNAIK et al., 1984).

A outra classificação utilizada é a proposta por Kiupel e colaboradores (2011), que divide os MCTs em 2 graus, alto e baixo. Visando diminuir a variação entre observadores, essa classificação baseou-se em critérios mais objetivos, visto que a contagem do número de figuras de mitose, de células

multinucleadas, de núcleos bizarros e cariomegalia é feita de forma quantitativa. Essa segunda classificação também está associada com o tempo de sobrevida dos pacientes, sendo que animais com MCT de alto grau apresentam tempo de sobrevida inferior a quatro meses, já os animais com MCT de baixo grau, apresentam tempo de sobrevida superior a 24 meses.

Outro fator que tem mostrado valor diagnóstico e, também, prognóstico para o MCT é a expressão do receptor c-KIT, uma vez que todos os MCTs caninos expressam c-KIT. Mesmo que a intensidade da reação seja diferente, tal marcação permite realizar o diagnóstico em casos de tumores de células redondas indiferenciados (LONDON et al., 1996; REGUERA et al., 2000; MORINI et al., 2004). Webster e colaboradores (2007) descrevem três padrões de marcação de c-KIT, padrão KIT I (membranoso), II (citoplasmático focal) e III (citoplasmático difuso). Segundo esses autores, existe uma associação significativa entre os padrões citoplasmáticos com a recidiva local e com um menor tempo de sobrevida (WEBSTER et al., 2007).

Outros fatores que podem auxiliar na predição do prognóstico do paciente são os marcadores de proliferação (BLACKWOOD et al., 2012). O índice mitótico (IM) é o número de mitoses contadas em dez campos de grande aumento (BLACKWOOD et al., 2012). Segundo Romansik e colaboradores (2007), pacientes com IM menor ou igual a cinco apresentavam tempo médio de sobrevida de 70 meses, enquanto que pacientes com IM superior a cinco, apresentavam tempo médio de sobrevida de dois meses.

Outro marcador de proliferação que mostra-se significativamente, associado ao prognóstico do paciente com MCT é o Ki-67. Contagens de Ki-67 superior a 23 estão associadas ao aumento da mortalidade, recidivas e ocorrência metástases (ABADIE et al., 2005; WEBSTER et al., 2006; WEBSTER et al., 2007). A contagem das AgNORs (região organizadora nucleolar argirofílica) também representa valor prognóstico nos MCT caninos visto que, aproximadamente, 75% dos pacientes cujos tumores apresentam altas contagem de AgNORs vieram a óbito em decorrência do tumor, em até quatro meses após a intervenção cirúrgica (BOSTOCK et al., 1989).

Além dos marcadores patológicos, diversos autores têm relacionado características clínicas dos pacientes com o prognóstico dos mesmos. Dentre estas, pode-se citar o tamanho e localização do tumor, a velocidade de

crescimento, a presença de metástases em linfonodos regionais e à distância, estadiamento e a raça do paciente (BOSTOCK et al., 1973; GIEGER et al., 2003; LONDON e SEGUIN, 2003; HANH et al., 2004; KIUPEL et al., 2005; MULLINS et al., 2006; DALECK et al., 2009; HANH et al., 2008; LONDON e THAMM, 2013).

Outro fator ainda controverso e desconhecido é a etiologia dos MCT em cães (BLACKWOOD et al., 2012). Alguns estudos sugeriram um envolvimento viral (LOMBARD e MOLONEY, 1959) outros, a ação de carcinógenos tópicos (LONDON e SEGUIN, 2003) e também a inflamação crônica (GOVIER, 2003). Entretanto, a alta incidência deste tipo tumoral em determinadas raças, sugere uma possível causa de base genética (DALECK et al., 2009).

O fator de células tronco (SCF), quando ligado ao seu receptor, KIT, tem um papel importante na diferenciação, sobrevivência e funcionamento dos mastócitos. Mutações no gene c-KIT, induzindo a sua ativação, mesmo na ausência da ligação com o SCF, têm sido identificadas em casos de MCT canino (DALECK et al., 2009). Estudos sugerem que, aproximadamente, 40% dos MCTs caninos expressam mutações no gene c-KIT (RIVA et al., 2005; WEBSTER et al., 2006). Entretanto, a etiologia de mais da metade dos MCT ainda permanece desconhecida (WELLE et al., 2008).

Segundo Kim e colaboradores (2008), Ma e colaboradores (2011) e Shin e colaboradores (2012), a via PI3K (fosfatidil inositol 3 quinase) desempenha um papel essencial no crescimento, sobrevivência e funcionamento de mastócitos. A via PI3K/AKT/mTOR (fosfatidil inositol 3 quinase/ proteína quinase B/ alvo da rapamicina em mamíferos) tem sido apontada com a segunda via mais alterada em processos neoplásicos (AGARWAL et al., 2010). Inclusive, segundo Amagai e colaboradores (2013), em seu estudo *in vitro*, observaram que esta via desempenha papel crucial no desenvolvimento do MCT.

A via PI3K/AKT/mTOR compreende uma cascata de serina/treonina-quinases que regulam uma variedade de processos celulares, incluindo a progressão do ciclo celular, sobrevivência celular, migração e síntese protéica. Recentes evidências comprovam que a desregulação dessa via está associada a promoção da tumorigênese e angiogênese em diversas neoplasias (JIANG e LIU, 2009).

A ativação dos receptores tirosina-quinase induz a ativação da via PI3K/AKT/mTOR (KNOWLSEN, 2008). Uma vez que o receptor está ativado, a porção intracelular do mesmo é autofosforilada e é utilizada como “sítio de ancoragem” para algumas proteínas como a PI3K (MARONE et al., 2008). Depois de fosforilada, a PI3K, é responsável pela conversão de PIP2 (fosfatidilinositol-4, 5-bisfosfato) em PIP3 (fosfatidilinositol-3, 4, 5-trifosfato) (MARTELLI et al., 2007), recrutando, assim, proteínas que contenham homologia com a pleckstrina (PH), como a AKT e a PDK1 (proteína-quinase 1 dependente de fosfoinosítido-3) (KANG et al., 2005). A interação do domínio PH do AKT com o PIP3 provocará alterações conformacionais na molécula de AKT, resultando na exposição de dois sítios de fosforilação (Thr 308 no domínio quinase e Ser 473 no domínio regulatório) (JACINTO et al., 2006).

O *PTEN* (fosfatase e tensina homóloga deletada do cromossomo 10) é um gene supressor tumoral, responsável por desfosforilar PIP3 em PIP2. Entretanto, a perda ou diminuição da expressão de *PTEN* indiretamente estimula a atividade de PI3K, levando a ativação constitutiva do AKT e à regulação positiva do mTOR (McAULIFFE et al., 2010).

A completa ativação de AKT somente ocorre por meio de dois eventos: no primeiro, AKT é parcialmente ativado pela fosforilação por PDK1 na Thr 308; no segundo, a ativação completa de AKT requer a fosforilação do Ser 473 por mTOR-Rictor (EFEYAN e SABATINI, 2010).

A regulação de mTOR pela proteína AKT pode ocorrer de forma direta ou indireta (LAPLANTE e SABATINI, 2009). No primeiro caso, a proteína AKT pode ativar mTOR pela fosforilação nos domínios Thr 2446 e Ser 2448 dessa proteína e, no segundo, ela pode inibir a atividade do complexo TSC1/TSC2 (hamartina/tuberina) (ZHANG et al., 2003) (Figura 1).

O complexo TSC1/TSC2 atua como uma proteína de ativação da GTPase (GAP), inibindo a proteína G Rheb (homólogo de Ras enriquecido no cérebro). Por fosforilar TSC2, a AKT perturba o complexo TSC, permitindo assim que a Rheb se ligue ao ATP e converta-se do estado GDP-Rheb (inativo) para o estado GTP-Rheb (ativo). GTP-Rheb, por sua vez, se liga ao domínio quinase de mTOR-Raptor (INOKI et al., 2002; ZHANG et al., 2003) e essa ligação provoca alterações conformacionais no complexo mTOR-Raptor promovendo sua ativação (LONG et al., 2005).

Em paralelo, nas situações de baixo aporte energético, LKB1 (serina treonina quinase 11) ativa a proteína AMPK (proteína-quinase ativadora de adenosina monofosfato), que por sua vez fosforila e acaba ativando a TSC2, inibindo assim a ativação de mTOR (CORRADETTI et al., 2004; SHAW et al., 2004). Portanto, PI3K/AKT e LKB1/AMPK atuam como reguladores da via do mTOR. Ambos relacionam-se com o complexo TSC1/TSC2, porém atuando de modos opostos (INOKI et al., 2003) (Figura 1).

A proteína mTOR é uma serina/treonina quinase, considerada membro da família proteína-quinase, envolvida em múltiplas funções celulares (ZONCU et al., 2011). Esta se apresenta sob a forma de dois complexos: o complexo TORC1, em que mTOR está ligado a Raptor (proteína regulatória associada à TOR) e GβL (subunidade β da proteína G) e o complexo TORC2, no qual mTOR está ligado a Rictor (proteína associada à TOR insensível a rapamicina), GβL e a mSin 1 (proteína quinase associada à proteína mitogênica ativada 1) (LAPLANTE e SABATINI, 2009).

No complexo TORC1, mTOR fosforila seus efetores S6K1 (quinase ribossomal S6) e 4EBP1 (fator de iniciação eucariótico 4E ligante de proteína). A fosforilação do 4EBP1 culmina com a liberação de eIF4E (Fator de iniciação da tradução eucariótica 4E), que até então estavam ligados, induzindo assim a ativação de eIF4E. Desta forma, através da fosforilação de seus efetores, mTOR influencia o crescimento e proliferação celular, através da biossíntese de proteínas, lipídeos e organelas e também pela inibição de processos catabólicos (LAPLANTE e SABATINI, 2009). Portanto, a ativação de 4EBP1 é frequentemente utilizada como marcador da atividade de TORC1 (HAY e SONENBERG, 2004) (Figura 1).

O complexo TORC2 controla a actina do citoesqueleto, além de ser capaz de fosforilar AKT. Por esta razão, alguns estudos sugerem que este complexo corresponde à proteína PDK2, até então desconhecida. É portanto, incriminado com o responsável por um *feedback* positivo da via (FOSTER e FINGAR, 2010).

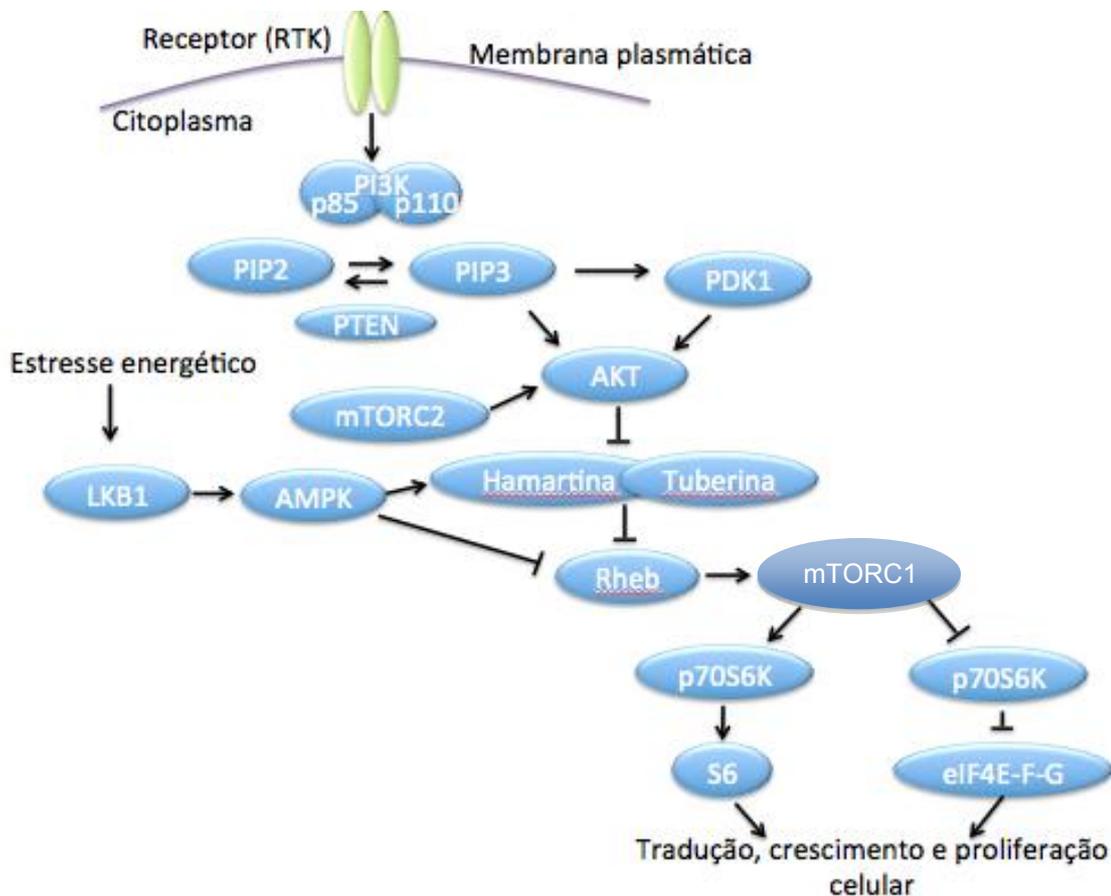


Figura 1. Ilustração da via PI3K/AKT/mTOR. Estímulos vindos de PI3K e AMPK podem iniciar a via. Depois de ativado AKT fosforila TSC2, inibindo a atividade de GAP do complexo Hamartina/Tuberina e consequentemente ativam TORC-1. AMPK, por sua vez, fosforila TSC2, impedindo que o complexo Hamartina/Tuberina exerça sua atividade sobre GTPase-Rheb e com isso ocorre a inibição de mTOR (modificado de MILLER et al., 2011). Jaboticabal, 2014.

A avaliação da via PI3K/AKT/mTOR e sua ativação aberrante têm sido descritas em diversas neoplasias humanas, tais como o câncer de mama na mulher (CASTANEDA et al., 2010), o câncer colorretal (QUESNELLE et al., 2007), os carcinomas de células escamosas (CLARK et al., 2010), os angiossarcomas (LAHAT et al., 2010) e tumores de tecidos moles (DOBASHI et al., 2009). Esta via é incriminada como a segunda via mais frequentemente ativada em processos neoplásicos, depois das alterações que são vistas na via do p53 (AGARWAL et al., 2010).

O interesse na avaliação de componentes desta via vem crescendo, já que, atualmente, estes são considerados alvos promissores para o desenvolvimento de novas moléculas antitumorais. Alguns destes inibidores, tais como NVP-BKM120 (inibidor de PI3K), Perifosine e Triciribine (inibidores de AKT), Temsirolimus, Rapamicina e Everolimus (inibidores de mTOR) e NVP-BEZ235 (inibidor duplo de PI3K e mTOR) estão sendo utilizados em ensaios clínicos (GHAYAD e COHEN, 2010).

Além do promissor potencial terapêutico das proteínas desta via, inúmeros trabalhos têm associado alterações gênicas e proteicas da via PI3K/AKT/mTOR ao prognóstico de pacientes oncológicos (DE BENEDETTI e GRAFF, 2004; KIM et al., 2009; KIM et al., 2011). Fazendo com que, a pesquisa de marcadores tumorais envolvendo os componentes dessa via, permita ao clínico a determinação de fatores prognósticos e preditivos para o paciente oncológico.

REFERÊNCIAS

ABADIE, J.; CHRISTOPHE, J.; DELVERDIER, M.; CADIERGUES, M. C.; WYERS, M. Immunohistochemical detection of the oncoprotein KIT as a prognostic marker in canine and feline mast cell tumor. **23rd Meeting of the European Society of Veterinary Pathology**, Padova, Italy, 2005.

AGARWAL, R.; CAREY, M.; HENNESSY, B.; MILLS, G. B. PI3K pathway-directed therapeutic strategies in cancer. **Current Opinion in Investigational Drugs**, v. 11, p. 615-628, 2010.

AMAGAI, Y.; TANAKA, A.; MATSUDA, A.; OIDA, K.; JUNG, K.; MATSUDA, H. The phosphoinositide 3-kinase pathway is crucial for the growth of canine mast cell tumors. **Internal Medicine**, v. 75, n. 6, p. 791-793, 2013.

BAKER-GABB, M.; HUNT, G. B.; FRANCE, M. P. Soft tissue sarcomas and mast cell tumours in dogs; clinical behaviour and response to surgery. **Australian Veterinary Journal**, v. 81, p. 732–780, 2003.

BOSTOCK, D. E. The prognosis following surgical removal of mastocytomas in dogs. **Journal of Small Animal Practice**, v. 14, p. 27-40, 1973.

BOSTOCK, D.; CROCKER, J.; HARRIS, K.; SMITH, P. Nucleolar organizer regions as indicators of postsurgical prognosis in canine spontaneous mast cell tumour. **British Journal of Cancer**, v. 59, p. 915-18, 1989.

BLACKWOOD, L.; MURPHY, S.; BURACCO, P.; DE VOS, J. P.; DE FORNEL-THIBAUD, P.; HIRSCHBERGER, J.; KESSLER, M.; PASTOR, J.; PONCE, F.; SAVARY-BATAILLE, K.; ARGYLE, D. J. European consensus document on mast cell tumours in dogs and cats. **Veterinary and comparative oncology**, v. 10, p. e1-e29, 2012.

CASTANEDA, C. A.; CORTES-FUNES, H.; GOMEZ, H. L.; CIRUELOS, E. M. The phosphatidyl inositol 3- kinase/AKT signaling pathway in breast cancer. **Cancer Metastasis Reviews**, v. 29, p. 751-759, 2010.

CHEN, Y.; TAN, K. A.; PANG, L. Y. ARGYLE, D. J. The class I PI3K/Akt pathway is critical for cancer cell survival in dogs and offers an opportunity for therapeutic intervention. **BMC Veterinary Research**, v. 8, n. 73, p. 1-15, 2012.

CLARK, C.; SHAH, S.; HERMAN-FERDINANDEZ, L.; EKSHYYAN, O.; ABREO, F.; RONG, X.; LURIE, A.; MILLIGAN, E. J.; NATHAN, C. O. Teasing out the best molecular marker in the AKT/mTOR pathway in head and neck squamous cell cancer patients. **Laryngoscope**, v. 120, p. 1159-1165, 2010.

CORRADETTI, M. N.; INOKI, K.; BARDEESY, N.; DEPINHO, R. A.; GUAN, K. L. Regulation of the TSC pathway by LKB1: evidence of a molecular link between tuberous sclerosis complex and Peutz-Jeghers syndrome. **Genes and Development**, v. 18, p. 1533-1538, 2004.

DE BENEDETTI A.; GRAFF, J. R. eIF-4E expression and its role in malignances and metástases. **Oncogene**, v. 23, p. 3189-3199, 2004.

DOBASHI, Y.; SUZUKI, S.; SATO, E.; HAMADA, Y.; YANAGAWA, T.; et al. EGFR-dependet and independent activation of AKT/mTOR cascade in bone and soft tissue tumours. **Modern Pathology**, v. 22, p. 1328 – 1340, 2009.

DALECK, C. R.; ROCHA, N. S.; FURLANI, J. M.; CESAR, J. R. F. Mastocitoma. In: DALECK, C. R.; DE NARDI, A. B.; RODASKI, S. **Oncologia em Cães e Gatos**, 1ª Edição. São Paulo: Roca, cap. 16, p. 281-292, 2009.

EFEYAN, A.; SABATINI, D. M. mTOR and cancer: many loops in one pathway. **Current Opinion in Investigational Drugs**, v. 22 n. 2, p. 169-176, 2010.

FOSTER, K. G.; FINGAR, D. C. Mammalian target of rapamycin (mTOR): conducting the cellular signaling symphony, **Journal of Biological Chemistry** v. 285, p. 14071–14077, 2010.

FURLANI, J. M.; DALECK, C. R.; VICENTI, F. A. M.; DE NARDI, A. B.; PEREIRA, G. T.; SANTANA, A. E.; EURIDES, D.; SILVA, L. A. F. Mastocitoma Canino: Estudo retrospectivo. **Ciência Animal Brasileira**, v.9, n.1, p. 242-50, 2008.

GHAYAD, S. E.; COHEN, P. A. Inhibitors of the PI3K/AKT/mTOR pathway: new hope for breast cancer patients. **Recent Patents on Anti-cancer Drug Discovery**, v. 5, p. 29-57, 2010.

GIEGER, T.; THÉON, A.; WERNER, J.; MCENTEE, M.; RASSNICK, K.; DECOCK, H. Biologic Behavior and Prognostic Factors for Mast Cell Tumors of the Canine Muzzle: 24 Cases (1990-2001). **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 17, p. 687-92, 2003.

GOLDSCHMIDT, M.H.; HENDRICK, M.J. Tumors of the skin and soft tissues. In: MEUTEN, D.J. **Tumors in Domestic Animals**, 4.ed. Ames: Iowa State, Cap.3, p.105-109, 2002.

GOVIER, S. Principles of Treatment for Mast Cell Tumors. **Clinical**

Techniques in Small Animal Practice, v. 18, n. 2, p. 103-06, 2003.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v.4, n. 144, p. 646-674, 2011.

HAHN, K.A.; KING, G.K.; CARRERAS, J.K. Efficacy of radiation therapy for incompletely resected grade-III mast cell tumors in dogs 31 cases (1987–1998). **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 224, p. 79–82, 2004.

HAHN, K. A.; OGILVIE, G.; RUSK, T.; DEVAUCHELLE, P.; LEBLANC, A.; LEGENDRE, A.; POWERS, B.; LEVENTHAL, P. S.; KINET, J. P.; PALMERINI, F.; DUBREUIL, P.; MOUSSY, A.; HERMINE, O. Masitinib is safe and effective for the treatment of canine mast cell tumors. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 22, p. 1301–1309, 2008.

HAY, N.; SONENBERG, N. Upstream and downstream of mTOR. **Genes and Development**, v. 18, p. 1926-1945, 2004.

ILAVALLE, G. E.; CARNEIRO, R. A.; PEREIRA, L. C. Punção aspirativa por agulha fina para diagnóstico de mastocitoma em cães. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.55, n. 4, 2003.

INOKI, K.; LI, Y.; ZHU, T.; WU, J.; GUAN, K. L.; TSC2 is phosphorylated and inhibited by AKT and suppresses mTOR signalling. **Nature Cell Biology**, v. 4, p. 648-657, 2002.

INOKI, K.; ZHU, T.; GUAN, K. L. TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. **Cell**, v. 115, p. 577-590, 2003.

JACINTO, E.; FACCHINETTI, V.; LIU, D.; SOTO, N.; WEI, S.; JUNG, S. Y.; HUANG, Q.; QIN, J.; SU, B. SIN1/MIP1 maintains rictor-mTOR complex integrity and regulates AKT phosphorylation and substrate specificity. **Cell**, v. 127, n.1, p. 125-137, 2006.

JIANG, B. H.; LIU, L. Z. PI3K/PTEN signaling in angiogenesis and tumorigenesis. **Advances in Cancer Research**, n. 102, p. 19-65, 2009.

KANG, S.; BADER, A. G.; ZHAO, L.; VOGT, P. K. Mutated PI-3Kinases. Cancer targets on a silver platter. **Cell Cycle**, v. 4, n. 4, p. 578-581, 2005.

KIM, M. S.; RADINGER, M.; GILFILLAN, M. The multiple roles of phosphoinositide 3-kinase in mast cell biology. **Trends in Immunology**. v. 29, p. 493–501, 2008.

KIM, D.; AKCAKANAT, A.; SINGH, G.; SHARMA, C.; MERIC-BERNSTAM, F. Regulation and localization of ribosomal protein S6 kinase 1 isoforms. **Growth Factors**, v.1, p. 12-21, 2009.

KIM, E. K.; KIM, H. A.; KOH, J. S.; KIM, M. S.; KIM, K. I.; LEE, J. I.; MOON, N. M.; KO, E.; NOH, W. C. Phosphorylated S6K1 is a possible marker for endocrine therapy resistance in hormone receptor-positive breast cancer. **Breast Cancer Research Treatment**, v.126, n.1, p. 93 - 99, 2011.

KIUPEL, M.; WEBSTER, J.; MILLER, R.; KANEENE, J. Impact of tumour depth, tumor location and multiple synchronous masses on the prognosis of canine cutaneous mast cell tumours. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 52, p. 280-86, 2005.

KIUPEL, M.; WEBSTER, J. D.; BAILEY, K. L.; BEST, S.; DELAY, J.; DETRISAC, C. J.; 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, n. 1, p. 147-155, 2011.

KNOWLDEN, J. M.; JONES, H. E.; BARROW, D.; GEE, J. M.; NICHOLSON, R. I.; HUTCHESON, I. R. Insulin receptor substrate-1 involvement in epidermal growth factor receptor and insulin-like growth factor receptor signalling:

Implication for Gefitinib ('Iressa') response and resistance. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 111, p. 79-91, 2008.

LAHAT, G.; DHUKA, A. R.; HALLEVI, H.; XIAO, L.; ZOU, C.; SMITH, K. D.; PHUNG, T. L.; POLLOCK, R. E.; BENJAMIN, R.; HUNT, K. K.; LAZAR, A. J.; LEV, D. Angiosarcoma: clinical and molecular insights. **Annals of Surgery**, v. 251, p. 1098-1106, 2010.

LAPLANTE, M.; SABATINI, D. M. MTOR signaling at a glance, **Journal of Cell Science**, v. 122, p. 3589–3594, 2009.

LOMBARD, L.; MOLONEY, J. Experimental transmission of mast cell sarcoma in dogs. **Federation Proceedings**, v.18, p. 490-95, 1959.

LONDON, C.; KISSEBERTH, W.; GALLI, S.; GEISLER, E.; HELFAND, S. Expression of stem cell factor receptor (c-kit) by the malignant mast cells from spontaneous canine mast cell tumours. **Journal of Comparative Pathology**, v. 115, p. 399-414, 1996.

LONDON, C. A.; SEGUIN, B. Mast cell tumors in the dog. **Veterinary Clinics of Small Animal**, v. 33, p. 473–89, 2003.

LONDON, C. A.; THAMM, D. H. Mast cell tumors. In: WITHROW e MacEWEN'S. **Small animal oncology**, 5.ed. China: Saunders Elsevier, Cap. 20, p. 335-355, 2013.

LONG, X.; LIN, Y.; ORTIZ-VEGA, S.; YONEZAWA, K.; AVRUCH, J. Rheb binds and regulates the mTOR kinase. **Current Biology**, v. 15, n. 8, p. 702-713, 2005.

MA, P.; MALI, R. S.; MUNUGALAVADLA, V.; KRISHNAN, S.; RAMDAS, B.; SIMS, E.; MARTIN, H.; GHOSH, J.; LI, S.; CHAN, R. J.; KRYSTAL, G.; CRAIG, A. W.; TAKEMOTO; KAPUR, R. The PI3K pathway drives the maturation of mast cells via microphthalmia transcription factor. **Blood**, v. 118, p. 3459–3469,

2011.

MARONE, R.; CMILJANOVIC, V.; GIESE, B.; WYMANN, M. P. Targeting phosphoinositide 3-kinase: Moving towards therapy. **Biochimica et Biophys Acta**, v. 1784, p. 159-185, 2008.

MARTELLI, A. M.; TAZZARI, P. L.; EVANGELISTI, C.; CHIARINI, F.; BLALOCK, W. L.; BILI, A. M.; Targeting the phosphatidylinositol 3-kinase/AKT/mammalian target of rapamycin module for acute myelogenous leukemia therapy: from bench to bedside. **Current Medicinal Chemistry**, v. 14, p. 2009-2023, 2007.

McAULIFFE, P. F.; MERIC-BERNSTAM, F.; MILLS, G. B.; GANZALEZ-ANGULO, A. M. Deciphering the role of PI3K/AKT/mTOR pathway in breast cancer biology and pathogenesis. **Clinical Breast Cancer**, v. 10, p. S59-S65, 2010.

MILLER, D. The occurrence of mast cell tumors in young Sharpeis. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 7, p. 360- 63, 1995.

MILLER, T. D.; REXER, B. N.; GARRETT, J. T.; ARTEAGA, C. L. Mutations in the phosphatidylinositol 3-kinase pathway: role in tumor progression and therapeutic implications in breast cancer. **Breast Cancer Research**, v. 13, n. 214, p. 1-12, 2011.

MORINI, M.; BETTINI, G.; PREZIOSI, R.; MANDROLI, L. C-kit gene product (CD117) immunoreactivity in canine and feline paraffin sections. **Journal Histochemistry and Cytochemistry**, v. 52, n. 5, p. 705-08, 2004.

MULLINS, M.; DERNELL, W.; WITHROW, S.; EHRHART, E.; THAMM, D.; LANA, S. Evaluation of prognostic factors associated with outcome in dogs with multiple cutaneous mast cell tumors treated with surgery with and without adjuvant treatment: 54 cases (1998-2004). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 228, n.1, p. 91-95, 2006.

MURPHY, S. Mast Cell Tumors. In: **BSAVA Manual of Canine and Feline oncology**. DOBSON, L. B.; GLOUCESTER, J. M. British Small Animal Veterinary Association, p.161-67, 2007.

PATNAIK, A.; EHLER, W.; MACEWEN, E. Canine cutaneous mast cell tumor: morphologic grading and survival times in 83 dogs; **Veterinary Pathology**, v.21, p.469–474, 1984.

QUESNELLE, K. M.; BOEHM, A. L.; GRANDIS, J. R. STAT-mediated EGFR signaling in cancer. **Journal of cellular Biochemistry**, v. 102, p. 311-319, 2007.

RECH, R. R.; GRAÇA, D. L.; KOMMERS, G. D.; SALLIS, E. S. V.; RAFFI, M. B.; GARMATZ, S. L. Mastocitoma Cutâneo Canino. Estudo de 45 casos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 56, n. 4, p. 441-448, 2004.

REGUERA, M.; RABANAL, R.; PUIGDEMONT, A.; FERRER, L. Canine Mast Cell Tumors Express Stem Cell Factor Receptor. **American Journal of Dermatopathology** v. 22, n. 1, p. 49-54, 2000.

RIVA, F.; BRIZZOLA, S.; STEFANELLO, D.; CREMA, S.; TURIN, L. A study of mutations in the *c-KIT* gene of 32 dogs with mastocytoma. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 17, p. 385-388, 2005.

ROMANSIK, E.; REILLY, C.; KASS, P.; MOORE, P.; LONDON, C. Mitotic index is predictive for survival for canine cutaneous mast cell tumors. **Veterinary Pathology**, v. 44, p. 335-41, 2007.

SCOTT, M. A.; STOCKHAM, S. L. Basophils and mast cells. In: Schalm's **Veterinary Haematology**. 5th ed., BF Feldman, JG Zinkl and NC Jain, eds., Philadelphia, Lippincott Williams &Wilkins, p. 308–315, 2000.

SHAW, R. J.; BARDEESY, N.; MANNING, B. D.; LOPEZ, L.; KOSMATKA, M.; DEPINHO, R. A.; CANTLEY, L. C. The LKB1 tumor suppressor negatively regulates mTOR signaling. **Cancer Cell**, v. 6, p. 91-99, 2004.

SHIN, J.; PAN, H.; ZHONG, X. P. Regulation of mast cell survival and function by tuberous sclerosis complex 1. **Blood**, v. 119, p. 3306–3314, 2012.

STREFEZZI, R. F.; KLEEB, S.R.; XAVIER, J.G.; DIAS, J.L.C. Avaliação da proliferação celular como indicador prognóstico para mastocitomas cutâneos caninos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 7, p. 559-565, 2010.

WEBSTER, J. D.; KIUPEL, M.; YUZBASIYAN-GURKAN, V. Evaluation of the kinase domain of *c-KIT* in canine cutaneous mast cell tumors. **BMC Cancer**, v. 6, p. 85, 2006.

WEBSTER, J. D.; YUZBASIYAN-GURKAN, V.; MILLER, R. A.; KANEENE, J. B.; KIUPEL, M. Cellular Proliferation in Canine Cutaneous Mast Cell Tumors: Associations with *c-KIT* and Its Role in Prognostication. **Veterinary Pathology**, v. 44, p. 298–308, 2007.

WELLE, M. M.; BLEY, C. R.; HOWARD, J.; RUFENACHT, S. Canine mast cell tumours: a review of the pathogenesis, clinical features, pathology and treatment. **Veterinary Dermatology**, v. 19, p. 321-339, 2008

ZHANG, Y.; GAO, X.; SAUCEDO, L. J.; RU, B.; EDGAR, B. A.; PAN, D. Rheb is a direct target of the tuberous sclerosis tumour suppressor proteins. **Nature Cell Biology**, v. 5, p. 578-581, 2003.

ZONCU, R.; EFEYAN, A.; SABATINI, D. M. mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 12, p. 21 – 35, 2011.

CAPÍTULO 2 – ASSOCIAÇÃO ENTRE A IMUNOMARCAÇÃO DAS PROTEÍNAS DA VIA PI3K/AKT/mTOR E OS ACHADOS CLÍNICOS DE CÃES COM MASTOCITOMA CUTÂNEO: DETERMINAÇÃO DE NOVOS MARCADORES PROGNÓSTICOS

RESUMO

A via PI3K/AKT/mTOR está relacionada com a proliferação, síntese proteica, sobrevivência e motilidade das células. Mutações nesta via tem sido associadas com o processo carcinogênico de diferentes tipos tumorais. Atualmente, inibidores específicos de proteínas como a PI3K, AKT, mTOR, vem sendo testados com o intuito de otimizar a terapia antitumoral em seres humanos e animais. Além de potenciais alvos terapêuticos, o aumento da expressão de algumas destas proteínas tem sido associado a tumores de pior prognóstico em seres humanos. Em cães, o mastocitoma (MCT) é um tumor cutâneo extremamente comum, de comportamento bastante variável e etiologia ainda não esclarecida. Diante disso, o objetivo deste estudo, foi avaliar a imunomarcação dos componentes proteicos da via PI3K/AKT/mTOR, por meio da técnica de imuno-histoquímica e em um segundo momento, associar esses resultados com os parâmetros clínicos dos pacientes, com as características morfológicas e biológicas dos tumores e com o tempo de sobrevida dos pacientes, visando determinar possíveis marcadores prognósticos para esta neoplasia. Para tal 46 MCTs caninos foram utilizados. Todos os tumores apresentaram positividade na avaliação imuno-histoquímica para as proteínas analisadas. As proteínas p-AKT Thr 308 e p-S6K1 apresentaram forte intensidade de imunomarcação, quando comparadas a parâmetros associados a piores prognósticos. Esses resultados indicam que a forte intensidade de imunomarcação de p- AKT Thr 308 e p-S6K1 está relacionada a um pior prognóstico para os cães acometidos pelo MCT cutâneo.

Palavras-chave: AKT Thr 308, S6K1, prognóstico, imuno-histoquímica, neoplasias

CHAPTER 2 - ASSOCIATION BETWEEN PROTEIN IMMUNOSTAINING OF PI3K/AKT/mTOR PATHWAY AND CLINICAL FINDINGS IN DOGS WITH CUTANEOUS MAST CELL TUMOR: DETERMINATION OF NEW PROGNOSTIC MARKERS

ABSTRACT

The PI3K/AKT/mTOR pathway is related to proliferation, protein synthesis, cell motility and survival. Mutations in this pathway have been associated with the carcinogenic process in different tumor types. Currently, specific inhibitors of some proteins such as PI3K, AKT, mTOR, are being tested in order to optimize antitumor therapy in humans and animals. Apart from potential therapeutic targets, increased immunostaining of some of these proteins have been associated with poorer prognosis in human tumors. In dogs, mast cell tumor (MCT) is an extremely common skin tumor, which presents a highly variable behavior and unclear etiology. Therefore, the aim of this study was to evaluate the immunostaining of the protein components of PI3K/AKT/mTOR pathway, through the technique of immunohistochemistry, and in a second stage, correlate these results with clinical parameters of patients, with morphological and biological tumor characteristics and the survival time of patients to determine possible prognostic markers for this disease. For this, 46 canine MCTs were used. All tumors were positive in immunohistochemical analysis for the proteins analyzed. Proteins p-AKT Thr 308 and p-S6K1 showed increases in the intensity of immunostaining compared to parameters associated with worse prognosis. These results suggest that the increase in the intensity of immunostaining of p-AKT Thr 308 and p-S6K1 are related to a worse prognosis for dogs affected by cutaneous MCT.

Keywords: AKT Thr 308, S6K1, prognostic, Immunohistochemistry, neoplasms

INTRODUÇÃO

O mastocitoma (MCT) corresponde ao tumor cutâneo mais comum em cães, compreendendo 16 a 21% dos tumores cutâneos nesta espécie (BLACKWOOD et al., 2012) e 11 a 27% das neoplasias malignas em cães (FURLANI et al., 2008).

Seu comportamento biológico, progressão e apresentação clínica são extremamente variados. Fato este, que muitas vezes, dificulta a determinação de um prognóstico mais acurado, fazendo com que, na grande maioria dos casos, seja necessária a associação de diversos parâmetros para a determinação do prognóstico do paciente (LONDON e SEGUIN, 2003; BLACKWOOD et al., 2012).

Por esta razão, algumas características clínicas como tamanho, localização, número de tumores, estadiamento e presença de metástases em linfonodos regionais e à distância, além de outros parâmetros, vem sendo considerados na determinação do prognóstico de cada paciente (BOSTOCK et al., 1973; LONDON e SEGUIN, 2003; HANH et al., 2004; GIEGER et al., 2003; KIUPEL et al., 2005; HANH et al., 2008; BLACKWOOD et al., 2012, LONDON e THAMM, 2013).

Sua etiologia não está completamente elucidada (TAKEUCHI et al., 2010). Sabe-se que em torno de 40% dos MCTs expressam mutações no proto-oncogene c-KIT (RIVA et al., 2005; WEBSTER et al., 2006). Entretanto, os mecanismos moleculares envolvidos na patogenia da grande maioria dos MCTs ainda permanecem desconhecidos (WELLE et al., 2008).

Diante disso, alguns autores sugerem que mecanismos diferentes de sinalização possam estar envolvidos na etiologia de uma parcela dos MCTs (GLEIXNER et al., 2011). MA e colaboradores (2011) e SHIN e colaboradores (2012) demonstraram, que a via da PI3K desempenha um papel essencial no crescimento, sobrevivência e funcionamento de mastócitos, e recentemente, a imunomarcação da proteína AKT (proteína quinase B) foi observada em MCTs caninos, sugerindo um possível envolvimento desta proteína, no desenvolvimento desta neoplasia em cães (RODRIGUEZ et al., 2012).

A via de sinalização PI3K/AKT/mTOR (proteína alvo da rapamicina em mamíferos) tem um papel importante na regulação da proliferação, sobrevivência e motilidade celular. Esta via está relacionada com a gênese de diferentes tipos tumorais, através do ganho ou perda de função de seus componentes, levando a transformações neoplásicas (VIVANCO e SAWYERS, 2002).

A fosforilação de PIP2 (fosfatidilinositol-4,5-bifosfato), mediada por PI3K, cursa com o recrutamento de AKT e PDK1 (proteína quinase 1 dependente de fosfatidinosítideo-3) para a membrana celular. PDK1 fosforila AKT no domínio Thr 308, enquanto que mTOR-Rictor fosforila AKT no seu domínio Ser 473, iniciando assim, a cascata de sinalização (STEMKE-HALE et al., 2008; O'REILLY et al., 2006).

AKT é responsável pela ativação de mTOR-Raptor, que pode ocorrer de forma direta, através da fosforilação de mTOR no domínio serina 2448, ou indireta, através da inibição da atividade do complexo TSC1/TSC2 (Hamartina/Tuberina) (ZHANG et al., 2003; LAPLANTE e SABATINI, 2009).

A ativação de mTOR-Raptor resulta na fosforilação de seus dois efetores, 4EBP1 (fator de iniciação eucariótico 4E ligante de proteína) e S6K1 (quinase ribossomal S6). A fosforilação de 4EBP1 promove a liberação e ativação de eIF4E (fator de iniciação eucariótico 4E). Através desses eventos, mTOR-Raptor é capaz de interferir no crescimento e proliferação celular, por meio da biossíntese de proteínas, lipídeos e organelas (MERIC-BERNSTAM e GONZALEZ-ANGULO, 2009).

O interesse na avaliação de componentes dessa via vem crescendo. Já que estes têm sido considerados alvos promissores para o desenvolvimento de novas moléculas antitumorais, dentre as quais pode-se citar os inibidores específicos de PI3K, AKT e mTOR (GHAYAD e COHEN, 2010).

Alguns autores têm associado o aumento da expressão proteica de alguns componentes da via como, AKT Thr 308, eIF4E e S6K1 a tumores de piores prognósticos (BARLUND et al., 2000; De BENEDETTI e GRAFF, 2004; JASTRZEBSKI et al., 2007; AL-SAAD et al., 2009).

Diante do exposto, o objetivo deste estudo foi verificar se há relação entre as características clínicas dos pacientes (raça, idade, sexo, tempo de sobrevida, presença de metástase em linfonodos regionais ou à distância,

estadiamento, tempo de evolução, ocorrência de recidivas) e dos mastocitomas (localização, presença de ulcerações, consistência, número de nódulos, tamanho e velocidade de crescimento) com o tempo de sobrevida dos pacientes e com a imunomarcagem dos componentes da via PI3K/AKT/mTOR, visando com isso determinar possíveis marcadores prognósticos.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras

Fizeram parte deste estudo 46 cães com MCT, diagnosticados por meio de exame citológico e histopatológico (baseado nas classificações propostas por PATNAIK et al., 1984 e KIUPEL et al., 2011). Os pacientes foram divididos em dois grupos de acordo com os tempos de sobrevida (SV): grupo com $SV \leq 6$ meses, que vieram à óbito em decorrência do MCT e o grupo com $SV > 6$ meses. Tal divisão foi realizada no intuito de separar os pacientes em grupos com prognósticos distintos.

Os pacientes foram oriundos do Serviço de Oncologia do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” - UNESP - Câmpus de Jaboticabal, atendidos no período de março de 2011 a janeiro de 2013. No momento da intervenção cirúrgica, foram coletadas amostras tumorais de aproximadamente 1 cm^3 , as quais foram fixadas em formalina tamponada, por 24 a 48 horas até seu processamento histológico.

Dados dos pacientes tais como raça, idade, sexo, tempo de sobrevida, presença de metástase em linfonodos regionais ou à distância, estadiamento, tempo de evolução (tempo transcorrido entre a detecção da neoformação pelo proprietário até o momento do diagnóstico), ocorrência de recidivas e características pertinentes ao tumor como graduação histológica (segundo a classificação proposta por PATNAIK et al., 1984 e KIUPEL et al., 2011), localização, presença de ulceração, consistência, número de nódulos, tamanho, e velocidade de crescimento foram obtidos por meio da resenha, anamnese e exames físico e complementar.

Para realização da análise comparativa entre os parâmetros clínicos e os achados imuno-histoquímicos, alguns dados foram agrupados de modo a facilitar a avaliação. As raças foram divididas conforme a frequência,

destacando-se as quatro mais observadas e as demais foram agrupadas em uma categoria denominada “outras”. O fator idade foi dividido em faixas etárias, considerando-se de 2 a 6 anos, 7 a 11 anos e 12 a 16 anos. A localização tumoral foi classificada conforme as regiões anatômicas (cabeça e pescoço; abdominal, inguinal ou perineal; membro pélvico ou torácico e tórax). O tempo de evolução até o momento do diagnóstico foi agrupado em períodos de um ano.

O estadiamento tumoral foi classificado por sua vez, segundo o *Canine Mast Cell Disease: Consensus Panel on Diagnosis, Staging, Grading and Therapy of Mast Cell Disease*. 1º Encontro Mundial de Oncologia Veterinária – ESVONC/VCS, Copenhague, 2008, Tabela 1 (apêndice 1), que leva em consideração o número e tamanho dos nódulos, presença de ulceração, presença de metástases em linfonodos e à distância. Para o estadiamento, os pacientes foram submetidos a avaliações laboratoriais (hemograma, avaliação renal e hepática), exames complementares de imagem (ultrassonografia abdominal e radiografia torácica), além de serem submetidos à punção biópsia aspirativa com agulha fina dos linfonodos regionais e órgãos com formações nodulares ou aumentos de volume generalizados.

Todos os pacientes foram submetidos à intervenção cirúrgica, fosse para realização da exérese completa da neoformação ou para a realização de biópsia incisional, em casos nos quais a exérese completa da mesma não era possível. Nenhum paciente havia sido tratado com fármacos antineoplásicos antes da coleta dos tumores. Na presença de mais de um nódulo tumoral, com graduação histopatológica diferente, considerou-se para a realização deste trabalho, o tumor de pior prognóstico baseado no grau histológico, segundo a classificação de Kiupel e colaboradores (2011).

Após o procedimento cirúrgico, o tratamento instituído foi baseado nas características histopatológicas do tumor, estadiamento, condições clínicas dos pacientes e concordância dos proprietários. Os principais protocolos quimioterápicos instituídos foram: vimblastina associada à prednisona, vimblastina associada à prednisona e lomustina, lomustina como agente único, lomustina associada à prednisona e lomustina associada à vimblastina, outro fármaco empregado em alguns casos foi o inibidor de receptor de tirosina quinase (ITK). Adicionalmente, os pacientes foram tratados também com

protetores gástricos e anti-histamínicos, conforme descrito por Blackwood et al., 2012.

Os pacientes, nos quais foi instituída a quimioterapia antineoplásica, foram reavaliados durante os retornos para a administração do fármaco e, após o término do protocolo, a cada três meses. Já os animais que não apresentavam indicação ao tratamento quimioterápico ou cujo proprietário não autorizou a realização do mesmo, foram reavaliados a cada três meses ou em intervalos menores, de acordo com a necessidade de cada caso. Nos retornos foram realizados exames laboratoriais e de imagem, conforme citado previamente. Os pacientes deste estudo foram acompanhados por, no mínimo, um ano.

Reação de imuno-histoquímica

A reação de imuno-histoquímica foi realizada no Laboratório de Imuno-histoquímica do Serviço de Patologia Veterinária da UNESP – Câmpus de Botucatu, onde as amostras tumorais foram incluídas em parafina e seccionadas em cortes de 5µm de espessura e, posteriormente foram montadas em lâminas de vidro carregadas eletricamente (Starfrost®). Os cortes foram submetidos à desparafinização e hidratação em uma sequência de xilol e álcool, e posteriormente foi realizada a recuperação antigênica. Para os anticorpos p-AKT Thr 308, p-mTOR, p-S6K1, p-4EBP1 e eIF4E utilizou-se a solução tampão de Citrato 10 mM, pH 6,0. Já para o anticorpo p-AKT Ser 473, utilizou-se solução Tris-EDTA com Tween 20, pH 9,0. A recuperação para todos os anticorpos foi realizada em panela de pressão (Pascal Dako), de acordo com o programa pré-estabelecido pelo fabricante.

O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com solução de bloqueio pronta para uso (Spring Bioscience) por 20 minutos e, em seguida realizou-se o bloqueio de reação inespecífica, com solução de bloqueio pronta para uso (Spring Bioscience) por 60 minutos, a 27°C.

Os cortes foram incubados em câmara úmida com os anticorpos primários, segundo os protocolos descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Diluições, clones, procedência, tempo e temperatura de incubação dos anticorpos primários utilizados em MTC caninos. Jaboticabal, 2014.

| Anticorpos anti | Procedência | Clone | Diluição | Tempo de incubação/ Temperatura |
|-----------------------|----------------|----------|----------|------------------------------------|
| p-AKT Ser 473 (M) | Cell Signaling | D9E | 1:50 | 24 horas/ 4°C |
| p-AKT Thr 308 (P) | Abcam | ab66134 | 1:50 | 18 horas/ 4°C |
| p-mTOR Ser 2448 (M) | Cell Signaling | 49F9 | 1:100 | 18 horas/ 4°C |
| p-S6K1 Thr 389 (P) | Abcam | Ab126818 | 1:500 | 2 horas/ 27°C |
| p-4EBP1 Thr 37/46 (M) | Cell Signaling | 236B4 | 1:500 | 2 horas/ 27°C |
| eIF4E (P) | Cell Signaling | - | 1:50 | 18 horas/ 4°C |

M = monoclonal e P = policlonal

Como anticorpo secundário foi utilizado o Histofine (Nichirei Biosciences) para os anticorpos primários p-S6K1, p-4EBP1 e eIF4E. Já para o anticorpo p-AKT Ser 473 utilizou-se o complexo de polímeros ligados a peroxidase (kit Advance, DAKO). Por outro lado, para os anticorpos p-AKT Thr 308 e p-mTOR utilizou-se o complexo Avidina-Biotina-Peroxidase (Vector). Para todas as lâminas utilizou-se o cromógeno Diaminobenzidina (DAB, DAKO), por 5 minutos, como cromógeno. Estas foram contra coradas com Hematoxilina de Harris.

Como controles positivos para as reações de p-AKT Ser 473 e da p-AKT Thr 308, foram utilizados cortes histológicos de útero de cadela. Já para as reações de p-mTOR, p-S6K1, p-4EBP1 e eIF4E utilizou-se cortes histológicos de próstata, pulmão, estômago e pâncreas de cão, respectivamente. Os controles positivos foram selecionados de acordo com as especificações dos fabricantes de cada anticorpo primário. Em todas as baterias de imuno-histoquímica, uma lâmina foi processada como controle negativo, na qual suprimiu-se o anticorpo primário substituindo-o por controle negativo universal de camundongo (DAKO) para os anticorpos monoclonais e controle negativo universal de coelho (DAKO) para os anticorpos policlonais.

A avaliação da reação de imuno-histoquímica foi realizada com o auxílio de um microscópio de luz acoplado à câmera digital e, através do programa de análise de imagens Qwin 3.0 (Leica) foram feitas observações quanto a localização da imunomarcacão (citoplasmática, nuclear, nuclear e citoplasmática), intensidade de marcação (1 - forte, 2 - moderada e 3 - fraca) e

distribuição de marcação, por meio de escores (0 = < 5% de células marcadas, 1 = 6 a 25% de células marcadas, 2 = 26 a 50% de células marcadas, 3 = 51 a 75% de células marcadas, 4 = > 75% de células marcadas). Os resultados foram comparados entre os grupos para o mesmo anticorpo. As lâminas foram avaliadas por dois observadores distintos, havendo concordância entre os mesmos.

Análise estatística

As associações entre os resultados imuno-histoquímicos (escore, intensidade e localização de marcação para cada anticorpo) e os parâmetros clínicos nos grupos, foram realizadas pelo Teste do Qui-Quadrado. As curvas de sobrevida foram avaliadas pelo método de Kaplan-Meier e a significância estatística foi determinada pelo teste de log-rank. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos com $P < 0,05$, e o software de análise utilizado foi o *Graphpad Prism* versão 5.0.

RESULTADOS

Dados epidemiológicos

As características clínicas dos pacientes, dos tumores e o tratamento instituído para cada paciente estão compilados nas Tabelas 2, 3, 4, 5, 6 e 7 (Apêndice 1). Este estudo foi composto por 46 cães, dos quais, 14 compuseram o grupo com $SV \leq 6$ meses e 32, o grupo com $SV > 6$ meses. O tempo médio de sobrevida dos pacientes do grupo com $SV \leq 6$ meses foi de 73 dias.

A média de idade do grupo $SV \leq 6$ meses foi de 9 anos, variando de 5 a 13 anos. Já a média do grupo com $SV > 6$ meses foi de 7,8 anos, variando entre 4 e 12 anos. As raças mais frequentes foram cães sem raça definida (SRD) (26%), boxer (17%) e pitbull (17%). O tamanho dos tumores foi dividido em dois grupos (maior e menor que três centímetros), visto que esta variável influencia na determinação do estadiamento do paciente. Assim sendo, observou-se que 48% dos animais apresentavam tumores maiores que três centímetros, enquanto que 52% dos animais apresentavam tumores menores que três centímetros.

A localização tumoral foi separada conforme as regiões anatômicas, os nódulos observados em bolsa escrotal foram agrupados na região inguinal, desta maneira, as regiões abdominal, inguinal ou perineal foram as mais acometidas (33%), seguidas pelas regiões de membros torácicos e pélvicos (28%) e tórax (24%). Com relação à distribuição sexual, observou-se uma maior ocorrência em fêmeas (57%), quando comparadas aos machos (43%) .

Pacientes que apresentavam nódulos únicos (70%) foram mais frequentes em relação aos que apresentavam nódulos múltiplos (30%). Treze pacientes (28%) apresentavam nódulos ulcerados. A presença de metástases, à distância, detectada no momento do diagnóstico foi observada em 9% dos pacientes, enquanto que a ocorrência de metástase em linfonodos foi observada em 28% dos pacientes que participaram deste estudo. Todos os pacientes que apresentaram linfonodos acometidos e/ou metástases à distância pertenciam ao grupo $SV \leq 6$ meses.

Em relação ao estadiamento, 33% dos MCT estavam em estadio I, 15% em estadio II e 22% em estadio III, sendo que todos estes pertenciam ao grupo com $SV > 6$ meses. Por outro lado, 19% e 11% estavam em estadios IV e V, respectivamente, e pertenciam ao grupo $SV \leq 6$ meses. A recidiva foi observada em 30% dos pacientes, sendo que 43% destes pertenciam ao grupo $SV \leq 6$ meses e 25% pertenciam ao grupo $SV > 6$ meses.

Os tumores foram classificados também quanto a sua consistência (macia ou firme), sendo que 59% dos tumores apresentavam consistência macia. O tempo de evolução até o momento do diagnóstico foi agrupado em períodos de um ano, sendo que, neste estudo, o tempo de evolução mais observado foi de até um ano. Os proprietários foram também questionados com relação à velocidade de crescimento das massas, e em 49% dos casos, relataram velocidade de crescimento rápida.

O diagnóstico dos tumores foi confirmado por meio do exame histopatológico, baseado nas classificações propostas por Patnaik e colaboradores (1984) e Kiupel e colaboradores (2011). Seguindo a primeira proposta, 9%, 76% e 15% dos tumores foram classificados como grau I, II e III, respectivamente. De acordo com a classificação sugerida por Kiupel e colaboradores (2011), 30% e 70% dos tumores foram classificados como alto e baixo grau, respectivamente.

Todos os tumores classificados como grau III, pertenciam ao grupo com SV \leq 6 meses. Dentre os tumores classificados com alto grau, um (7%) pertencia ao grupo com SV $>$ 6 meses.

Nos pacientes submetidos apenas à biopsia incisional, considerou-se a quimioterapia antineoplásica e o tratamento suporte como as únicas formas de tratamento. O tratamento mais instituído foi a cirurgia isolada, realizado em 36% dos pacientes.

Imunomarcção das proteínas da via PI3K/AKT/mTOR

Proteína p-AKT Ser 473

O padrão de imunomarcção desta proteína foi citoplasmático (52%) ou nuclear e citoplasmático (48%). Com relação à intensidade de marcação desta proteína, 24%, 46% e 30% dos casos apresentaram imunomarcção forte, moderada e fraca, respectivamente. Foram observados escores de marcação 1, 2, 3 e 4, para este anticorpo, em 2%, 7%, 15% e 76% das amostras analisadas, respectivamente. Não foi observada diferença significativa entre o percentual de células marcadas (escore), a localização da imunomarcção e a intensidade de marcação das células e os grupos (sobrevida $>$ 6 meses e sobrevida \leq 6 meses) ($P > 0,05$).

Proteína p-AKT Thr 308

A marcação desta proteína foi, na grande maioria, nuclear e citoplasmática (93%), e sete por cento apresentaram marcação citoplasmática. Não foi observada diferença significativa entre a localização da marcação e os grupos ($P > 0,05$). Observou-se diferença significativa ($P=0,0002$), da intensidade de marcação das células entre os grupos (SV \leq 6 meses e SV $>$ 6 meses). Pode-se notar que nos tumores do grupo com SV \leq 6 meses, houve uma marcação de maior intensidade (forte) em 79% dos casos, quando comparado aos tumores do grupo de pacientes com SV $>$ 6 meses, que apresentaram este padrão de marcação em 16% dos casos (Figura 1). Não observou-se diferença estatística entre o escore de marcação desta proteína e os grupos estudados, já que 7% apresentaram escore 2, 2% escore 3 e 91% escore 4 ($P > 0,05$).

Proteína p-mTOR

A imunomarcção da proteína p-mTOR mostrou-se nuclear e citoplasmática (91%), citoplasmática (7%) e, nuclear (2%). Não foi observada diferença significativa do percentual de células marcadas (escore), da localização de marcação, da intensidade de marcação das células entre os grupos estudados ($P > 0,05$). A intensidade de marcação observada para esta proteína mostrou-se forte (22%), moderada (56%) e fraca (22%). Observou-se os escores de marcação 2, 3 e 4 em 7%, 13% e 80% das amostras analisadas, respectivamente.

Proteína p-4EBP1

O padrão de imunomarcção desta proteína, foi nuclear (2%), citoplasmático (30%), e nuclear e citoplasmático (67%). Não foi observada diferença significativa do percentual de células marcadas (escore), da localização da imunomarcção, da intensidade de marcação das células entre os grupos estudados ($P > 0,05$). Com relação à intensidade de marcação desta proteína, 2%, 44% e 54% dos MCTs apresentaram marcação forte, moderada e fraca, respectivamente. Foram observados escores de marcação 1, 2, 3 e 4, para este anticorpo, em 19%, 23%, 30% e 28% dos MCT analisados, respectivamente.

Proteína eIF4e

A marcação para a proteína eIF4e foi nuclear e citoplasmática (74%) e citoplasmática (26%). Não observou-se diferença significativa, no percentual de células marcadas (escore), na localização da marcação e na intensidade de marcação das células entre os grupos estudados ($P > 0,05$). A intensidade de marcação observada para esta proteína foi forte (24%), moderada (63%) e fraca (13%). Observou-se os escores de marcação 3 em 7% e 4 em 93% das amostras analisadas.

Proteína p-S6K1

A marcação desta proteína foi, na grande maioria, nuclear e citoplasmática (87%), e o restante apresentou marcação citoplasmática (9%) e nuclear (4%), não foi observada diferença significativa da localização da

marcação entre os grupos ($P > 0,05$). Por outro lado foi observada diferença significativa, da intensidade de marcação das células entre os grupos estudados ($SV \leq 6$ meses e $SV > 6$ meses) ($P < 0,0001$) (Figura 2). Pode-se notar que nos tumores do grupo com $SV \leq 6$ meses, houve uma marcação de maior intensidade (forte) em 93% dos casos, quando comparado aos tumores do grupo de pacientes com $SV > 6$ meses, que apresentaram este padrão de marcação em apenas 6% dos casos. Não foi observada diferença estatística no escore de marcação desta proteína entre os grupos estudados ($P > 0,05$), notou-se que 4% dos MCTS apresentaram escore 2, 16% escore 3 e 80% escore 4.

Associação da imunomarcação das proteínas da via PI3K/AKT/mTOR com os achados clínicos dos pacientes e características tumorais

Os parâmetros clínicos dos pacientes tais como raça, idade, presença de metástases em linfonodos regionais ou à distância, estadiamento, tempo de evolução, ocorrência de recidivas, número de nódulos e as características dos tumores como tamanho, localização, consistência, presença de ulcerações e velocidade de crescimento foram associados com a imunomarcação (intensidade, escore e localização) das proteínas da via PI3K/AKT/mTOR.

Não foi observada associação significativa entre os achados imunohistoquímicos (escore, intensidade e localização de marcação) das proteínas p-AKT Ser 473, p-mTOR, p-4EBP1 e eIF4E e as características clínicas dos pacientes e dos tumores ($P > 0,05$). De maneira semelhante, a localização e o escore de marcação das proteínas p-AKT Thr 308 e p-S6K1, também não mostraram associação significativa ($P > 0,05$). Entretanto, pôde-se observar diferença significativa entre a intensidade de imunomarcação das proteínas p-AKT Thr 308 e p-S6K1 com os parâmetros clínicos dos pacientes e com as características tumorais do presente estudo (Tabelas 2 e 3).

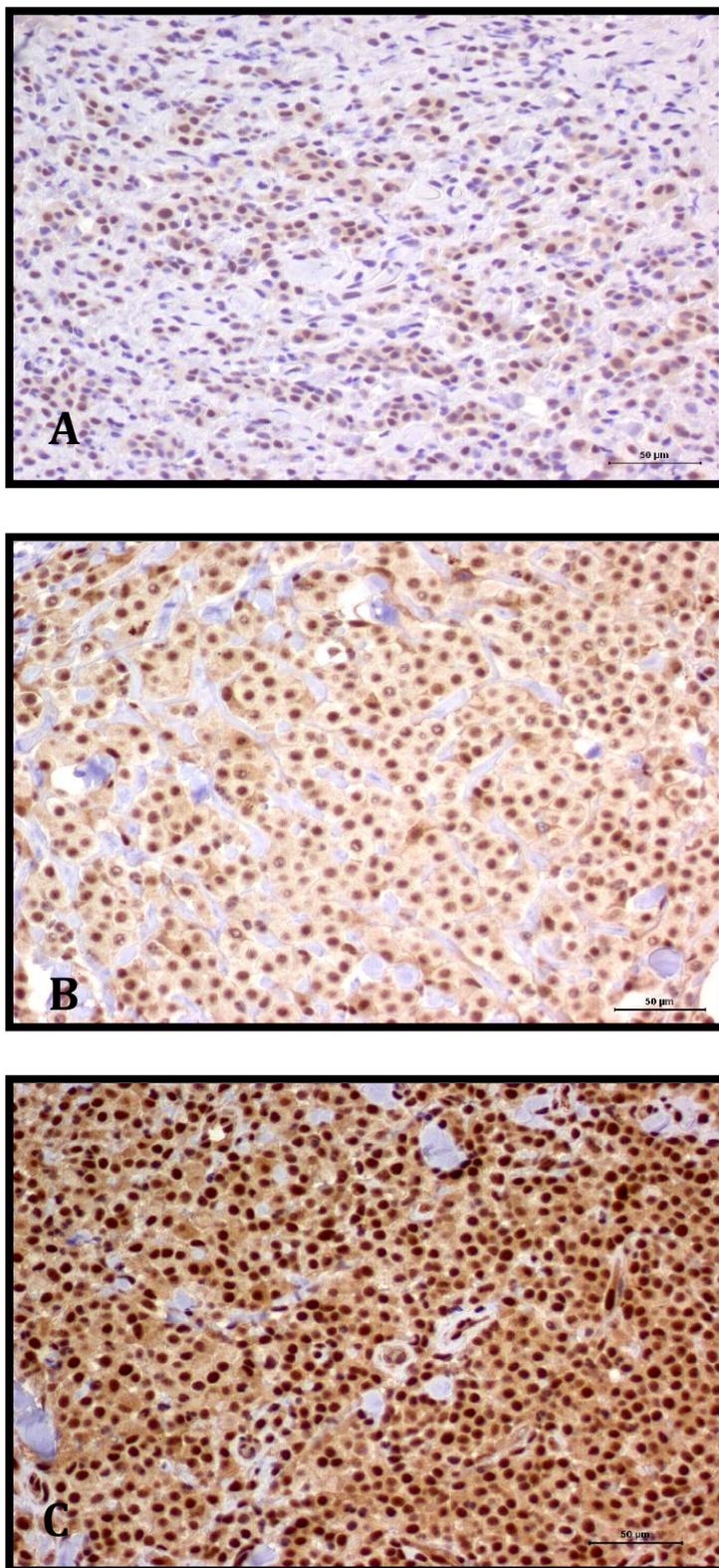


Figura 1. Fotomicrografia mostrando a intensidade e localização da imunomarcacão de p-AKT Thr 308 em MCT caninos. A: MCT com marcação fraca, nuclear e citoplasmática. B: MCT com marcação moderada, nuclear e citoplasmática. C: MCT com marcação forte, nuclear e citoplasmática. Imuno-histoquímica, DAB, contra-coloraçao Hematoxilina. Barra = 50 µm. Jaboticabal, 2014.

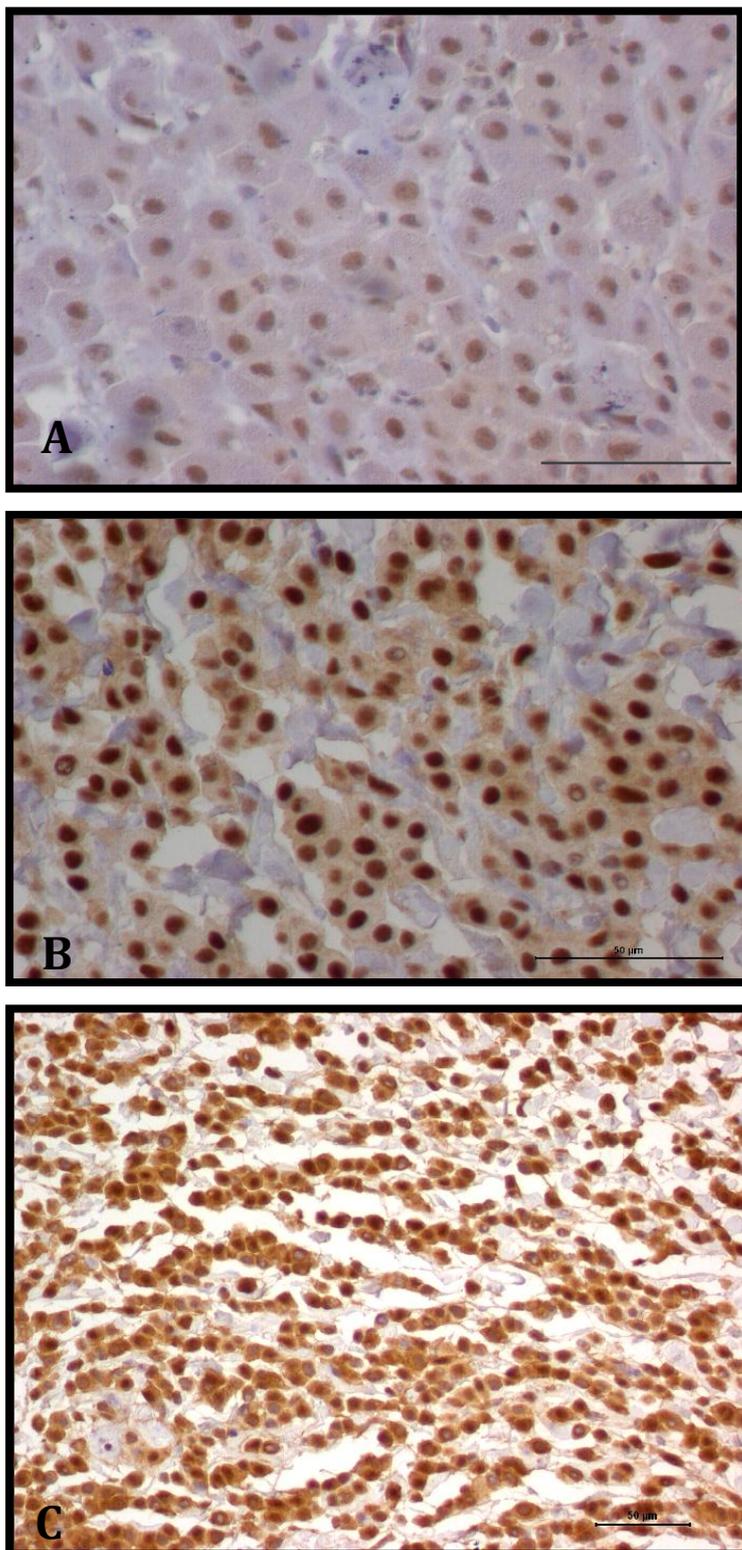


Figura 2. Fotomicrografia mostrando a intensidade e localização da imunomarcagem de p-S6K1 em MCT canino. A: MCT com marcação fraca, nuclear e citoplasmática. B: MCT com marcação moderada, nuclear e citoplasmática. C: MCT com marcação forte, nuclear e citoplasmática. Imuno-histoquímica, DAB, contra-coloração Hematoxilina. Barra = 50 µm. Jaboticabal, 2014.

Tabela 2. Associação entre a intensidade de marcação de p-AKT Thr 308 com as variáveis clínicas dos pacientes e características tumorais. Jaboticabal, 2014.

| Variáveis | N | p-AKT Thr 308 (Intensidade) | | | P |
|--|----|-----------------------------|----------|---------|---------|
| | | Fraco | Moderado | Forte | |
| Estadio | | | | | 0,0018* |
| I | 15 | 2 (13) | 10 (67) | 3 (20) | |
| II | 7 | 1 (14) | 5 (72) | 1 (14) | |
| III | 10 | 0 | 10 (100) | 0 | |
| IV | 9 | 0 | 1 (11) | 8 (89) | |
| V | 5 | 0 | 2 (40) | 3 (60) | |
| T (tamanho tumor) | | | | | 0,0473* |
| > 3 cm | 22 | 0 | 11 (50) | 11 (50) | |
| < 3 cm | 24 | 3 (12) | 16 (67) | 5 (21) | |
| N (status nodal) | | | | | 0,0008* |
| N1 | 13 | 0 | 3 (23) | 10 (77) | |
| N0 | 33 | 3 (9) | 24 (73) | 6 (18) | |
| M (Metástase à distância) | | | | | 0,2049 |
| M1 | 4 | 0 | 1 (25) | 3 (75) | |
| M0 | 42 | 3 (7) | 26 (62) | 13 (31) | |
| Idade | | | | | 0,0821 |
| 2 a 6 anos | 13 | 1 (8) | 8 (61) | 4 (31) | |
| 7 a 11 anos | 29 | 2 (7) | 19 (65) | 8 (28) | |
| 12 a 16 anos | 4 | 0 | 0 | 4 (100) | |
| Ulceração | | | | | 0,1686 |
| Presente | 13 | 0 | 6 (46) | 7 (54) | |
| Ausente | 33 | 3 (9) | 21 (64) | 9 (27) | |
| Tempo de evolução | | | | | 0,245 |
| Até 1 ano | 39 | 2 (5) | 21 (54) | 16 (41) | |
| 1 a 2 anos | 1 | 0 | 1 (100) | 0 | |
| 2 a 3 anos | 3 | 0 | 3 (100) | 0 | |
| Mais de 3 anos | 3 | 1 (33) | 2 (67) | 0 | |
| Localização | | | | | 0,0143* |
| Cabeça e pescoço | 7 | 0 | 2 (29) | 5 (71) | |
| Região abdominal, inguinal ou perineal | 15 | 0 | 9 (60) | 6 (40) | |
| Membro torácico, pélvico | 13 | 0 | 9 (69) | 4 (31) | |
| Tórax | 11 | 3 (27) | 7 (64) | 1 (9) | |

... continua

... continuação

| | | | | | |
|----------------------------------|----|----------|---------|----------|---------|
| Recidiva | | | | | 0,4278 |
| sim | 14 | 0 | 8 (57) | 6 (43) | |
| não | 32 | 3 (9) | 19 (60) | 10 (31) | |
| Raças | | | | | 0,8149 |
| Pitbull | 8 | 0 | 5 (62) | 3 (38) | |
| Boxer | 8 | 1 (12) | 4 (50) | 3 (38) | |
| Pinscher | 3 | 0 | 1 (33) | 2 (67) | |
| SRD | 12 | 1 (8) | 9 (75) | 2 (17) | |
| Outra | 15 | 1 (7) | 8 (53) | 6 (40) | |
| Velocidade de crescimento | | | | | 0,0023* |
| Rápido | 22 | 0 | 9 (41) | 13 (59) | |
| Lento | 24 | 3 (12,5) | 18 (75) | 3 (12,5) | |
| Consistência | | | | | 0,1022 |
| Macio | 27 | 2 (7) | 19 (71) | 6 (22) | |
| Firme | 19 | 1 (5) | 8 (42) | 10 (53) | |
| Número de nódulos | | | | | 0,7231 |
| Único | 32 | 2 (6) | 20 (63) | 10 (31) | |
| Múltiplos | 14 | 1 (7) | 7 (50) | 6 (43) | |

N1: presença de metástases em linfonodos regionais; N0: ausência de metástases em linfonodos regionais; M1: presença de metástases à distância, M0: ausência de metástases à distância; *: diferença estatisticamente significativa

Tabela 3. Associação entre a intensidade de marcação de p-S6K1 com as variáveis clínicas dos pacientes e características tumorais. Jaboticabal, 2014.

| Variáveis | N | p-S6K1 (Intensidade) | | | P |
|--------------------------|----|----------------------|----------|----------|------------|
| | | Fraco | Moderado | Forte | |
| Estadio | | | | | < 0,0001 * |
| I | 15 | 1 (7) | 13 (86) | 1 (7) | |
| II | 7 | 1 (14) | 5 (72) | 1 (14) | |
| III | 10 | 2 (20) | 8 (80) | 0 | |
| IV | 9 | 0 | 1 (11) | 8 (89) | |
| V | 5 | 0 | 0 | 5 (100) | |
| T (tamanho tumor) | | | | | 0,0094* |
| > 3 cm | 22 | 1 (4) | 9 (41) | 12 (55) | |
| < 3 cm | 24 | 3 (12,5) | 18 (75) | 3 (12,5) | |
| N (status nodal) | | | | | < 0,0001* |
| N1 | 13 | 0 | 1 (8) | 12 (92) | |
| N0 | 33 | 4 (12) | 26 (79) | 3 (9) | |

... continua

... continuação

| | | | | | |
|--|----|----------|---------|----------|-----------|
| M (Metástase à distância) | | | | | 0,0108* |
| M1 | 4 | 0 | 0 | 4 (100) | |
| M0 | 42 | 4 (10) | 27 (64) | 11 (26) | |
| Idade | | | | | 0,3283 |
| 2 a 6 anos | 13 | 2 (15) | 7 (54) | 4 (31) | |
| 7 a 11 anos | 29 | 2 (7) | 19 (65) | 8 (28) | |
| 12 a 16 anos | 4 | 0 | 1 | 3 | |
| Ulceração | | | | | 0,2003 |
| Presente | 13 | 2 (15) | 5 (39) | 6 (46) | |
| Ausente | 33 | 2 (6) | 22 (67) | 9 (27) | |
| Tempo de evolução | | | | | 0,3664 |
| Até 1 ano | 39 | 3 (8) | 21 (54) | 15 (38) | |
| 1 a 2 anos | 1 | 0 | 1 (100) | 0 | |
| 2 a 3 anos | 3 | 0 | 3 (100) | 0 | |
| Mais de 3 anos | 3 | 1 (33) | 2 (67) | 0 | |
| Localização | | | | | 0,248 |
| Cabeça e pescoço | 7 | 0 | 3 (43) | 4 (57) | |
| Região abdominal, inguinal ou perineal | 15 | 0 | 9 (60) | 6 (40) | |
| Membro torácico, pélvico | 13 | 2 (15) | 7 (54) | 4 (31) | |
| Tórax | 11 | 2 (18) | 8 (73) | 1 (9) | |
| Recidiva | | | | | 0,9401 |
| Sim | 14 | 1 (7) | 8 (57) | 5 (36) | |
| Não | 32 | 3 (9) | 19 (60) | 10 (31) | |
| Raças | | | | | 0,1434 |
| Pitbull | 8 | 0 | 6 (75) | 2 (25) | |
| Boxer | 8 | 1 (12,5) | 6 (75) | 1 (12,5) | |
| Pinscher | 3 | 0 | 0 | 3 (100) | |
| SRD | 12 | 2 (17) | 8 (66) | 2 (17) | |
| Outra | 15 | 1 (6) | 7 (47) | 7 (47) | |
| Velocidade de crescimento | | | | | < 0,0001* |
| Rápido | 22 | 0 | 8 (36) | 14 (64) | |
| Lento | 24 | 4 (17) | 19 (79) | 1 (4) | |
| Consistência | | | | | 0,0071* |
| Macio | 27 | 1 (4) | 21 (78) | 5 (18) | |
| Firme | 19 | 3 (16) | 6 (31) | 10 (53) | |

... continua

... continuação

| Número de nódulos | | | | | 0,6178 |
|-------------------|----|-------|---------|--------|--------|
| Único | 32 | 3 (9) | 20 (63) | 9 (28) | |
| Múltiplos | 14 | 1 (7) | 7 (50) | 6 (43) | |

N1: presença de metástases em linfonodos regionais; N0: ausência de metástases em linfonodos regionais; M1: presença de metástases à distância, M0: ausência de metástases à distância; *: diferença estatisticamente significativa

Análise de sobrevida dos pacientes

O tempo de sobrevida dos pacientes dos dois grupos (SV \leq 6 meses e SV $>$ 6 meses) foi comparado e pôde-se observar diferença significativa entre os dois grupos, mostrando que tal divisão permitiu separar os pacientes em grupos com prognósticos distintos (Figura 3).

O tempo de sobrevida dos pacientes foi comparado, também, com as variáveis clínicas, com as características tumorais, com os achados imuno-histoquímicos e com os tratamentos instituídos aos pacientes. Não se observou diferença significativa com relação às variáveis clínicas idade, recidiva, tempo de evolução tumoral e número de nódulos ($P > 0,05$). Já os demais parâmetros clínicos (estadiamento, presença de metástases em linfonodos regionais e à distância e raça), as características tumorais (tamanho, presença de ulceração, localização, velocidade de crescimento e consistência) e os tratamentos instituídos observou-se diferenças significativas ($P < 0,05$) e estão ilustrados nas Figuras 4a e 4b. Em relação aos achados imuno-histoquímicos observou-se diferença significativa entre a intensidade de imunomarcagem de p-AKT Thr 308 e p-S6K1 (Figura 5). Já para os demais parâmetros (escore e localização), não foram observadas diferenças significativas ($P > 0,05$) quando associadas ao tempo de sobrevida dos pacientes deste estudo.

Pacientes com sobrevida ≤ 6 meses e > 6 meses

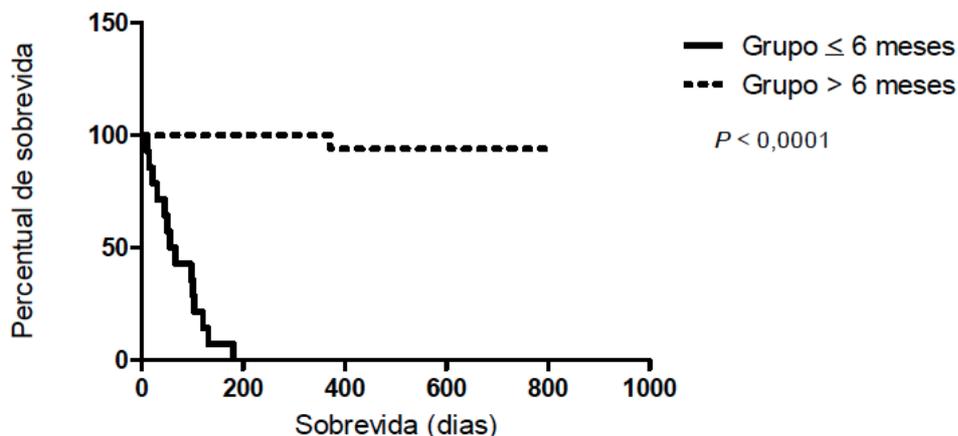


Figura 3. Comparação entre o tempo de sobrevida dos pacientes dos grupos: $SV \leq 6$ meses e $SV > 6$ meses. Jaboticabal, 2014.

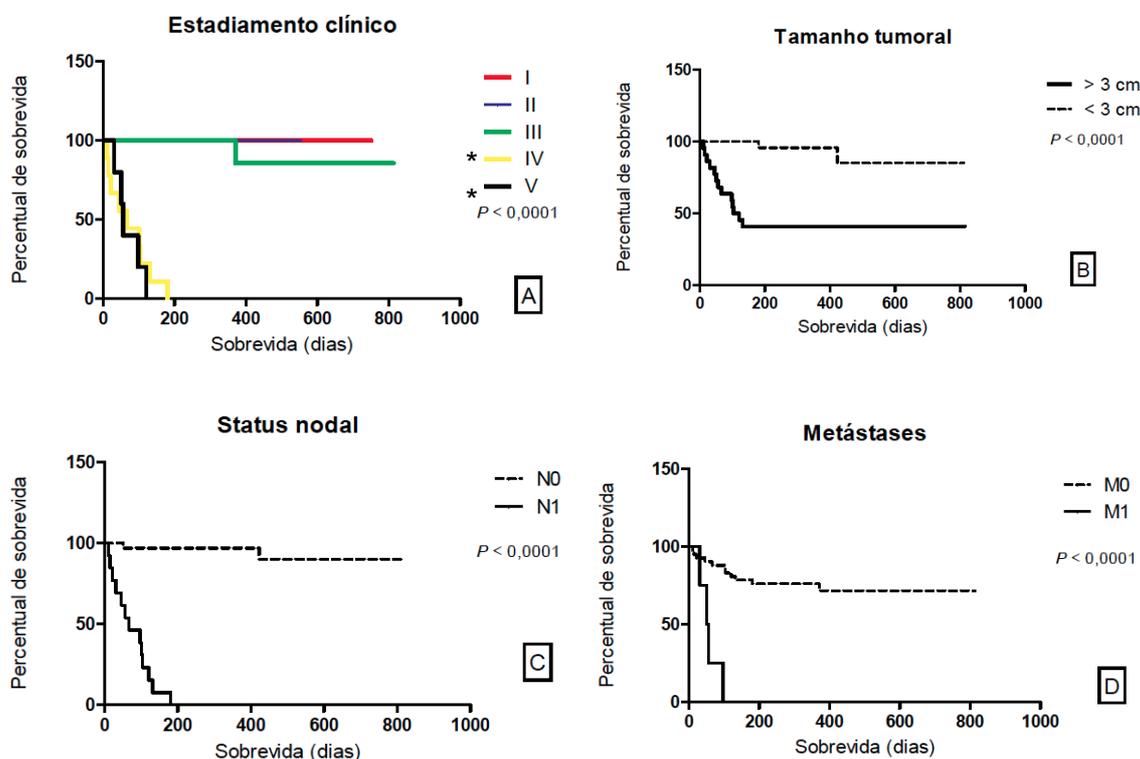


Figura 4a. Comparação do tempo de sobrevida dos pacientes amostrados com os parâmetros clínicos e características tumorais. **A.** Comparação entre pacientes em estádios I, II, III, IV e V. (*) diferença estatisticamente significativa. **B.** Comparação entre pacientes com tumores maiores ou menores que 3 cm. **C.** Comparação entre o tempo de sobrevida dos pacientes com presença de metástases em linfonodos regionais (N1) e pacientes com linfonodos livres de células tumorais (N0). **D.** Comparação entre o tempo de sobrevida dos pacientes com presença de metástases à distância (M1) e pacientes sem metástases à distância (M0). Jaboticabal, 2014.

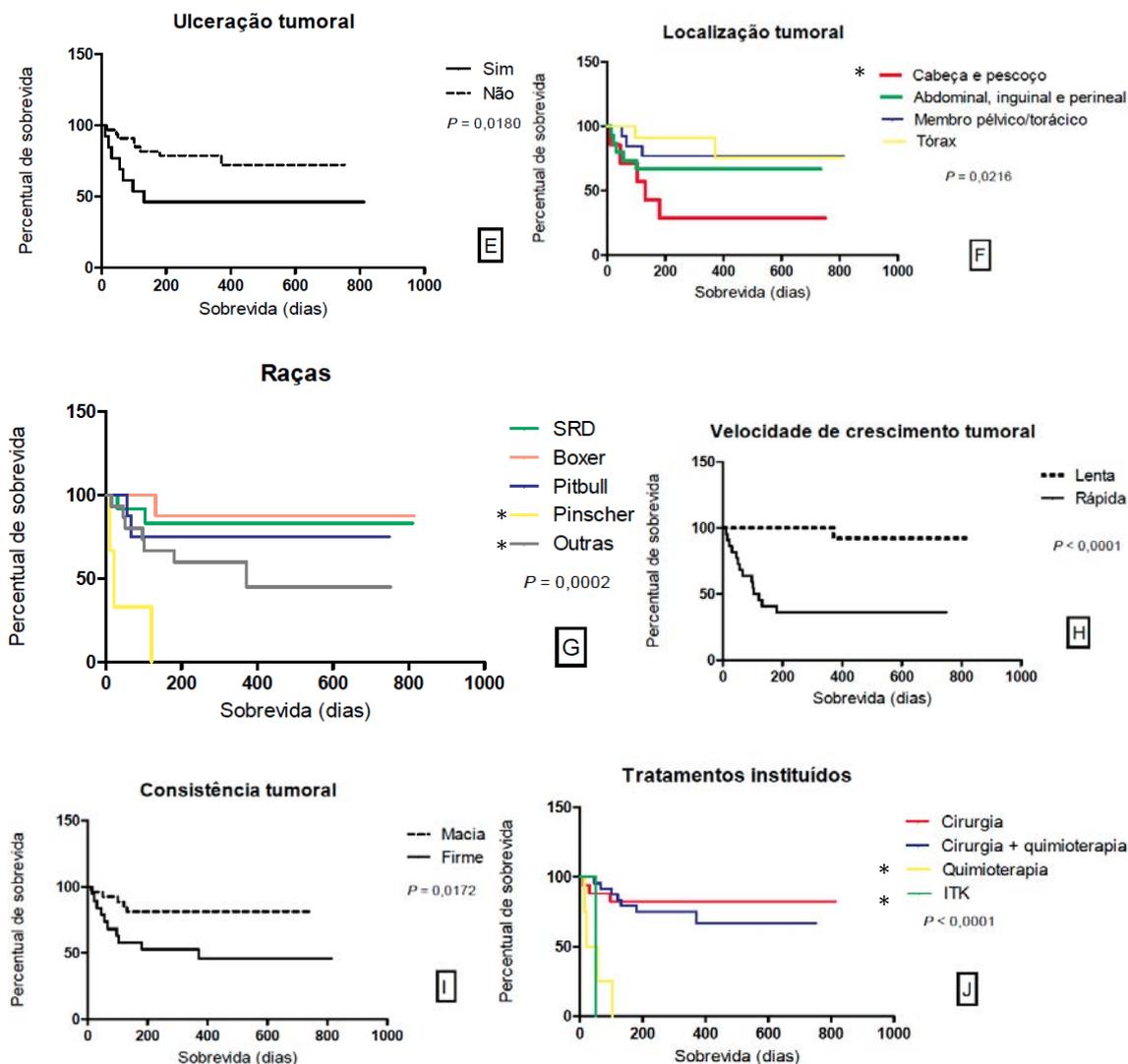


Figura 4b. Comparação do tempo de sobrevida dos pacientes com os parâmetros clínicos e características tumorais. **E.** Comparação entre a presença ou não de ulcerações tumorais. **F.** Comparação entre a localizações tumorais, divididas segundo as regiões anatômicas. (*) diferença estatisticamente significativa. **G.** Comparação entre as principais raças acometidas. (*) diferença estatisticamente significativa. **H.** Comparação entre as velocidades de crescimento tumoral (rápido e lento). **I.** Comparação entre as consistências tumorais (macia e firme). **J.** Comparação entre os tratamentos instiuídos (Cirurgia, Cirurgia + Quimioterapia antineoplásica ou ITK: inibidor de receptor tirosina quinase). (*) diferença estatisticamente significativa. Jaboticabal, 2014.

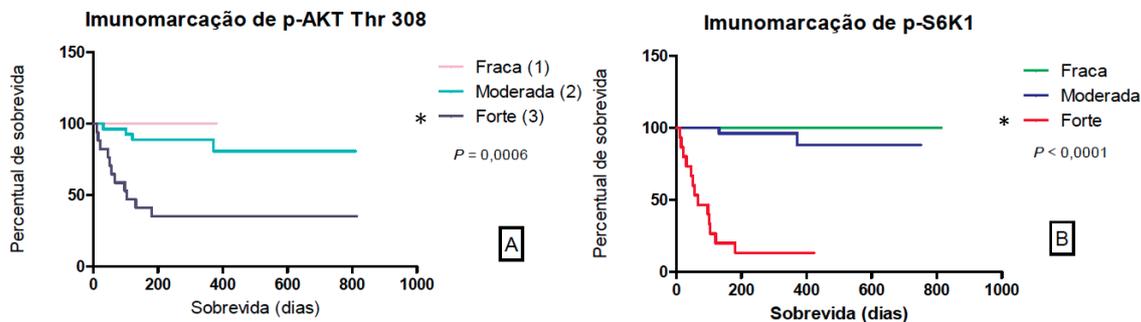


Figura 5. Avaliação do tempo de sobrevida dos pacientes em relação à intensidade de imunomarcção de p-AKT Thr 308 e p-S6K1. A. Imunomarcção de p-AKT Thr 308. (*) diferença estatisticamente significativa. B. Imunomarcção de p-S6K1. (*) diferença estatisticamente significativa. Jaboticabal, 2014.

DISCUSSÃO

O MCT é o segundo tumor mais comum em cães (DALECK et al., 2009; LONDON e THAMM, 2013), cujo comportamento biológico é altamente variável e, por estas razões, inúmeros pesquisadores buscam características que, associadas, possam auxiliar na predição do prognóstico do paciente (KIUPEL et al., 2004; O'CONNEL e THOMSON, 2011; LONDON e THAMM, 2013).

Os pacientes do presente estudo apresentaram faixa etária média de 8,1 anos, variando entre 4 e 13 anos, corroborando com a faixa etária de maior incidência de MCTs descrita por Bostock (1986), Gieger (2003) e Kiupel e colaboradores (2005). No que tange à distribuição sexual, observou-se uma maior ocorrência em fêmeas (57%), quando comparadas aos machos (43%). Entretanto, tal diferença não foi estatisticamente significativa, semelhante ao descrito por London e Seguin (2003) que referem não haver uma predisposição sexual para o MCT canino.

Em relação as raças dos pacientes, observou-se que 26% eram cães sem raça definida (SRD), 17% boxer e 17% pitbull. Achado semelhante foi descrito por Furlani e colaboradores, que observaram uma maior ocorrência em animais sem raça definida, seguidos pelos animais da raça boxer. A pesquisa conduzida por Furlani e colaboradores (2008) também ocorreu na cidade de

Jaboticabal e tal achado foi associado à predominância de cães sem raça definida na casuística hospitalar da referida cidade. Com relação a ocorrência desta neoplasia em cães da raça boxer, alguns pesquisadores sugerem que exista uma causa de base genética associada a sua ocorrência (GOLDSCHMIDT e HENDRICK, 2002; GIEGER et al., 2003; LONDON e THAMM, 2013), o que pode justificar a alta frequência deste tumor nesta raça. Inclusive, a ocorrência do MCT, em boxers está associada a tumores mais diferenciados (THAMM e VAIL, 2001), o que confere um melhor prognóstico ao paciente, corroborando ao observado no presente estudo, no qual 87,5% dos cães da raça boxer, pertenciam ao grupo SV > 6 meses, sendo também observada uma associação significativa entre o maior tempo de sobrevida e cães das raças boxer, pitbull e SRD ($P=0,0002$). Outro fato recentemente descrito por Ferioli e colaboradores (2013) foi uma associação significativa entre a expressão de IGF-1 (fator de crescimento semelhante a insulina tipo 1), que está envolvido na via ativadora da mitose, da transcrição e na via inibidora da apoptose, e o porte de animais acometidos por mastocitoma. Sugerindo que esta característica do paciente (porte), possa influenciar no surgimento de mastocitomas, ligados aos receptores do tipo tirosina quinase e seus ligantes, como no caso do IGF-1.

Segundo alguns autores, o tamanho tumoral e a presença de ulcerações estão relacionados a uma maior ocorrência de recidivas e metástases, sendo portanto, associados a um pior prognóstico para o paciente (GINN et al., 2000; SÉGUIN et al., 2001; HAHN et al., 2004; MULLINS et al., 2006), ratificando o que foi observado na presente pesquisa na qual, 92,8% e 50% dos pacientes que pertenciam ao grupo SV \leq 6 meses apresentavam tamanho tumoral superior a três centímetros e tumores ulcerados, respectivamente. Pôde-se notar também uma associação significativa entre o menor tempo de sobrevida dos pacientes e o tamanho tumoral (maior que três centímetros) ($P < 0,0001$), e a presença de ulcerações ($P=0,0180$).

Com relação a distribuição anatômica dos tumores, as localizações mais frequentes foram região abdominal, inguinal ou perineal (33%), seguidas pelos membros torácicos e pélvicos (28%) e tórax (24%), excetuando-se a região torácica, proporções semelhantes foram observadas por Hotterndorf e Nielsen (1968), Cohen e colaboradores (1974) e Thamm e Vail (2001). A utilização da

localização tumoral como um fator ligado ao prognóstico do paciente ainda permanece incerta visto que, alguns autores defendem essa relação (GOUVIER et al., 2003; COUTO, 2006; THAMM et al., 2007), enquanto outros a contradizem (SFILIOGI et al., 2005). Entretanto, pôde-se observar uma associação entre a localização de cabeça e pescoço e um menor tempo de sobrevida ($P=0,0216$) dos pacientes deste estudo, inclusive 71% dos pacientes cujo tumor encontrava-se nesta região pertenciam ao grupo $SV \leq 6$ meses. Kiupel e colaboradores (2005), em sua pesquisa descrevem que esta localização apresenta um maior risco de desenvolvimento de novos tumores podendo, portanto, estar associada a um pior prognóstico.

No que tange a quantidade de tumores observada nos pacientes, 30% destes apresentaram nódulos múltiplos, uma frequência semelhante foi observada por McCaw e colaboradores (1997). Entretanto a associação deste achado clínico com o prognóstico do paciente parece não ser um consenso entre os pesquisadores (KIUPEL et al., 2005; MULLINS et al., 2006). Quando o número de tumores foi comparado ao tempo de sobrevida dos pacientes desta pesquisa, não se observou uma associação destes parâmetros ($P>0,05$), corroborando ao descrito por Thamm e colaboradores (1999) que não associaram a ocorrência de múltiplos nódulos a piores prognósticos.

A presença de metástases em órgãos distantes ou em linfonodos regionais foi observada em 9% e 28% dos pacientes, respectivamente. Todos os pacientes nos quais detectou-se a presença de metástases pertenciam ao grupo $SV \leq 6$ meses, e quando esses achados foram confrontados com o tempo de sobrevida, observou-se uma associação significativa entre a presença de metástases em linfonodos ($P<0,0001$) e à distância ($P<0,0001$) e um menor tempo de sobrevida dos pacientes. Fato este amplamente descrito em literatura (GOLDSCHMIDT e HENDRICK, 2002; KIUPEL et al., 2011; BLACKWOOD et al., 2012; LONDON e THAMM, 2013).

Com relação ao estadiamento clínico, pôde-se observar que todos os pacientes em estadio IV e V pertenciam ao grupo com $SV \leq 6$ meses. Estes estadios estão associados a presença de metástases e de maneira semelhante ao descrito anteriormente, quando esses dados foram confrontados com o tempo de sobrevida dos pacientes, observou-se uma associação significativa entre os estadios IV e V ($P<0,0001$) e um menor tempo de sobrevida desses

pacientes, concordando com a literatura que relaciona esses estádios a um menor tempo de sobrevida e intervalo livre da doença (LaDUE et al., 1998; THAMM et al., 1999; LONDON e THAMM, 2013). Com relação aos estádios I, II e III não observou-se diferença significativa entre o tempo de sobrevida desses pacientes ($P>0,05$), corroborando com autores que questionam a associação de um pior prognóstico com o estágio mais elevado (III). Visto que, Thamm e colaboradores (1999) não observaram, em seu experimento, diferenças no tempo de sobrevida de pacientes em estágio III em relação aos pacientes em estágio II.

O rápido crescimento tumoral foi observado em 49% dos pacientes, sendo que, 100% dos pacientes do grupo $SV \leq 6$ meses apresentaram rápida velocidade de crescimento tumoral, enquanto que 25% do grupo $SV > 6$ meses apresentaram esta velocidade de crescimento. Esta característica normalmente está associada a tumores indiferenciados, o que confere um pior prognóstico ao paciente (LONDON e THAMM, 2013). Quando confrontou-se a velocidade de crescimento tumoral com a sobrevida, pôde-se observar associação significativa com um menor tempo de sobrevida dos pacientes ($P<0,001$), corroborando com achados descritos por Bostock e Dye, (1973), Bostock (1986) e Govier (2003), que observaram um menor tempo de sobrevida dos pacientes cujos tumores apresentaram um rápido crescimento.

Com relação a consistência dos tumores, neste trabalho pôde-se observar que tumores que apresentavam consistência firme foram associados a um menor tempo de sobrevida dos pacientes ($P=0,0172$), quando comparado aos que apresentavam consistência macia. Tal achado corrobora ao descrito por Welle e colaboradores (2008), que descrevem a associação da consistência macia dos MCT a tumores mais diferenciados.

No que tange a terapêutica do mastocitoma canino, diversos fatores (características clínicas, estadiamento, classificação histopatológica, achados imuno-histoquímicos) influenciam na escolha do protocolo mais adequado para cada paciente (BLACKWOOD, 2012; LONDON e THAMM, 2013). Este estudo foi composto por uma população heterogênea de pacientes o que torna difícil a determinação da melhor resposta a terapia instituída, visto que foram avaliados pacientes com prognósticos distintos. Contudo, ao compararmos as modalidades terapêuticas com o tempo de sobrevida global dos pacientes

desta pesquisa, observou-se que os pacientes que foram submetidos a cirurgia e a cirurgia associada a quimioterapia, apresentaram tempo de sobrevivência superior aos demais pacientes ($P < 0,0001$).

Levando-se em consideração as características clínicas avaliadas nesta pesquisa, marcadores tumorais que vem sendo estudados na medicina humana (AL-SAAD et al., 2009; GHAYAD e COHEN, 2010; FAHMY et al., 2013) (p-AKT Ser 473, p-AKT Thr 308, p-mTOR, p-4EBP1, eIF4e e p-S6K1) foram avaliados com o intuito de determinarmos novos marcadores prognósticos para o MCT canino. Recentemente, Amagai e colaboradores (2013) demonstraram em seu experimento que a via da PI3K desempenha papel de fundamental importância na proliferação de linhagens celulares de MCT canino. Sugerindo, inclusive, que a utilização de inibidores específicos de proteínas desta via possa ser benéfica aos pacientes acometidos por esta neoplasia.

Com relação a imunomarcagem da proteína p-AKT Ser 473 observou-se que a localização da imunomarcagem foi citoplasmática (52%), semelhante ao descrito por Rodrigues e colaboradores (2012) que observaram esta localização de imunomarcagem para a mesma proteína em mastocitomas caninos. Entretanto, segundo o The Human Protein Atlas (<http://www.proteinatlas.org/ENSG00000142208/tissue>) e Murai e colaboradores (2012) a imunomarcagem desta proteína também pode ser nuclear e citoplasmática, como observado em 48% das amostras da presente pesquisa. Este fato pode ser explicado pois, após a fosforilação nos domínios Ser 473 e Thr 308, a proteína AKT torna-se ativa, translocando-se para o núcleo.

Pôde-se observar que todas as amostras avaliadas neste trabalho apresentaram imunomarcagem, havendo divergências entre a intensidade e distribuição da marcação em cada amostra. Achado semelhante foi observado por Rodrigues e colaboradores (2012) que observaram marcação em 96% das amostras de mastocitoma avaliadas. Todavia, quando comparou-se a localização, a intensidade e a distribuição de imunomarcagem entre os grupos estudados ($SV \leq 6$ meses e $SV > 6$ meses) e o tempo de sobrevivência dos pacientes, não foram observadas diferenças estatísticas significativas ($P > 0,05$).

Já para a proteína p-AKT Thr 308 observou-se que a localização da imunomarcagem foi predominantemente nuclear e citoplasmática (93%), semelhante ao descrito por Murai e colaboradores (2012) em sua pesquisa. Tal achado pode ser explicado, de maneira semelhante à proteína anterior, pois ocorre translocação nuclear desta proteína após sua ativação. Todas as amostras avaliadas apresentaram imunomarcagem divergindo apenas na porcentagem de células marcadas, na localização e na intensidade de marcação entre as amostras. Quando confrontou-se a intensidade de imunomarcagem desta proteína com os grupos estudados e com o tempo de sobrevivência dos pacientes, observou-se associação significativa entre a forte intensidade de imunomarcagem (forte) e as amostras tumorais do grupo de pacientes com $SV \leq 6$ meses ($P=0,0002$), e com um menor tempo de sobrevivência global dos pacientes desta pesquisa ($P=0,0006$). Observou-se associação, também, entre a alta intensidade de imunomarcagem e características clínicas dos pacientes tais como, estádios IV e V ($P=0,0018$), tumores maiores que três centímetros ($P=0,0473$), presença de metástases em linfonodos regionais ($P=0,0008$), localização tumoral em cabeça e pescoço ($P=0,0143$) e tumores com rápida velocidade de crescimento ($P=0,0023$). Os outros achados imunohistoquímicos desta proteína como localização e porcentagem de células marcadas não mostraram diferenças significativas quando comparados aos parâmetros clínicos dos pacientes deste estudo ($P>0,05$).

As características citadas anteriormente, estão associadas a piores prognósticos. Achados semelhantes foram descritos por Al-Saad e colaboradores (2009), os quais compararam a imunomarcagem de algumas proteínas da via com variáveis clinicopatológicas de pacientes com carcinoma pulmonar, e observaram uma associação significativa entre o aumento da intensidade de imunomarcagem de p-AKT Thr 308 e características relacionadas a um pior prognóstico para o paciente. Já o mesmo não foi observado para a proteína p-AKT Ser 473 corroborando com o observado no presente trabalho. Tsurutani e colaboradores (2006) descreveram a associação de apenas um sítio de fosforilação de AKT ao prognóstico de pacientes oncológicos, ratificando o que foi observado nesta pesquisa.

Com relação as proteínas p-mTOR, p-4EBP1 e eIF4e pôde-se observar que a imunomarcagem destas foi, predominantemente, nuclear e

citoplasmática, sendo tal marcação observada em 91%, 67% e 74% das amostras. Os achados das duas primeiras proteínas assemelham-se ao descrito por Murai e colaboradores (2012) que observaram esta localização de imunomarcação em hemangiossarcomas caninos, entretanto para a proteína eIF4e estes autores relataram marcação predominantemente citoplasmática nas amostras analisadas. Não há descrição na literatura de experimentos avaliando esta proteínas em MCT canino, no entanto, segundo Rong e colaboradores (2008) a proteína eIF4e também está presente no núcleo, pois acredita-se que desta forma, esta proteína auxilie no transporte nuclear-citoplasmático de determinados RNA mensageiros, entretanto o mecanismo pelo qual esta proteína fica retida no interior da carioteca ainda é desconhecido.

Com relação a localização, intensidade e distribuição de marcação destas proteínas, quando estes parâmetros foram associados aos grupos (SV \leq 6 meses e SV $>$ 6 meses) e ao tempo de sobrevida dos pacientes desta pesquisa, não observou-se diferença significativa entre tais parâmetros ($P > 0,05$). Semelhante ao observado por Fahmy e colaboradores (2013), que ao avaliarem a imunomarcação de componentes desta via como o p-mTOR e o 4EBP1 em 142 carcinomas uroteliais em humanos não observaram correlação significativa entre os achados imuno-histoquímicos e as variáveis clínicopatológicas dos pacientes do estudo. A proteína eIF4e também não mostrou valor prognóstico para o MCT no presente trabalho, divergindo do descrito por De Benedetti e Graff (2004) que descrevem a associação desta proteína com o prognóstico de pacientes com tumor de mama, carcinoma prostático e carcinoma de bexiga.

Já para a proteína p-S6K1 observou-se que a localização da imunomarcação foi nuclear e citoplasmática (87%). Este achado contraria o descrito por Ettl e colaboradores (2012), os quais relataram imunomarcação citoplasmática para esta proteína. Entretanto, tal fato pode ser justificado visto que, a fosforilação de S6K1 por mTOR que ocorre no domínio treonina 389, ativa a proteína S6K1 de 70 kDa (RUVINSKY e MEYUHAS, 2006 e SHAW, 2008). E segundo Rosner e Hengstschlager (2011), esta proteína localiza-se tanto no núcleo como no citoplasma, justificando assim a localização da imunomarcação observada neste experimento. Pôde-se observar

imunomarcção em todas as amostras analisadas. Ao associarmos a localização da imunomarcção, a porcentagem de células marcadas com os grupos analisados e com o tempo de sobrevida dos pacientes, não observou-se diferenças significativas entre tais parâmetros ($P > 0,05$). Entretanto, quando a intensidade da imunomarcção foi confrontada com os grupos estudados, com os parâmetros clínicos e com tempo de sobrevida global dos pacientes, observou-se associações significativas ($P < 0,05$).

Observou-se associação entre a forte intensidade de imunomarcção de p-S6K1 e as amostras tumorais do grupo de pacientes com $SV \leq 6$ meses ($P < 0,0001$) e com um menor tempo de sobrevida global dos pacientes desta pesquisa ($P < 0,0001$). Também foi analisada a associação entre esta intensidade de imunomarcção e características clínicas tais como, estadios IV e V ($P < 0,0001$), tumores maiores que três centímetros ($P = 0,0094$), presença de metástases em linfonodos regionais ($P < 0,0001$), presença de metástases à distância ($P = 0,0108$), tumores com rápida velocidade de crescimento ($P < 0,0001$) e tumores com consistência firme ($P = 0,0071$). Concordando com o observado por Fahmy e colaboradores (2013) que em seu trabalho observaram associação entre a alta imunomarcção de S6K1 e a recorrência de carcinoma urotelial em humanos. Associando, portanto, esta proteína aos indicadores de prognóstico dos pacientes acometidos por tal neoplasia. E de maneira semelhante os trabalhos de Kim e colaboradores (2009 e 2011) associam o aumento da expressão desta proteína a piores prognósticos para pacientes com tumores de mama.

Nesta pesquisa pôde-se observar imunomarcção de todas as proteínas estudadas em todas as lâminas avaliadas. Achado semelhante já foi descrito, em mastocitomas por Rodriguez e colaboradores (2012), que observaram imunomarcção da proteína p-AKT Ser 473 em 96% (24/25) das amostras avaliadas. Acredita-se que tal justificativa se deva ao fato de que a via da PI3K/AKT/mTOR desempenha importante papel na sobrevivência, funcionamento e crescimento de mastócitos normais (KIM et al., 2008; MA et al., 2011; SHIN et al., 2012), semelhante ao observado para o receptor de membrana c-KIT (LONDON et al., 1996). Alguns autores descrevem que a imunomarcção de c-Kit observada em mastocitomas se deva a manutenção deste receptor pelas células neoplásicas, e que os diferentes padrões de

imunomarcção possam estar associados a uma desregulação funcional deste receptor (PREZIOSI et al., 2004). Diante disso, especula-se que mecanismos semelhantes possam ocorrer na via da PI3K/AKT/mTOR, justificando assim sua alta taxa de imunomarcção.

O aumento da intensidade de imunomarcção observado nas proteína p-AKT Thr 308 e S6K1 no MCT cutâneo de cães, pode ser justificado por ampliações ocorridas nos oncogenes que codificam estas proteínas. Achado semelhante a este já foi descrito para o gene c-erb B2 em tumores mamários na mulher (TÊTU e BRISSON, 1994).

CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo, de acordo com a metodologia utilizada, revelou que o aumento da intensidade (forte) de imunomarcção de p-AKT Thr 308 e p-S6K1 estão relacionados a características clínicas do paciente e tumorais associadas a um pior prognóstico. Podendo, tais proteínas, serem utilizadas em painéis prognósticos para esta neoplasia.

REFERÊNCIAS

AL-SAAD, S.; DONNEM, T.; AL-SHIBLI, K.; PERSSON, M.; BREMNES, R. M.; BUSUND, L. Diverse prognostic roles of Akt isoforms, PTEN and PI3K in tumor epithelial cells and stromal compartment in non-small cell lung cancer. **Anticancer Research**, v. 29, p. 4175-4184, 2009.

BÄRLUND, M.; FOROZAN, F.; KONONEN, J.; BUBENDORF, L.; CHEN, Y.; BITTNER, M. L.; TORHORST, J.; HAAS, P.; BUCHER, C.; SAUTER, G.; KALLIONIEMI, O. P.; KALLIONIEMI, A. Detecting activation of ribosomal protein S6 kinase by complementary DNA and tissue microarray analysis. **Journal of the national Cancer Institute**, v. 92, n. 15, p.1252-1259, 2000.

BLACKWOOD, L.; MURPHY, S.; BURACCO, P.; DE VOS, J. P.; DE FORNELTHIBAUD, P.; HIRSCHBERGER, J.; KESSLER, M.; PASTOR, J.; PONCE, F.; SAVARY-BATAILLE, K.; ARGYLE, D. J. European consensus

document on mast cell tumours in dogs and cats. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 10, p. e1-e29, 2012.

BOSTOCK, D. E. The prognosis following surgical removal of mastocytomas in dogs. **Journal of Small Animal Practice**, v. 14, p. 27-40, 1973.

BOSTOCK, D. Neoplasms of the skin and subcutaneous tissues in dogs and cats. **Brasilian Veterinary Journal**, v. 142, p. 1-19, 1986.

COHEN, D.; REIF, J. S.; BRODEY, R. S.; KEISER, H. Epidemiological analysis of the most prevalent sites and types of canine neoplasia observed in a veterinary hospital. **Cancer Research**, v. 34, p. 2859-2868, 1974.

COUTO, C. G. Tumores de mastócitos em cães e gatos. NELSON R. W.; COUTO, C. G. **Medicina Interna de Pequenos Animais**, 3 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 1109 – 1111, 2006.

DE BENEDETTI A.; GRAFF, J. R. eIF-4E expression and its role in malignances and metástases. **Oncogene**, v. 23, p. 3189-3199, 2004.

ETTL, T.; SCHWARZ-FURLAN, S.; HAUBNER, F.; MÜLLER, S.; ZENK, J.; GOSAU, M.; REICHERT, T. E.; ZEITLER, K. The PI3K/AKT/mTOR signalling pathway is active in salivary gland cancer and implies different functions and prognoses depending on cell localization. **Oral Oncology**, v. 48, n. 9, p. 822-30, 2012.

FAHMY, M.; MANSURE, J. J.; BRIMO, F.; YAFI, F. A.; SEGAL, R.; ALTHUNAYAN, A.; HICKS, J.; MEEKER, A.; NETTO, G.; KASSOUF, W. Relevance of the mammalian target of rapamycin pathway in the prognosis of patients with high-risk non-muscle invasive bladder cancer. **Human Pathology**, v. 44, n.9, p. 1766-72, 2013.

FERIOLI, R. B.; NETO, R. T.; COSTA, S. S.; ALESSI, A. C.; ROCHA, R. M; AMORIM, R. L. Relação da expressão de fatores de crescimento celular (IGF-

1) e (SCF) com fatores prognósticos e o alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR) em mastocitomas cutâneos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 4, p. 549-556, 2013.

FURLANI, J. M.; DALECK, C. R.; VICENTI, F. A. M.; DE NARDI, A. B.; PEREIRA, G. T.; SANTANA, A. E.; EURIDES, D.; SILVA, L. A. F. Mastocitoma Canino: Estudo retrospectivo. **Ciência Animal Brasileira**, v.9, n.1, p. 242-50, 2008.

GHAYAD, S. E.; COHEN, P. A. Inhibitors of the PI3K/AKT/mTOR pathway: new hope for breast cancer patients. **Recent Patents on Anti-cancer Drug Discovery**, v. 5, p. 29-57, 2010.

GIEGER, T. L.; THÉON, A. P.; WERNER, J. A.; MCENTEE, M. C.; RASSNICK, K. M.; DECOCK, H. E. Biologic behavior and prognostic factors for mast cell tumors of the canine muzzle: 24 cases (1990-2001). **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 15, n. 5, p. 697-92, 2003.

GINN, P. E.; FOX, L. E.; BROWER, J. C.; GASKIN, A.; KURZMAN, I. D.; KUBILIS, P. S. 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.

GLEIXNER, K. V.; MAYERHOFER, M.; CERNY-REITERER, S.; HORMANN, G.; RIX, U.; BENNETT, K. L.; HADZIJUSUFOVIC, E.; MEYER, R. A.; PICKL, W. F.; GOTLIB, J.; HORNY, H. P.; REITER, A.; MITTERBAUER-HOHENDANNER, G.; SUPERTI-FURGA, G.; VALENT, P. KIT-D816V-independent oncogenic signaling in neoplastic cells in systemic mastocytosis: role of Lyn and Btk-activation and disruption by dasatinib and bosutinib. **Blood**, v. 118, p. 1885-1898, 2011.

GOVIER, S. M. Principles of Treatment for Mast Cell Tumors. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**, v. 18, n. 2, p. 103-06, 2003.

HAHN, K.A.; KING, G.K.; CARRERAS, J.K. Efficacy of radiation therapy for incompletely resected grade-III mast cell tumors in dogs 31 cases (1987–1998). **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 224, p. 79–82, 2004.

HAHN, K. A.; OGILVIE, G.; RUSK, T.; DEVAUCHELLE, P.; LEBLANC, A.; LEGENDRE, A.; POWERS, B.; LEVENTHAL, P. S.; KINET, J. P.; PALMERINI, F.; DUBREUIL, P.; MOUSSY, A.; HERMINE, O. Masitinib is safe and effective for the treatment of canine mast cell tumors. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 22, p. 1301–1309, 2008.

HOTTENDORF, G.; NIELSEN, S. Pathologic report of 29 necropsies on dogs with mastocytoma. **Veterinary Pathology**, v. 5, p. 102 - 121, 1968.

JASTRZEBSKI, K.; HANNAN, K. M.; TCHOUBRIEVA, E. B.; HANNAN, R. D.; PEARSON, R. B. Coordinate regulation of ribosome biogenesis and function by the ribosomal protein S6 kinase, a key mediator of mTOR function. **Growth Factors**, v. 25, n. 4, p. 209-226, 2007.

KIM, M. S.; RADINGER, M.; GILFILLAN, M. The multiple roles of phosphoinositide 3-kinase in mast cell biology. **Trends in Immunology**. v. 29, p. 493–501, 2008.

KIM, D.; AKCAKANAT, A.; SINGH, G.; SHARMA, C.; MERIC-BERNSTAM, F. Regulation and localization of ribosomal protein S6 kinase 1 isoforms. **Growth Factors**, v.1, p. 12-21, 2009.

KIM, E. K.; KIM, H. A.; KOH, J. S.; KIM, M. S.; KIM, K. I.; LEE, J. I.; MOON, N. M.; KO, E.; NOH, W. C. Phosphorylated S6K1 is a possible marker for endocrine therapy resistance in hormone receptor-positive breast cancer. **Breast Cancer Research Treatment**, v.126, n.1, p. 93 - 99, 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 tumor. **Veterinary Pathology**, v. 41, p. 371-377, 2004.

KIUPEL, M.; WEBSTER, J. D.; MILLER, R. A.; KANEENE, J. B. Impact of tumour depth, tumour location and multiple synchronous masses on the prognosis of canine cutaneous mast cell tumours. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 52, p. 280–86, 2005.

KIUPEL, M.; WEBSTER, J. D.; BAILEY, K. L.; BEST, S.; DELAY, J.; DETRISAC, C. J.; 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, n. 1, p. 147-155, 2011.

LaDUE, T.; PRICE, G. S.; DODGE, R.; PAGE, R. L.; THRALL, D. E. Radiation therapy for incompletely resected canine mast cell tumors. **Veterinary Radiology and Ultrasound**, v. 39, p. 57-62, 1998.

LAPLANTE, M.; SABATINI, D. M. MTOR signaling at a glance. **Journal of Cell Science**, v. 122, p. 3589–3594, 2009.

LONDON, C.; KISSEBERTH, W.; GALLI, S.; GEISLER, E.; HELFAND, S. Expression of stem cell factor receptor (c-kit) by the malignant mast cells from spontaneous canine mast cell tumours. **Journal of Comparative Pathology**, v. 115, p. 399-414, 1996.

LONDON, C. A.; SEGUIN, B. Mast cell tumors in the dog. **Veterinary Clinics of Small Animal**, v. 33, p. 473–89, 2003.

LONDON, C. A.; THAMM, D. H. Mast cell tumors. In: WITHROW e MacEWEN'S. **Small animal oncology**, 5.ed. China: Saunders Elsevier, Cap. 20, p. 335-355, 2013.

MA, P.; MALI, R. S.; MUNUGALAVADLA, V.; KRISHNAN, S.; RAMDAS, B.;

SIMS, E.; MARTIN, H.; GHOSH, J.; LI, S.; CHAN, R. J.; KRYSTAL, G.; CRAIG, A. W.; TAKEMOTO; KAPUR, R. The PI3K pathway drives the maturation of mast cells via microphthalmia transcription factor. **Blood**, v. 118, p. 3459–3469, 2011.

McCAW, D.; MILLER, M.; BERGMAN, P. Vincristine therapy for mast cell tumors in dogs. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 11, p. 375-78, 1997.

MERIC-BERNSTAM, F.; GONZALEZ-ANGULO, A. M. Targeting the mTOR signaling network for cancer therapy. **Journal of Clinical Oncology**, v. 27, p. 2278-87, 2009.

MULLINS, M.; DERNELL, W.; WITHROW, S.; EHRHART, E.; THAMM, D.; LANA, S. Evaluation of prognostic factors associated with outcome in dogs with multiple cutaneous mast cell tumors treated with surgery with and without adjuvant treatment: 54 cases (1998-2004). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 228, n.1, p. 91-95, 2006.

MURAI, A.; ABOU ASA, S.; KODAMA, A.; SAKAI, H.; HIRATA, A.; YANAI, T. Immunohistochemical analysis of the AKT/mTOR/4E-BP1 signalling pathway in canine haemangiomas and haemangiosarcomas. **Journal of Comparative Pathology**, v. 147, n. 4, p. 1-11, 2012.

O'CONNELL, K.; THOMPSON, M. Evaluation of prognostic indicators in dogs with multiple, simultaneously occurring cutaneous mast cell tumours: 63 cases. **Veterinary Comparative Oncology**, v. 11, n. 1, p. 51-62, 2011.

O'REILLY, K. E.; ROJO, F.; SHE, Q. B.; SOLIT, D.; MILLS, G. B.; SMITH, D.; LANE, H.; HOFMANN, F.; HICKLIN, D. J.; LUDWIG, D. L.; BASELGA, J.; ROSEN, N. mTOR inhibition induces upstream receptor tyrosine kinase signaling and activates AKT. **Cancer Research**, v. 66, p. 1500-8, 2006.

PATNAIK, A.; EHLER, W.; MACEWEN, E. Canine cutaneous mast cell tumor:

morphologic grading and survival times in 83 dogs. **Veterinary Pathology**, v.21, p.469–474, 1984.

PREZIOSI, R.; MORINI, M.; SARLI, G. Expression of the KIT protein (CD117) in primary cutaneous mast cell tumors of the dog. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 16, p. 554-61, 2004.

RIVA, F.; BRIZZOLA, S.; STEFANELLO, D.; CREMA, S.; TURIN, L. A study of mutations in the c-KIT gene of 32 dogs with mastocytoma. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 17, p. 385-388, 2005.

RODRIGUEZ, S.; FADLALLA, K.; GRAHAM, T.; TAMERU, B.; FERMIN, C. D.; SAMUEL, T. Immunohistochemical evaluation of AKT protein activation in canine mast cell tumours. **Journal of Comparative Pathology**, v. 147, n. 2-3, p. 171-176, 2012.

RONG, L.; LIVINGSTONE, M.; SUKARIEH, R.; PETROULAKIS, E.; GINGRAS, A. C.; CROSBY, K.; SMITH, B.; POLAKIEWICZ, R. D.; PELLETIER, J.; FERRAIUOLO, M. A.; SONENBERG, N. Control of eIF4E cellular localization by eIF4E-binding proteins, 4E-BPs. **RNA**, v. 14, n. 7, p.1318-27, 2008.

ROSNER, M.; HENGSTSCHLÄGER, M. Nucleocytoplasmic localization of p70 S6K1, but not of its isoforms p85 and p31, is regulated by TSC2/mTOR. **Oncogene**, v. 30, n.44, p.4509-22, 2011.

RUVINSKY, I.; MEYUHAS, O. Ribosomal protein S6 phosphorylation: from protein synthesis to cell size. **Trends Biochemistry Science**, v. 31, p. 342–346, 2006.

SÉGUIN, B.; LEIBMAN, N.; BREGAZZI, V.; OGILVIE, G.; POWERS, B.; DERNELL, W.; FETTMAN, M.; WITHROW, S. Clinical outcome of dogs with grade-II mast cell tumors treated with surgery alone: 55 cases (1996-1999). **Journal of American Veterinary Medicine Association**, v. 218, n. 7, p. 1120-

23, 2001.

SFILIGOI, G.; RASSNICK, K.; SCARLETT, J.; NORTHRUP, N.; GIEGER, T. Outcome of dogs with mast cell tumors in the inguinal or perineal region versus other cutaneous locations: 124 cases (1990-2001). **Journal of American Veterinary Medicine Association**, v. 226, n. 8, p.1368-74, 2005.

SHAW, R. J. mTOR signaling: RAG GTPases transmit the amino acid signal. **Trends Biochemistry Science**, v. 33, p. 565–568, 2008.

SHIN, J.; PAN, H.; ZHONG, X. P. Regulation of mast cell survival and function by tuberous sclerosis complex 1. **Blood**, v. 119, p. 3306–3314, 2012.

STEMKE-HALE, K.; GONZALEZ-ANGULO, A. M.; LLUCH, A.; NEVE, R. M.; KUO, W. L.; DAVIES, M.; CAREY, M.; HU, Z.; GUAN, Y.; SAHIN, A.; SYMMANS, W. F.; PUSZTAI, L.; NOLDEN, L. K.; HORLINGS, H.; BERNIS, K.; HUNG, M. C.; VAN DE VIJVER, M. J.; VALERO, V.; GRAY, J. W.; BERNARDS, R.; MILLS, G. B.; HENNESSY, B. T. An integrative genomic and proteomic analysis of PIK3CA, PTEN, and AKT mutations in breast cancer. **Cancer Research**, v. 68, p. 6084-91, 2008.

TAKEUCHI, Y.; FUJINO, Y.; WATANABE, M.; NAKAGAWA, T.; OHNO, K.; SASAKI, N.; SUGANO, S.; TSUJIMOTO, H. Aberrant autophosphorylation of c-KIT receptor in canine mast cell tumor cell lines. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 137, n. 3-4, p. 208-216, 2010.

TÊTU, B.; BRISSON, J. Prognostic significance of her-2/neu oncoprotein expression in node-positive breast cancer: the influence of the pattern of immunostaining and adjuvant therapy. **Cancer**, v. 73, p. 2359-65, 1994.

THAMM, D. H.; MAULDIN, E. A.; VAIL, D. M. Prednisone and vinblastine chemotherapy for canine mast cell tumor—41 cases (1992-1997). **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 13, p.491-497, 1999.

THAMM, D.; VAIL, D. Mast Cell Tumors. WITHROW & MaCEWEN'S. **Small Animal Oncology**. Philadelphia: WB Saunders Company, p. 261-82, 2001.

THAMM, D.; VAIL, D. Mast Cell Tumors. WITHROW & MaCEWEN'S. **Small Animal Clinical Oncology**. St Louis: Saunders Elsevier, p. 402-24, 2007.

TSURUTANI, J.; FUKUOKA, J.; TSURUTANI, H.; SHIH, J. H.; HEWITT, S. M.; TRAVIS, W. D.; JEN, J.; DENNIS, P. A. Evaluation of two phosphorylation sites improves the prognostic significance of Akt activation in non-small cell lung cancer tumors. **Journal of Clinical Oncology**, v. 24, p. 306-314, 2006.

VIVANCO, I.; SAWYERS, C. L. The phosphatidylinositol 3-kinase AKT pathway in human cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, n. 7, p. 489-501, 2002.

WEBSTER, J. D.; KIUPEL, M.; YUZBASIYAN-GURKAN, V. Evaluation of the kinase domain of c-KIT in canine cutaneous mast cell tumors. **BMC Cancer**, v. 6, p. 85, 2006.

WELLE, M. M.; BLEY, C. R.; HOWARD, J.; RUFENACHT, S. Canine mast cell tumours: a review of the pathogenesis, clinical features, pathology and treatment. **Veterinary Dermatology**, v. 19, p. 321-339, 2008.

ZHANG, Y.; GAO, X.; SAUCEDO, L. J.; RU, B.; EDGAR, B. A.; PAN, D. Rheb is a direct target of the tuberous sclerosis tumour suppressor proteins. **Nature Cell Biology**, v. 5, p. 578-581, 2003.

CAPITULO 3 – ASSOCIAÇÃO ENTRE A IMUNOMARCAÇÃO DAS PROTEÍNAS DA VIA PI3K/AKT/mTOR E OS ACHADOS PATOLÓGICOS DE CÃES COM MASTOCITOMA CUTÂNEO: DETERMINAÇÃO DE NOVOS MARCADORES PROGNÓSTICOS

RESUMO

O mastocitoma (MCT) é uma neoplasia cutânea comum em cães, que apresenta comportamento biológico bastante variado e etiologia ainda desconhecida. Inúmeros pesquisadores têm buscado marcadores que possam contribuir para a determinação de um prognóstico mais acurado, e com isso definir terapias mais específicas e eficazes. A graduação histopatológica, a contagem do número de figuras de mitose, a avaliação da proliferação celular e padrão de marcação de c-KIT são parâmetros que vem sendo utilizados na predição do prognóstico dos pacientes, embora ainda não consigam definir o prognóstico em todos os casos. Neste contexto, pesquisas envolvendo a via PI3K/AKT/mTOR vem ganhando importância, visto que tal via tem papel de suma importância na maquinaria e funcionamento celular. Alguns autores sugerem que alterações nesta via estão associadas à ocorrência de tumores mais agressivos. Inibidores específicos desta via vêm sendo avaliados, em ensaios clínicos, com resultados promissores para o tratamento de pacientes com câncer. Neste estudo, objetivou-se avaliar a imunomarcação dos componentes proteicos desta via, por meio da técnica de imuno-histoquímica, os resultados foram associados com os achados patológicos (IM, graduação histopatológica, padrão de marcação de KIT e contagem de Ki-67) e com o tempo de sobrevivência de 46 pacientes acometidos por MCT, visando com isso averiguar o potencial prognóstico destas proteínas no MCT cutâneo. Observou-se que o aumento na intensidade de imunomarcação de p-AKT Thr 308 e p-S6K1 ocorreu em tumores cujos achados patológicos são associados a piores prognósticos. Sugere-se então, que tais achados estejam relacionados ao prognóstico do paciente, permitindo a utilização destas proteínas em painéis prognóstico para o mastocitoma cutâneo canino.

Palavras-chave: c-KIT, Ki-67, prognóstico, p-AKT Thr 308, p-S6K1.

CHAPTER 3 - ASSOCIATION BETWEEN PROTEIN IMMUNOSTAINING OF PI3K/AKT/mTOR PATHWAY AND PATHOLOGICAL FINDINGS IN DOGS WITH CUTANEOUS MAST CELL TUMOR: DETERMINATION OF NEW PROGNOSTIC MARKERS

ABSTRACT

The mast cell tumor (MCT) is a common skin cancer in dogs, which presents a quite varied biological behavior and unknown etiology. Numerous researchers have sought markers that may contribute to the determination of a more accurate prognosis, while establishing more specific and effective therapies. The histological classification, counting the mitotic index, the evaluation of cell proliferation and labeling pattern of c-KIT are parameters that have been used to predict the prognosis of patients, although can't define the prognosis in all cases. In this context, research involving PI3K/AKT/mTOR pathway have gained importance since, this approach has had an extremely important role in cellular function and machinery. Some authors suggest that alterations in this pathway are associated with the occurrence of more aggressive tumors. Specific inhibitors of this pathway have been evaluated in clinical trials with promising results for the treatment of cancer patients. In this study, we aimed to evaluate the immunostaining of the protein components of this pathway, through the technique of immunohistochemistry. The results were correlated with pathologic findings (MI, histopathological grade, KIT pattern immunostaining and Ki-67) and survival time of 46 patients affected by MCT, aiming to ascertain the prognostic potential of these proteins in cutaneous MCT. It was observed that the increase in the intensity of immunostaining of p-AKT Thr 308 and p-S6K1 occurred in tumors whose pathological findings were associated with poorer prognosis. Then it is suggested that these findings are related to the prognosis of the patient, allowing the use of these proteins in prognostic panels for canine cutaneous mast cell tumors.

Keywords: c-KIT, Ki-67, prognostic, p-AKT Thr 308, p-S6K1.

INTRODUÇÃO

O mastocitoma (MCT) é uma neoplasia proveniente de mastócitos, caracterizada pela proliferação anormal e transformação maligna dos mesmos (LONDON e THAMM, 2013). Representa uma das neoplasias mais comuns do cão (GROSS et al., 2005).

Seu comportamento biológico é altamente variável (BLACKWOOD et al., 2012), o que tem impulsionado a busca por fatores clínicos ou características patológicas que possam auxiliar na determinação do prognóstico dos pacientes acometidos por esta neoplasia. Atualmente, a graduação histopatológica é considerada como o fator prognóstico mais importante para o MCT canino (BLACKWOOD et al., 2012). Entretanto, não é capaz de estimar o comportamento tumoral em todos os casos (GOLDSCHMIDT e HENDRICK, 2002).

A classificação proposta por Patnaik e colaboradores (1984) vem sendo, há anos, utilizada por médicos veterinários na determinação do diagnóstico e do prognóstico do paciente. Esta classificação divide os MCTs em três graus, de acordo com o grau de diferenciação tumoral, baseando-se nas características das células neoplásicas como número de figuras de mitose, pleomorfismo celular e invasividade tumoral nos tecidos adjacentes. Os MCTs grau I são os mais bem diferenciados quando comparados aos demais graus. Segundo esses autores, 94 % dos cães com MCT grau I apresentam tempo de sobrevivência superior a 1500 dias. Este mesmo tempo de sobrevivência é observado em apenas 56% dos cães com MCT grau II e 7% dos cães com MCT grau III (PATNAIK et al., 1984).

Entretanto essa classificação tem gerado algumas discussões. A primeira delas é a variação entre patologistas na graduação do mesmo tumor, visto que esta classificação baseia-se em critérios subjetivos. A segunda é a alta ocorrência de MCT grau II, dificultando desta forma a determinação do prognóstico do paciente (NORTHRUP et al., 2005; PREZIOSI et al., 2007; STREFEZZI et al., 2003; PINCZOWSKI et al., 2008; STREFEZZI et al., 2009).

Diante disso, recentemente, foi proposta uma classificação mais objetiva, na qual a avaliação de características histológicas tais como número de figuras de mitose, de células multinucleadas, de núcleos bizarros e

cariomegalia são feitas de forma quantitativa. Tal classificação divide os MCTs em dois graus, alto e baixo e, observou-se, ainda, uma correlação com a sobrevida dos animais com MCTs de alto grau (até quatro meses), quando comparados aos de baixo grau (superior a 24 meses de sobrevida) (KIUPEL et al., 2011).

Além do grau histopatológico, alguns outros parâmetros vêm sendo utilizados com o objetivo de determinar, de maneira mais acurada, o prognóstico do paciente com MCT (BLACKWOOD et al., 2012). Marcadores de proliferação como o Ki-67 e o índice mitótico (IM) têm se mostrado como ferramentas úteis na predição do prognóstico de pacientes com MCT (PREZIOSI et al., 2004; SCASE et al., 2006; ROMANSIK et al., 2007; WEBSTER et al., 2007). Alguns autores demonstraram uma correlação significativa entre a contagem do número de mitoses e a sobrevida do paciente (PREZIOSI et al., 2004). Romansik e colaboradores (2007) sugeriram que pacientes cujos tumores apresentam IM superior a 5 (média da contagem de 10 campos de grande aumento) têm uma sobrevida média, significativamente, inferior aos cães com IM inferior a 5. O Ki-67 é um marcador de proliferação expresso praticamente, durante todo o ciclo celular, desde o início de G1 à fase de mitose. Esta proteína possui meia-vida curta, sendo degradada em, aproximadamente, uma hora após a mitose, tornando o Ki-67, uma opção bastante interessante na determinação do índice proliferativo de um determinado tumor (STREFEZZI, 2010). Segundo Webster e colaboradores (2007), pacientes cujos tumores apresentam contagem de Ki-67 superior a 23 (média da contagem de 10 campos de grande aumento), apresentam tempo de sobrevida, significativamente, inferior aos pacientes com contagem de Ki-67 inferior a 23.

Outro fator que vem ganhando destaque, é a expressão dos receptores de membrana tirosina quinase, KIT. Estes desempenham um importante papel na diferenciação, proliferação, sobrevivência e ativação dos mastócitos (LONDON et al., 1996). Estudos têm mostrado que, sua expressão citoplasmática (KIT II e KIT III), pode estar associada a ocorrências de mutações no gene, além de ser associada a tumores de piores prognósticos (ZEMKE et al., 2002; ABADIE et al., 2005; WEBSTER et al., 2006; WEBSTER et al., 2007).

Mesmo diante de fatores que, quando associados, podem auxiliar na predição do prognóstico do paciente, em alguns casos, ainda é difícil defini-lo, impulsionando, desta forma, a pesquisa por fatores que venham a agregar valores na determinação do prognóstico de pacientes com MCT.

Alguns autores sugerem que a desregulação de algumas vias de sinalização estão associadas a alterações na proliferação celular, sobrevivência e podem conferir um mau prognóstico ao paciente (CICENAS et al., 2005). Segundo Hideshima e colaboradores (2007), a via da PI3K/AKT (fosfatidilinositol 3 quinase/ proteína quinase B) é considerada determinante na agressividade tumoral, além do que, esta via compreende importantes alvos terapêuticos. Inclusive, alguns autores já salientaram a importância desta via no crescimento, sobrevivência e funcionamento de mastócitos normais (KIM et al., 2008; MA et al., 2011; SHIN et al., 2012).

A via da PI3K/AKT/mTOR (proteína alvo da rapamicina em mamíferos) é responsável por múltiplas funções celulares além de desempenhar papéis críticos na iniciação e progressão tumoral, tais como, crescimento e proliferação, motilidade, migração, invasão, angiogênese, sobrevivência e autofagia (McAULIFFE et al., 2010). A ativação desta via, ocorre através da ligação de fatores de crescimento a receptores de membrana tirosina quinase, essa ativação leva a fosforilação de mediadores de membrana e subsequente recrutamento e ativação de AKT. A fosforilação desta, por sua vez, leva a ativação de mTOR, que conseqüentemente culminará na fosforilação de seus efetores S6K1 (quinase ribossomal S6) e 4EBP1 (fator de iniciação eucariótico 4E ligante de proteína), cursando com a síntese de proteínas, lipídeos e organelas, influenciando assim no crescimento e proliferação celular (MERIC-BERNSTAM e GONZALEZ-ANGULO, 2009).

Diante do exposto, o presente trabalho visa avaliar o potencial prognóstico de proteínas desta via em MCTs caninos, por meio da técnica de imuno-histoquímica, associando os resultados da imunomarcagem proteica com achados patológicos (graduação histopatológica, padrão de imunomarcagem do receptor tirosina quinase KIT, IM, contagem de Ki-67) dos tumores e com tempo de sobrevida dos pacientes.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras

O presente estudo foi realizado com 46 cães com diagnóstico de mastocitoma, por meio de exames citológico e histopatológico. Os pacientes foram provenientes do Serviço de Oncologia Veterinária do Hospital “Governador Laudo Natel” - UNESP - Câmpus de Jaboticabal. Estes foram atendidos no período de março de 2011 a janeiro de 2013.

Os pacientes foram submetidos à exérese cirúrgica da neoformação ou a biópsia incisional, em casos nos quais não era possível a realização da exérese completa da mesma. Durante a intervenção cirúrgica, amostras tumorais de 1 cm³ foram coletadas, fixadas em solução de formol a 10% tamponada com fosfatos (pH 7,2) por 24 a 48 horas e posteriormente, transferidas para uma solução de álcool 70% até seu processamento. Nenhum paciente incluído neste estudo recebeu terapia antineoplásica antes da coleta do tumor. Em casos nos quais o paciente apresentava múltiplos nódulos, considerou-se o nódulo de pior prognóstico, baseado na classificação histopatológica proposta por Kiupel e colaboradores (2011).

A classificação histopatológica dos mastocitomas foi realizada baseando-se nas propostas de Patnaik e colaboradores (1984) e Kiupel e colaboradores (2011). Além destas classificações, procedeu-se a contagem do número de figuras de mitoses, do número de células marcadas pelo Ki-67, observadas em dez campos de grande aumento (400x), e a classificação quanto ao padrão de imunomarcagem de c-KIT (ROMANSIK et al., 2007; WEBSTER et al., 2007).

As amostras foram divididas em dois grupos (alto e baixo grau), seguindo a classificação proposta por Kiupel e colaboradores (2011). A escolha da divisão dos grupos, baseando-se nesta classificação, se deu pois, segundo estes autores, pacientes com tumores de alto grau apresentam tempo de sobrevida de até 4 meses e pacientes com tumores de baixo grau podem apresentar tempo de sobrevida superior a 24 meses. Portanto, esta divisão permitiu segregar os pacientes em grupos com prognósticos distintos.

Reação imuno-histoquímica

A reação imuno-histoquímica foi realizada no Laboratório de Imuno-histoquímica do serviço de patologia da UNESP – Câmpus de Botucatu, onde as amostras foram incluídas em parafina e seccionadas em cortes de 5 μ m de espessura e montadas em lâminas de vidro, carregadas eletricamente (Starfrost®).

Os cortes foram submetidos à desparafinização e hidratação em uma sequência de xilol e álcool. Posteriormente foi realizada a recuperação antigênica. Para os anticorpos p-AKT Thr 308, p-mTOR, p-S6K1, p-4EBP1, eIF4E, c-KIT e Ki-67 a mesma foi realizada utilizando-se solução tampão de Citrato 10 mM, pH 6,0, já para o anticorpo p-AKT Ser 473, utilizou-se solução Tris-EDTA com Tween 20, pH 9,0. A recuperação antigênica para todos os anticorpos foi realizada em panela de pressão (Pascal Dako), de acordo com o programa pré-estabelecido pelo fabricante.

O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com solução pronta para uso (Spring Bioscience) por 20 minutos e, em seguida realizou-se o bloqueio de reação inespecífica com solução pronta para uso (Spring Bioscience), por 60 minutos, a 27°C.

A seguir, os cortes foram incubados em câmara úmida com os anticorpos primários, seguindo os protocolos descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Diluições, clones, procedência, tempo e temperatura de incubação dos anticorpos utilizados em mastocitomas caninos (cortes parafinizados). Jaboticabal, 2014.

| Anticorpos anti | Procedência | Clone | Diluição | Tempo de incubação/ Temperatura |
|-----------------------|----------------|----------|----------|------------------------------------|
| p-AKT Ser 473 (M) | Cell Signaling | D9E | 1:50 | 24 horas/ 4°C |
| p-AKT Thr 308 (P) | Abcam | ab66134 | 1:50 | 18 horas/ 4°C |
| p-mTOR Ser 2448 (M) | Cell Signaling | 49F9 | 1:100 | 18 horas/ 4°C |
| p-S6K1 Thr 389 (P) | Abcam | Ab126818 | 1:500 | 2 horas/ 27°C |
| p-4EBP1 Thr 37/46 (M) | Cell Signaling | 236B4 | 1:500 | 2 horas/ 27°C |
| eIF4E (P) | Cell Signaling | - | 1:50 | 18 horas/ 4°C |
| c-KIT (P) | DAKO | CD117 | 1:800 | 18 horas/ 4°C |
| Ki-67 (M) | DAKO | MIB-1 | 1:100 | 18 horas/ 4°C |

M = monoclonal e P = policlonal

Para os anticorpos primários p-S6K1, p-4EBP1, eIF4E, c-KIT e Ki-67 utilizou-se o polímero secundário Histofine (Nichirei Biosciences). Já para o anticorpo p-AKT Ser 473 utilizou-se o kit Advance (DAKO) e o complexo Avidina-Biotina-Peroxidase (Vector) para os anticorpos p-AKT Thr 308 e p-mTOR.

Em todas as lâminas utilizou-se o DAB (DAKO), por 5 minutos, como cromógeno. Estas foram contra coradas com Hematoxilina de Harris por 90 segundos, lavadas em água corrente por 10 minutos e, posteriormente, desidratadas, montadas com resina (Tissue-Tek[®]) e observadas em microscópio óptico.

Cortes histológicos de útero de cadela foram utilizados, como controles positivos para as reações de p-AKT Ser 473 e p-AKT Thr 308. Já para as reações de p-mTOR, p-S6K1, p-4EBP1, eIF4E, c-KIT e ki-67 utilizaram-se lâminas de próstata, pulmão, estômago, pâncreas, MCT bem diferenciado e linfonodo de cão, respectivamente. Em todas as baterias de imuno-histoquímica, uma lâmina foi processada como controle negativo, na qual suprimiu-se o anticorpo primário substituindo-o por controle negativo universal de camundongo (DAKO) para os anticorpos monoclonais e controle negativo universal de coelho (DAKO) para os anticorpos policlonais.

A avaliação da reação de imuno-histoquímica foi realizada com o auxílio de um microscópico de luz acoplado à câmera digital e, por meio do programa de análise de imagens Qwin 3.0 (Leica) foram feitas observações quanto ao tipo de marcação (citoplasmática, nuclear, nuclear e citoplasmática), intensidade de marcação (1 - forte, 2 - moderada e 3 - fraca) e distribuição de marcação, por meio de escores (0 = < 5% de células marcadas, 1 = 6 a 25% de células marcadas, 2 = 26 a 50% de células marcadas, 3 = 51 a 75% de células marcadas, 4 = > 75% de células marcadas). Já para a avaliação de Ki-67 foram consideradas áreas com altas concentrações de células positivas, as quais foram contadas em uma gradícula. Nos casos em que não havia regiões com altas concentrações de células positivas contou-se dez campos e foi feita uma média desta contagem. Para a contagem do IM procedeu-se da mesma forma, baseando-se em uma média de dez campos. Para c-KIT, a avaliação foi feita seguindo os critérios propostos por Webster e colaboradores (2007), que determinam um padrão de marcação: KIT I: membranoso, KIT II: citoplasmático

focal e KIT III: citoplasmático difuso. As lâminas foram observadas em objetiva de 40x, sendo os resultados comparados entre os grupos para o mesmo anticorpo. A leitura das lâminas foi realizada por dois observadores, havendo concordância entre os mesmos.

Análise estatística

As associações entre os achados imuno-histoquímicos (escores de marcações, intensidade, localização da marcação, número de células marcadas e padrão de marcação) e os parâmetros histopatológicos nos grupos tumorais foram realizadas pelo Teste do Qui-Quadrado. As curvas de sobrevida foram avaliadas pelo método de Kaplan-Meier e a significância estatística foi determinada pelo teste de log-rank. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos com $P < 0,05$, e o *software* de análise utilizado foi o *Graphpad Prism* versão 5.0.

RESULTADOS

Classificação histopatológica e imunomarcação de KIT e Ki-67

Dos 46 tumores que compuseram este estudo, 14 (30%) foram classificados como alto grau e 32 (70%) foram classificados como baixo grau, segundo a classificação proposta por Kiupel e colaboradores (2011). O tempo médio de sobrevida dos pacientes do grupo alto grau foi de 113 dias. Com relação à classificação proposta por Patnaik e colaboradores (1984), sete (15%), 35 (76%) e quatro (9%) tumores foram classificados como graus III, II e I, respectivamente. Os sete tumores classificados como grau III pertenciam ao grupo alto grau, os demais tumores que compunham este grupo foram classificados como grau II.

Com relação ao IM dos tumores que compuseram o grupo alto grau, apenas dois (14%) apresentaram IM inferior a cinco. Dos tumores que compunham o grupo baixo grau nenhum tumor apresentou IM superior a cinco. A contagem de Ki 67 foi superior a 23 em 13 (93%) tumores do grupo alto grau, e em 2 (6%) dos tumores do grupo baixo grau. As amostras do grupo alto grau foram classificadas em KIT II e III em 14% e 86% dos casos, respectivamente.

Já no grupo baixo grau, 85%, 9% e 6% dos casos foram classificados como KIT I, II e III, respectivamente. Os resultados obtidos estão compilados na Tabela 2 e 3.

Tabela 2. Parâmetros histopatológicos e imuno-histoquímicos dos mastocitomas do grupo de alto grau (KIUPEL et al., 2011). Jaboticabal, 2014.

| Grupo (Kiupel) | Paciente | Classificação de Patnaik | IM | KIT | KI-67 | Sobrevida (dias) |
|-----------------------|-----------------|---------------------------------|-----------|------------|--------------|-------------------------|
| Alto Grau | 1 | III | 9 | III | > 23 | 131 dias |
| Alto Grau | 3 | III | 2 | III | > 23 | 100 dias |
| Alto Grau | 6 | II | 24 | II | > 23 | 14 dias |
| Alto Grau | 19 | III | 17 | III | > 23 | 10 dias |
| Alto Grau | 25 | III | 8 | III | > 23 | 30 dias |
| Alto Grau | 26 | II | 16 | III | > 23 | 21 dias |
| Alto Grau | 27 | III | 11 | III | > 23 | 66 dias |
| Alto Grau | 34 | III | 7 | III | > 23 | 50 dias |
| Alto Grau | 35 | II | 62 | II | > 23 | 103 dias |
| Alto Grau | 44 | II | 12 | III | > 23 | 56 dias |
| Alto Grau | 47 | II | 0 | III | < 23 | Vivo |
| Alto Grau | 48 | II | 22 | III | > 23 | 120 dias |
| Alto Grau | 50 | II | 8 | III | > 23 | 180 dias |
| Alto Grau | 52 | III | 25 | III | > 23 | 45 dias |

Tabela 3. Parâmetros histopatológicos e imuno-histoquímicos dos mastocitomas do grupo de baixo grau (KIUPEL et al., 2011). Jaboticabal, 2014.

| Grupo (Kiupel) | Paciente | Classificação de Patnaik | IM | KIT | KI-67 | Sobrevida (dias) |
|-----------------------|-----------------|---------------------------------|-----------|------------|--------------|-------------------------|
| Baixo Grau | 2 | II | 2 | I | < 23 | Vivo |
| Baixo Grau | 4 | II | 0 | I | < 23 | Vivo |
| Baixo Grau | 5 | II | 2 | I | < 23 | Vivo |
| Baixo Grau | 7 | II | 0 | II | > 23 | Vivo |
| Baixo Grau | 8 | I | 0 | I | < 23 | 256 |
| Baixo Grau | 9 | II | 3 | I | < 23 | Vivo |
| Baixo Grau | 11 | II | 3 | I | < 23 | Vivo |
| Baixo Grau | 13 | II | 3 | I | < 23 | Vivo |
| Baixo Grau | 14 | II | 0 | I | < 23 | 218 |
| Baixo Grau | 15 | II | 2 | I | < 23 | Vivo |
| Baixo Grau | 16 | II | 0 | I | < 23 | Vivo |
| Baixo Grau | 17 | II | 1 | I | < 23 | Vivo |
| Baixo Grau | 18 | II | 3 | I | < 23 | Vivo |
| Baixo Grau | 21 | II | 0 | III | < 23 | Vivo |
| Baixo Grau | 22 | II | 1 | I | < 23 | 370 |

Continua ...

... continuação

| | | | | | | |
|------------|----|----|---|-----|------|------|
| Baixo Grau | 23 | II | 2 | I | < 23 | Vivo |
| Baixo Grau | 28 | II | 2 | I | < 23 | Vivo |
| Baixo Grau | 30 | II | 1 | I | < 23 | Vivo |
| Baixo Grau | 31 | II | 0 | I | < 23 | Vivo |
| Baixo Grau | 32 | II | 2 | I | < 23 | Vivo |
| Baixo Grau | 37 | II | 1 | I | > 23 | Vivo |
| Baixo Grau | 38 | II | 0 | I | < 23 | 287 |
| Baixo Grau | 39 | II | 0 | I | < 23 | 460 |
| Baixo Grau | 40 | II | 0 | I | < 23 | Vivo |
| Baixo Grau | 41 | I | 2 | I | < 23 | Vivo |
| Baixo Grau | 43 | I | 3 | II | < 23 | Vivo |
| Baixo Grau | 45 | II | 0 | I | < 23 | Vivo |
| Baixo Grau | 46 | II | 3 | I | < 23 | 97 |
| Baixo Grau | 51 | I | 0 | I | < 23 | Vivo |
| Baixo Grau | 53 | II | 0 | II | < 23 | Vivo |
| Baixo Grau | 54 | II | 1 | I | < 23 | Vivo |
| Baixo Grau | 55 | II | 0 | III | < 23 | Vivo |

Imunomarcação das proteínas da via PI3K/AKT/mTOR

Proteína p-AKT Ser 473

Em 52% dos casos, o padrão de imunomarcação desta proteína foi citoplasmático e o restante (48%) foi nuclear e citoplasmático. A intensidade de marcação observada para esta proteína, foi forte (24%), moderada (46%) e fraca (30%). Os escores de marcação observados, para este anticorpo, foram 1 (2%), 2 (7%), 3 (15%) e 4 (76%). Para o escore de células marcadas, localização e intensidade de marcação não observou-se diferenças estatísticas, quando comparadas entre os grupos (alto e baixo grau) ($P > 0,05$).

Proteína p-AKT Thr 308

A marcação observada para esta proteína, em 93% dos casos, foi nuclear e citoplasmática, e o restante (7%) apresentou marcação, apenas, citoplasmática. O escore de marcação observado para esta proteína foi de 2 (7%), 3(2%) e 4 (91%). Não observou-se diferença significativa entre a localização de marcação, o escore e os grupos estudados. Entretanto, a intensidade de imunomarcação difere significativamente entre os grupos estudados observou-se ($P=0,0022$) (Tabela 4). Pode-se notar que nos tumores do grupo alto grau, houve uma marcação de maior intensidade (forte) em 71%

dos casos, quando comparado aos tumores do grupo baixo grau, que apresentaram este padrão de marcação em apenas 19% dos casos (Figura 1).

Tabela 4. Resultado da análise de intensidade de marcação da proteína p-AKT Thr 308 nos dois grupos estudados (alto e baixo grau) ($P = 0,0022$). Jaboticabal, 2014.

| Grupos | AKT Thr 308 (intensidade) | | |
|--------|---------------------------|----------|---------|
| | n (%) | | |
| | Fraco | Moderado | Forte |
| Alto | 0 | 4 (29) | 10 (71) |
| Baixo | 3 (9) | 23 (72) | 6 (19) |

Proteína p-mTOR

Em 91% dos casos, a imunomarcação desta proteína foi nuclear e citoplasmática, em 7% foi apenas citoplasmática e em 2% nuclear. O escore de marcação observado, para esta proteína foi 2 (7%), 3 (13%) e 4 (80%). A intensidade mostrou-se forte (22%), moderada (56%) e fraca (22%). Não foi observada diferença significativa do percentual de células marcadas (escore), da localização da marcação, da intensidade de marcação das células entre os grupos estudados ($P > 0,05$).

Proteína p-4EBP1

A imunomarcação desta proteína foi nuclear (2%), citoplasmática (30%), e nuclear e citoplasmática (67%). A intensidade de marcação observada foi forte (2%), moderada (44%) e fraca (54%). Em 19%, 23%, 30% e 28% das amostras observou-se escore de marcação 1, 2, 3 e 4, respectivamente. Não foi observada diferença significativa do percentual de células marcadas (escore), da localização da imunomarcação, da intensidade de marcação das células entre os grupos ($P > 0,05$).

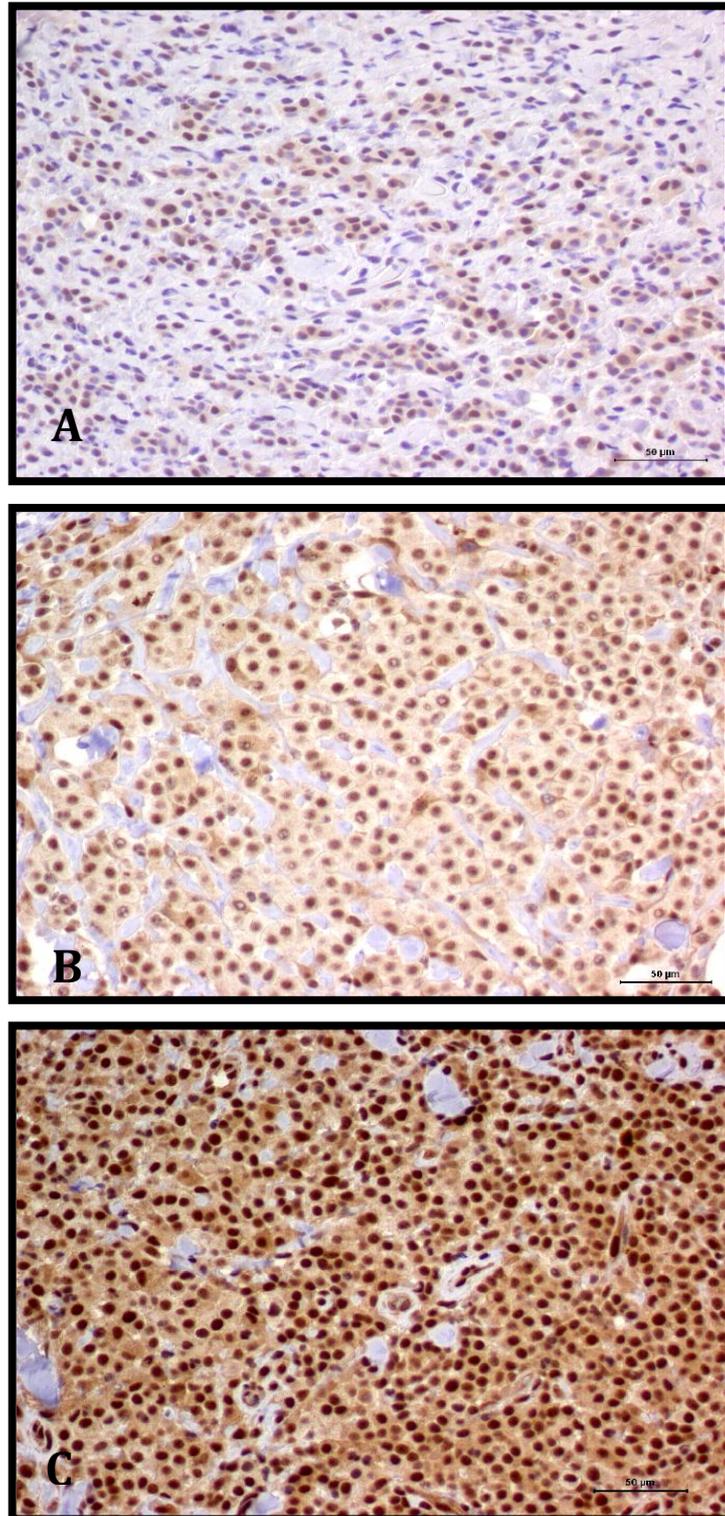


Figura 1. Fotomicrografia mostrando a intensidade e localização da imunomarcagem de p-AKT Thr 308 em MCT caninos. A: MCT com marcação fraca, nuclear e citoplasmática. B: MCT com marcação moderada, nuclear e citoplasmática. C: MCT com marcação forte, nuclear e citoplasmática. Imuno-histoquímica, DAB, contra-coloração Hematoxilina. Barra = 50 µm. Jaboticabal, 2014.

Proteína eIF4e

Em 74% dos casos a marcação desta proteína foi nuclear e citoplasmática e apenas citoplasmática em 26%. Com relação à intensidade de marcação, 24% apresentaram marcação forte, 63% moderada e 13% fraca. Observou-se em 7% das amostras analisadas, escore de marcação 3 e em 93%, escore 4. Não foi observada diferença significativa entre o percentual de células marcada (escore), a localização da marcação e a intensidade de marcação das células e os grupos estudados ($P > 0,05$).

Proteína p-S6K1

Em 87% das amostras analisadas, houve marcação citoplasmática e nuclear, já nas demais amostras, a marcação foi citoplasmática em 9% dos casos e nuclear em 4%. O escore de marcação observado foi de 2 (4%), 3 (16%) e 4 (80%). Não foi observada diferença significativa entre a localização, o escore de marcação e os grupos ($P > 0,05$). Já em relação à intensidade de marcação, observou-se diferença significativa entre os grupos ($P < 0,0001$) (Figura 2). Nota-se que nos tumores do grupo alto grau, houve uma marcação de maior intensidade (forte) em 86% dos casos, quando comparado aos tumores do grupo baixo grau, que apresentaram este padrão de marcação em apenas 9% dos casos (Tabela 5).

Tabela 5. Resultado da análise de intensidade de marcação da proteína p-S6K1 nos dois grupos estudados (alto e baixo grau) ($P < 0,0001$). Jaboticabal, 2014.

| Grupos | S6K1 (intensidade) | | |
|--------|--------------------|----------|---------|
| | Fraco | Moderado | Forte |
| Alto | 0 | 2 (14) | 12 (86) |
| Baixo | 4 (13) | 25 (78) | 3 (9) |

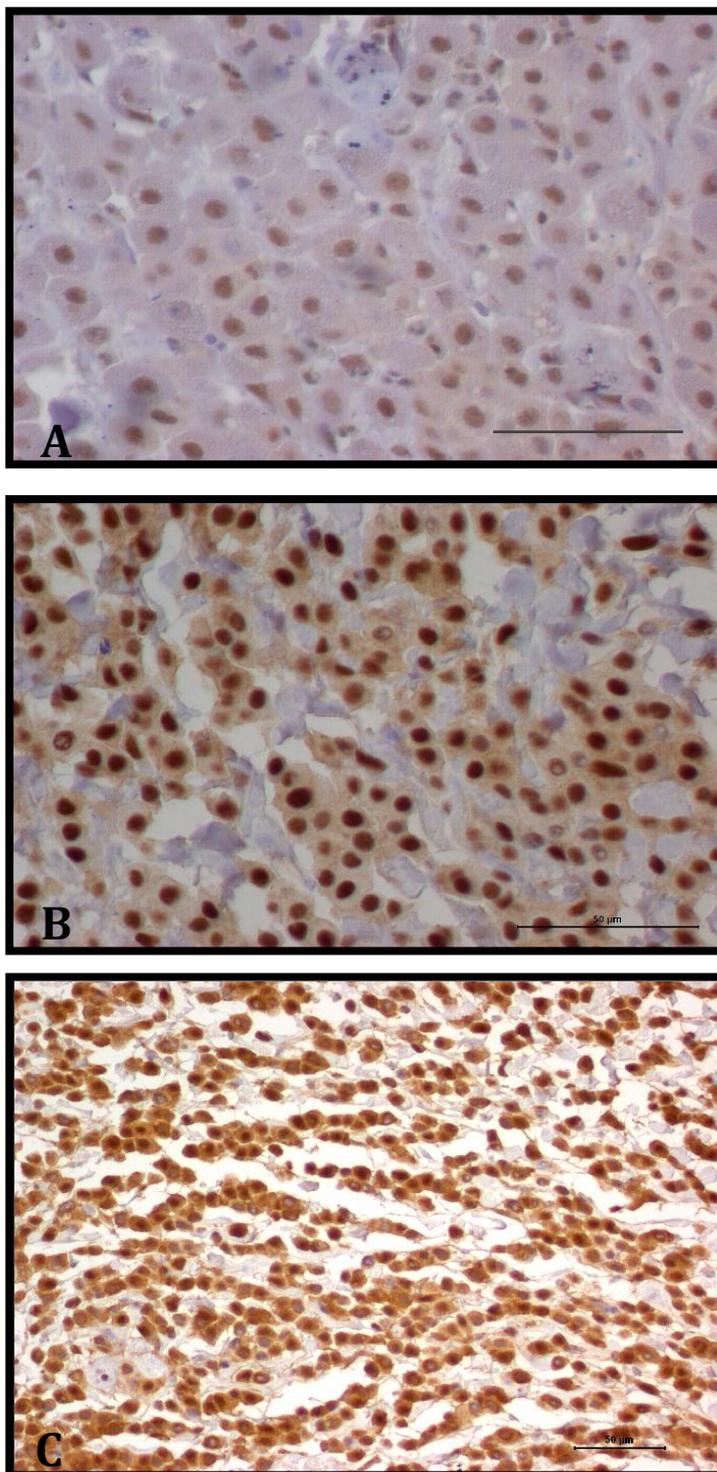


Figura 2. Fotomicrografia mostrando a intensidade e localização da imunomarcagem de p-S6K1 em MCT canino. A: MCT com marcação fraca, nuclear e citoplasmática. B: MCT com marcação moderada, nuclear e citoplasmática. C: MCT com marcação forte, nuclear e citoplasmática. Imuno-histoquímica, DAB, contra-coloração Hematoxilina. Barra = 50 µm. Jaboticabal, 2014.

Associação da imunomarcagem das proteínas da via PI3K/AKT/mTOR com os achados patológicos

Os achados histopatológicos (gradação tumoral segundo Patnaik e colaboradores (1984), Kiupel e colaboradores (2011) e IM) e imuno-histoquímicos (contagem de Ki-67 e padrão de marcação de c-KIT) foram relacionados com a imunomarcagem (intensidade, escore e localização) das proteínas analisadas.

A associação entre os achados histopatológicos (gradação tumoral, IM), imuno-histoquímicos (padrão de imunomarcagem de KIT e contagem de Ki-67) e a avaliação imuno-histoquímica das proteínas p-AKT Ser 473, p-mTOR, p-4EBP1 e eIF4E, em geral, não mostrou-se estatisticamente significativa ($P > 0,05$). Assim como a localização e escore de p-AKT Thr 308 e p-S6K1 também não mostraram associação com os achados histopatológicos e imuno-histoquímicos dos tumores. Entretanto, quando comparou-se os achados patológicos com a intensidade de imunomarcagem de p-AKT Thr 308 (Tabela 6) e p-S6K1 (Tabela 7), pôde-se observar diferenças significativas.

Pôde-se observar associação significativa entre a intensidade de marcação AKT Thr 308 e as variáveis: classificação histopatológica de Kiupel, IM, marcação de c-KIT e contagem de Ki-67. Nota-se que houve uma associação entre a intensidade de marcação forte e os achados patológicos associados a piores prognósticos, como a contagem de IM superior a 5, tumores de alto grau, segundo Kiupel, marcação de c-KIT II e III e contagem de Ki-67 superior a 23. De maneira semelhante, observou-se que a intensidade de marcação, forte, de S6K1, esteve associada a achados patológicos relacionados com tumores mais agressivos. E pôde-se observar que além de associar-se com os achados supracitados para p-AKT Thr 308, a intensidade de marcação de p-S6K1 também mostrou associação significativa quando comparada com a gradação histopatológica segundo o proposto por Patnaik e colaboradores (1984).

Tabela 6. Associação entre a intensidade de imunomarcacão de p-AKT Thr 308 com as variáveis patológicas das amostras de mastocitomas caninos. Jaboticabal, 2014.

| Variáveis | N | AKT Thr (Intensidade) | | | P |
|-----------------------|----|-----------------------|----------|---------|---------|
| | | n (%) | | | |
| | | Fraco | Moderado | Forte | |
| Grau (Patnaik) | | | | | 0,2388 |
| I | 4 | 0 | 3 (75) | 1 (25) | |
| II | 35 | 3 (9) | 22 (63) | 10 (28) | |
| III | 7 | 0 | 2 (29) | 5 (71) | |
| Grau (Kiupel) | | | | | 0,0022* |
| Alto | 14 | 0 | 4 (29) | 10 (71) | |
| Baixo | 32 | 3 (9) | 23 (72) | 6 (19) | |
| IM | | | | | 0,0002* |
| > 5 | 12 | 0 | 2 (17) | 10 (83) | |
| < 5 | 34 | 4 (12) | 24 (70) | 6 (18) | |
| KIT | | | | | 0,0018* |
| I | 27 | 3 (11) | 21 (78) | 3 (11) | |
| II | 5 | 0 | 1 (20) | 4 (80) | |
| III | 14 | 0 | 5 (36) | 9 (64) | |
| Ki67 | | | | | 0,0055* |
| > 23 | 15 | 1 (6) | 4 (27) | 10 (67) | |
| < 23 | 31 | 2 (6) | 23 (74) | 6 (20) | |

Tabela 7. Associação entre a intensidade de imunomarcacão de p-S6K1 com as variáveis patológicas das amostras de mastocitomas caninos. Jaboticabal, 2014.

| Variáveis | N | S6K1 (Intensidade) | | | P |
|-----------------------|----|--------------------|----------|---------|-----------|
| | | n (%) | | | |
| | | Fraco | Moderado | Forte | |
| Grau (Patnaik) | | | | | 0,0126* |
| I | 4 | 0 | 4 (100) | 0 | |
| II | 35 | 4 (11) | 22 (63) | 9 (26) | |
| III | 7 | 0 | 1 (14) | 6 (86) | |
| Grau (Kiupel) | | | | | < 0,0001* |
| Alto | 14 | 0 | 2 (14) | 12 (86) | |
| Baixo | 32 | 4 (13) | 25 (78) | 3 (9) | |

continua ...

... continuação

| | | | | | |
|-------------|----|--------|---------|---------|-----------|
| IM | | | | | < 0,0001* |
| > 5 | 12 | 0 | 1 (8) | 11 (92) | |
| < 5 | 34 | 4 (12) | 26 (76) | 4 (12) | |
| KIT | | | | | 0,0001* |
| I | 27 | 2 (7) | 23 (86) | 2 (7) | |
| II | 5 | 1 (20) | 2 (40) | 2 (40) | |
| III | 14 | 1 (7) | 2 (14) | 11 (79) | |
| Ki67 | | | | | < 0,0001* |
| > 23 | 15 | 0 | 3 (20) | 12 (80) | |
| < 23 | 31 | 4 (13) | 24 (77) | 3 (10) | |

Análise da sobrevida dos pacientes

Os grupos estudados (alto e baixo grau) foram comparados com o tempo de sobrevida dos pacientes e, conforme ilustrado na Figura 3B, nota-se que houve diferença significativa entre o tempo de sobrevida dos pacientes, e os grupos estudados.

O tempo de sobrevida foi também comparado com a classificação histopatológica proposta por Patnaik e colaboradores (1984), com a contagem do IM, Ki-67 e, com a classificação de c-KIT, proposta por Webster e colaboradores (2007). Pode-se observar (Figura 3a e 3b) que todos os parâmetros analisados apresentaram diferenças significativas quando comparados com o tempo de sobrevida dos pacientes deste estudo.

De forma semelhante ao demonstrado anteriormente, a intensidade de marcação de p-AKT Thr 308 e p-S6K1 quando comparadas ao tempo de sobrevida dos pacientes do estudo também apresentaram diferenças significativas (Figura 4).

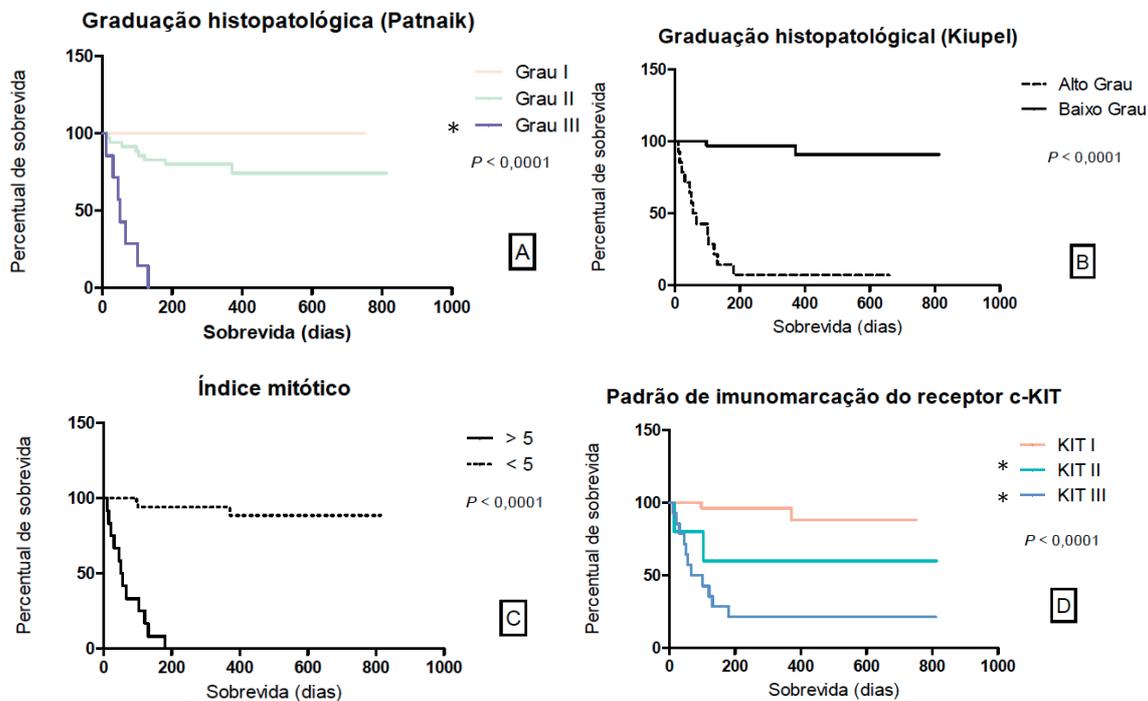


Figura 3a. Avaliação do tempo de sobrevivida dos pacientes em relação aos parâmetros histopatológicos e imuno-histoquímicos. **A.** Comparação com o grau histopatológico, segundo a classificação de Patnaik, que divide os tumores em graus I, II e III. (*) diferença estatisticamente significativa. **B.** Grau histopatológico, segundo a classificação de Kiupel, que divide os tumores em alto e baixo grau. **C.** Comparação entre tumores com índice mitótico superior ou inferior a cinco. **D.** Comparação em relação a classificação do receptor c-KIT (KIT I, II e III). (*) diferença estatisticamente significativa. Jaboticabal, 2014.

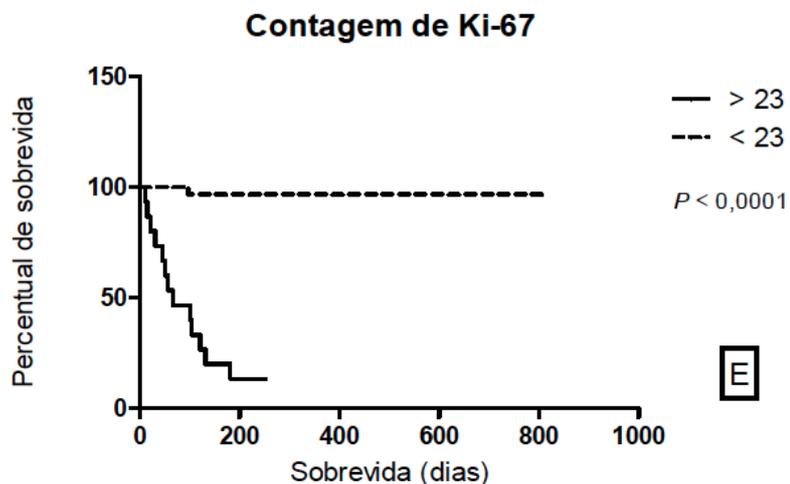


Figura 3b. Avaliação do tempo de sobrevida dos pacientes em relação ao parâmetro imuno-histoquímico. **E.** Ki-67 comparação entre tumores com contagem superior e inferior a 23. Jaboticabal, 2014.

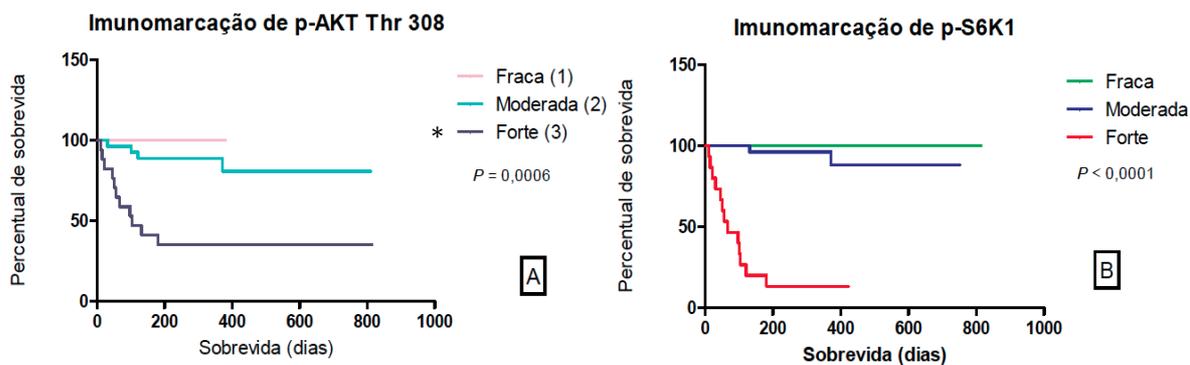


Figura 4. Avaliação do tempo de sobrevida dos pacientes em relação à intensidade de imunomarcção de p-AKT Thr 308 e p-S6K1. **A.** Imunomarcção de p-AKT Thr 308. (*) diferença estatisticamente significativa. **B.** Imunomarcção de p-S6K1. (*) diferença estatisticamente significativa. Jaboticabal, 2014.

DISCUSSÃO

O envolvimento da via da PI3K/AKT/mTOR já foi descrito em diversas neoplasias de cães e gatos, como no osteossarcoma, no carcinoma mamário, no melanoma e no mastocitoma (GORDON et al., 2008; QIU et al., 2008a; QIU et al., 2008b; KENT et al., 2009; PAOLONI et al., 2010; CHEN et al., 2012; MURAI et al., 2012; RODRIGUEZ et al., 2012).

O interesse na avaliação desta via de sinalização vem crescendo pois além de apresentar alvos terapêuticos importantes, alterações na expressão genica ou imunomarcção protéica desta via estão sendo associados ao prognóstico de pacientes com algumas neoplasias como carcinoma pulmonar, urotelial, prostático e mamário (DE BENEDETTI e GRAFF, 2004; KIM et al., 2009; KIM et al., 2011).

Recentemente, Jark e colaboradores (2013) apontaram em sua pesquisa que MCTs associados a piores prognósticos apresentaram regiões de perda no gene PTEN, um supressor tumoral, envolvido em diferentes processos celulares, dentre eles a inibição da ativação de AKT permitindo assim, a progressão desta via de sinalização. Diante disso, avaliou-se a imunomarcção de proteínas da via PI3K/AKT/mTOR com o intuito de determinar novos marcadores prognósticos para o MCT cutâneo em cães. E para tal, os achados imuno-histoquímicos dessas proteínas foram associados aos parâmetros patológicos de MCTs que, sabidamente, estão relacionados a piores prognósticos.

Dentre as características patológicas, classificou-se os tumores segundo as propostas de Kiupel e colaboradores (2011) e Patnaik e colaboradores (1984). Tais autores associam os graus indiferenciados (alto grau e grau III) a um menor tempo de sobrevida dos pacientes, o mesmo foi observado na presente pesquisa, na qual observou-se associação significava entre um menor tempo de sobrevida dos pacientes e tumores classificados com alto grau ($P < 0,0001$) e grau III ($P < 0,0001$). Tais achados corroboram ao descrito pela literatura que recomenda a utilização do grau histológico como um dos fatores prognósticos para o MCT canino (MURPHY et al., 2004; KIUPEL et al., 2005; SFILIGOI et al., 2005; MULLINS et al. 2006; SÉGUIN et al., 2006; THAMM et

al., 2006; PREZIOSI et al., 2007; BLACKWOOD et al., 2012; LONDON e THAMM, 2013).

Outra variável que vem sendo utilizada é a contagem do número de figuras de mitoses, visto que Preziosi e colaboradores (2004) e Romansik e colaboradores (2007) associam tumores com altas contagens desta variável a menores tempos de sobrevida dos paciente, semelhante ao observado no presente estudo no qual observou-se diferença significativa entre o menor tempo de sobrevida dos pacientes e contagens de mitoses superiores a cinco ($P < 0,0001$). Tal ponto de corte foi determinado por Romansik e colaboradores (2007) que viram que pacientes cujos tumores apresentavam contagens superiores a este número apresentavam tempo de sobrevida significativamente inferior quando comparado aos pacientes que apresentavam contagens menores que cinco.

Na oncologia veterinária, particularmente para o mastocitoma cutâneo de cães, o Ki-67, um marcador de proliferação celular, fornece informações valiosas no que tange o prognóstico do paciente (AYL et al., 1992, SIMOES e SCHONING, 1994; ABADIE et al., 1999; SAKAI et al., 2002; SCASE et al., 2006; SÉGUIN et al., 2006; WEBSTER et al., 2007). No presente experimento, observou-se que pacientes cujos tumores apresentavam contagens de Ki-67 superiores a 23 foram associados a um menor tempo de sobrevida dos pacientes ($P < 0,0001$), corroborando ao descrito por Webster e colaboradores (2007) que demonstram que contagens de Ki-67 superiores a 23 estão associadas a menores tempos de sobrevida do paciente.

Com relação a imunomarcção do receptor de membrana c-KIT, pesquisas demonstram que os padrões de marcação citoplasmáticos (KIT II e KIT III) estão associados a piores prognósticos para os pacientes (ABADIE et al., 2005; WEBSTER et al., 2006; WEBSTER et al., 2007). Corroborando ao descrito em literatura, observou-se menor tempo de sobrevida nos pacientes cujos tumores apresentaram padrão de imunomarcção KIT II e KIT III ($P < 0,0001$), em relação aos pacientes cujos tumores apresentaram padrão de imunomarcção KIT I.

Já foi demonstrado que interações de fatores de crescimento com o receptor tirosina quinase c-KIT, são necessárias para a diferenciação, sobrevivência e funcionamento de mastócitos não neoplásicos (LONDON et al.,

1996; TAYLOR e METCALFE, 2000). Segundo Preziosi e colaboradores (2004), a imunomarcção de c-KIT observada em mastocitomas sugere que a expresso de este receptor é mantida pelas células neoplásicas, e que provavelmente uma desregulaçáo funcional deste receptor, resulte nos diferentes padrões de imunomarcção.

Diante disso, é ciente de que a via da PI3K/AKT/mTOR também apresenta um importante papel na sobrevivência, funcionamento e crescimento de mastócitos normais (KIM et al., 2008; MA et al., 2011; SHIN et al., 2012), acredita-se que um mecanismo semelhante ao observado em c-KIT possa ocorrer nesta via, havendo, da mesma forma, uma desregulaçáo funcional ou mutaçáo que esteja envolvida no mastócito neoplásico, justificando assim, sua alta taxa de imunomarcção observada nas amostras da presente pesquisa e também por Rodriguez e colaboradores (2012), que avaliaram a proteína AKT fosforilada em mastocitomas caninos e, observaram que 96% (24/25) dos mastocitomas avaliados apresentaram imunomarcção para esta proteína.

A partir dos resultados da avaliaçáo imuno-histoquímica da proteína p-AKT Ser 473 observou-se que 52% das amostras apresentaram imunomarcção citoplasmática e 48% nuclear e citoplasmática. Rodrigues e colaboradores (2012) observaram imunomarcção citoplasmática para esta proteína nas amostras de MCT avaliadas em seu trabalho. Entretanto, a localizaçáo nuclear e citoplasmática desta proteína já foi descrita por Murai e colaboradores (2012) e pelo The Human Protein Atlas (<http://www.proteinatlas.org/ENSG00000142208/tissue>). A proteína AKT após sua fosforilaçáo nos sítios serina e treonina ativa-se translocando-se para o núcleo, justificando a localizaçáo observada neste experimento.

Não foram observadas diferenças significativas entre os parâmetros patológicos, o tempo de sobrevivência dos pacientes, os grupos estudados (alto e baixo grau) quando estes foram associados com a localizaçáo, intensidade e distribuçáo de imunomarcção de p-AKT Ser 473 ($P > 0,05$).

A proteína p-AKT Thr 308 apresentou imunomarcção nuclear e citoplasmática em 93% das amostras analisadas, semelhante ao descrito por Murai e colaboradores (2012), e tal localizaçáo pode ser justificada pela translocaçáo nuclear de AKT após sua ativaçáo. Não observou-se diferença significativa entre a localizaçáo, a distribuçáo de imunomarcção desta

proteínas, os achados patológicos e os grupos estudados (alto e baixo grau) e o tempo de sobrevida global dos pacientes desta pesquisa ($P>0,05$). Entretanto, observou-se diferença significativa, quando a alta intensidade de imunomarcção de p-AKT Thr 308 foi associada com a graduação histológica, alto grau (KIUPEL et al., 2011) ($P=0,0022$), com contagens de figuras de mitose superiores a 5 ($P=0,0002$), com os padrões de imunomarcção de c-KIT, KIT II e III ($P=0,0018$), com contagens de Ki-67 superiores a 23 ($P=0,0055$) e com o menor tempo de sobrevida global dos pacientes deste experimento ($P=0,0006$). Evidenciando portanto, que a intensidade de imunomarcção desta proteína está associada com achados patológicos relacionados a um pior prognóstico do paciente com MCT cutâneo, corroborando ao descrito por Al-Saad e colaboradores (2009), que observaram associação entre o aumento da intensidade de imunomarcção desta proteína e achados clinicopatológicos de pacientes com carcinoma pulmonar relacionados a piores prognósticos. Neste mesmo trabalho, inclusive, os autores não observaram associação significativa entre a proteína p-AKT Ser 473 e o prognóstico dos pacientes, semelhante ao observado no presente trabalho.

Ratificando o achado deste estudo, a associação de apenas um sítio de fosforilação de AKT com o prognóstico de pacientes oncológicos, já foi descrita por Tsurutani e colaboradores (2006).

Já para as proteínas p-mTOR, p-4EBP1 e eIF4e observou-se que 91%, 67% e 74% das amostras apresentaram imunomarcção nuclear e citoplasmática, respectivamente. Corroborando à localização de imunomarcção de p-mTOR e p-4EBP1 observada por Murai e colaboradores (2012), em amostras de hemangiossarcoma canino, divergindo apenas para a proteína eIF4e. Entretanto, alguns autores explicam que a proteína eIF4e pode ser observada no núcleo e no citoplasma pois acredita-se que assim esta possa auxiliar no transporte nuclear-citoplasmático de determinados RNA mensageiros, todavia ainda não se sabe qual é o mecanismo responsável por manter a proteína no interior da carioteca (RONG et al., 2008).

Não observou-se associação significativa entre os achados imuno-histoquímicos (intensidade, localização e distribuição de imunomarcção) de p-mTOR, p-4EBP1 e eIF4e, e os grupos (alto e baixo grau) e o tempo de

sobrevida dos pacientes deste experimento ($P>0,05$). Achado semelhante foi observado por Fahmy e colaboradores (2013) que ao realizarem a associação entre os parâmetros clínico patológicos de 142 pacientes com carcinomas uroteliais e o padrão de imunomarcção de p-mTOR e p-4EBP1 não observaram diferenças significativas. Todavia, a proteína eIF4e já foi descrita como um marcador prognóstico para diversas neoplasias humanas como tumores mamários, carcinomas prostáticos e de bexiga (De BENEDETTI e GRAFF, 2004), divergindo do observado no presente trabalho, no qual não foram encontradas associações significativas entre os parâmetros patológicos das amostras de MCT cutâneo e os achados imuno-histoquímicos desta proteína ($P>0,05$).

Em contrapartida, pôde-se notar associação significativa entre a alta intensidade de imunomarcção (forte) de p-S6K1 e os parâmetros patológicos relacionados a piores prognósticos, tais como grau III (PATNAIK et al., 1984) ($P=0,0126$), alto grau (KIUPEL et al., 2011) ($P<0,0001$), contagens do número de figuras de mitoses superiores a 5 ($P<0,0001$), padrão de imunomarcção KIT II e III ($P=0,0001$), contagem de Ki-67 superior a 23 ($P<0,0001$), e o menor tempo de sobrevida dos pacientes deste estudo ($P<0,0001$). Corroborando com o observado nos trabalhos de Kim e colaboradores (2009 e 2011), Fahmy e colaboradores (2013) que relataram associação significativa entre a alta intensidade de imunomarcção desta proteína e parâmetros clínicos e/ou clínico patológicos de pacientes com carcinomas uroteliais e mamários, sugerindo portanto a importância desta proteína como um fator prognóstico para o MCT cutâneo de cães.

A localização da imunomarcção de S6K1 nas amostras de MCT cutâneo foi nuclear e citoplasmática (87%), discordando do descrito por Ettl e colaboradores (2012). Todavia, segundo Ruvinsky e Meyuhas (2006) e Shaw (2008) mTOR fosforila S6K1 em seu sítio treonina 389, ativando assim a proteína S6K1 de 70 kDa, e esta localiza-se em núcleo e citoplasma (ROSENER e HENGSTSCGLAGER, 2011), justificando assim o observado no presente experimento. Quando confrontou-se a localização, a porcentagem de células imunomarcadas e os achados patológicos e o tempo de sobrevida dos pacientes deste trabalho não foram observadas associações significativas ($P>0,05$).

Observou-se, no presente trabalho, associações significativas entre a alta intensidade de imunomarcacão de p-AKT Thr 308 e p-S6K1 e parâmetros patológicos sabidamente relacionados a piores prognósticos. O aumento da intensidade de imunomarcacão destas proteínas pode estar associado com amplificacões ocorridas nos oncogenes que codificam estas proteínas. Situacão semelhante já está bem documentada para o gene c-erb B2 em tumores mamários na mulher (TÊTU e BRISSON, 1994).

CONCLUSÃO

Ao final deste estudo pôde-se concluir que as proteínas fosforiladas AKT Thr 308 e S6K1 podem ser utilizadas em painéis prognósticos para o MCT cutâneo de cães, visto que observou-se associações significativas entre parâmetros relacionados a piores prognósticos e o aumento da intensidade de imunomarcacão destas proteínas.

REFERÊNCIAS

ABADIE, J.; AMARDEILH, M.; DELVERDIER, M. Immunohistochemical detection of proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 in mast cell tumors from dogs. **Journal of American Veterinary Medicine Association**, v. 215, n. 11, p. 1629-34, 1999.

ABADIE, J.; CHRISTOPHE, J.; DELVERDIER, M.; CADIERGUES, M. C.; WYERS, M. Immunohistochemical detection of the oncoprotein KIT as a prognostic marker in canine and feline mast cell tumor. **23rd Meeting of the European Society of Veterinary Pathology**, Padova, Italy, 2005.

AL-SAAD, S.; DONNEM, T.; AL-SHIBLI, K.; PERSSON, M.; BREMNES, R. M.; BUSUND, L. Diverse prognostic roles of Akt isoforms, PTEN and PI3K in tumor epithelial cells and stromal compartment in non-small cell lung cancer. **Anticancer Research**, v. 29, p. 4175-4184, 2009.

AYL, R.; COUTO, C.; HAMMER, A.; WEISBRODE, S.; ERICSON, J.; MATHES, L. Correlation of DNA ploidy to histologic grade, clinical variables, and survival in dogs with mast cell tumors. **Veterinary Pathology**, v. 29, p. 386-90, 1992.

BLACKWOOD, L.; MURPHY, S.; BURACCO, P.; DE VOS, J. P.; DE FORNELTHIBAUD, P.; HIRSCHBERGER, J.; KESSLER, M.; PASTOR, J.; PONCE, F.; SAVARY-BATAILLE, K.; ARGYLE, D. J. European consensus document on mast cell tumours in dogs and cats. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 10, p. e1-e29, 2012.

CHEN, Y.; TAN, K. A.; PANG, L. Y. ARGYLE, D. J. The class I PI3K/Akt pathway is critical for cancer cell survival in dogs and offers an opportunity for therapeutic intervention. **BMC Veterinary Research**, v. 8, n. 73, p. 1-15, 2012.

CICENAS, J.; URBAN, P.; VUAROQUEAUX, V.; LABUHN, M.; KUNG, W.; WIGHT, E.; MAYHEW, M.; EPPENBERGER, U.; EPPENBERGER-CASTORI, S. Increased level of phosphorylated akt measured by chemiluminescence-linked immunosorbent assay is a predictor of poor prognosis in primary breast cancer overexpressing ErbB-2. **Breast Cancer Research**, v. 7, p. R394-R401, 2005.

DE BENEDETTI A.; GRAFF, J. R. eIF-4E expression and its role in malignances and metástases. **Oncogene**, v. 23, p. 3189-3199, 2004.

ETTL, T.; SCHWARZ-FURLAN, S.; HAUBNER, F.; MÜLLER, S.; ZENK, J.; GOSAU, M.; REICHERT, T. E.; ZEITLER, K. The PI3K/AKT/mTOR signalling pathway is active in salivary gland cancer and implies different functions and prognoses depending on cell localization. **Oral Oncology**, v. 48, n. 9, p. 822-30, 2012.

FAHMY, M.; MANSURE, J. J.; BRIMO, F.; YAFI, F. A.; SEGAL, R.; ALTHUNAYAN, A.; HICKS, J.; MEEKER, A.; NETTO, G.; KASSOUF, W.

Relevance of the mammalian target of rapamycin pathway in the prognosis of patients with high-risk non-muscle invasive bladder cancer. **Human Pathology**, v. 44, n.9, p. 1766-72, 2013.

GOLDSCHMIDT, M.H.; HENDRICK, M.J. Tumors of the skin and soft tissues. In: MEUTEN, D.J. **Tumors in Domestic Animals**, 4.ed. Ames: Iowa State, Cap.3, p.105-109, 2002.

GORDON, I. K.; YE, F.; KENT, M. S. Evaluation of the mammalian target of rapamycin pathway and the effect of rapamycin on target expression and cellular proliferation in osteosarcoma cells from dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 69, n. 8, p. 1079-1084, 2008.

GROSS, T. L.; IHRKE, P.; WALDER, E. J.; AFFOLTER, V. K. Mast cell tumors. In: **Skin Diseases of the Dog and Cat: Clinical and Histopathological Diagnosis**. GROSS T. L.; WALDER, E. J.; AFFOLTER, V. K. Oxford: Blackwell Science Ltd: 853-65, 2005.

HIDESHIMA, T.; CATLEY, L.; RAJE, N.; CHAUHAN, D.; PODAR, K.; MITSIADES, C.; TAI, Y. T.; VALLET, S.; KIZILTEPE, T.; OCIO, E.; IKEDA, H.; OKAWA, Y.; HIDESHIMA, H.; MUNSHI, N. C.; YASUI, H.; RICHARDSON, P. G; ANDERSON, K. C. Inhibition of Akt induces significant downregulation of survivin and cytotoxicity in human multiple myeloma cells. **British Journal of Haematology**, v. 138, p. 783-791, 2007.

JARK, P. C. **Alterações no número de cópias genômicas em mastocitomas cutâneos caninos**. 2013. 51 f. Dissertação (Mestrado em Clínica Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2013.

KENT, M. S.; COLLINS, C. J.; YE, F. Activation of the AKT and mammalian target of rapamycin pathways and the inhibitory effects of rapamycin on those

pathways in canine malignant melanoma cell lines. **American Journal of Veterinary Research**, v. 70, p. 263-269, 2009.

KIM, D.; AKCAKANAT, A.; SINGH, G.; SHARMA, C.; MERIC-BERNSTAM, F. Regulation and localization of ribosomal protein S6 kinase 1 isoforms. **Growth Factors**, v.1, p. 12-21, 2009.

KIM, E. K.; KIM, H. A.; KOH, J. S.; KIM, M. S.; KIM, K. I.; LEE, J. I.; MOON, N. M.; KO, E.; NOH, W. C. Phosphorylated S6K1 is a possible marker for endocrine therapy resistance in hormone receptor-positive breast cancer. **Breast Cancer Research Treatment**, v.126, n.1, p. 93 - 99, 2011.

KIM, M. S.; RADINGER, M.; GILFILLAN, M. The multiple roles of phosphoinositide 3-kinase in mast cell biology. **Trends in Immunology**. v. 29, p. 493–501, 2008.

KIUPEL, M.; WEBSTER, J. D.; MILLER, R. A.; KANEENE, J. B. Impact of tumour depth, tumour location and multiple synchronous masses on the prognosis of canine cutaneous mast cell tumours. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 52, p. 280–86, 2005.

KIUPEL, M.; WEBSTER, J. D.; BAILEY, K. L.; BEST, S.; DELAY, J.; DETRISAC, C. J.; 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, n. 1, p. 147-155, 2011.

LONDON, C.; KISSEBERTH, W.; GALLI, S.; GEISLER, E.; HELFAND, S. Expression of stem cell factor receptor (c-kit) by the malignant mast cells from spontaneous canine mast cell tumours. **Journal of Comparative Pathology**, v. 115, p. 399-414, 1996.

LONDON, C. A.; THAMM, D. H. Mast cell tumors. In: WITHROW e MacEWEN'S. **Small Animal Oncology**, 5.ed. China: Saunders Elsevier, Cap. 20, p. 335-355, 2013.

MA, P.; MALI, R. S.; MUNUGALAVADLA, V.; KRISHNAN, S.; RAMDAS, B.; SIMS, E.; MARTIN, H.; GHOSH, J.; LI, S.; CHAN, R. J.; KRYSTAL, G.; CRAIG, A. W.; TAKEMOTO; KAPUR, R. The PI3K pathway drives the maturation of mast cells via microphthalmia transcription factor. **Blood**, v. 118, p. 3459–3469, 2011.

McAULIFFE, P. F.; MERIC-BERNSTAM, F.; MILLS, G. B.; GANZALEZ-ANGULO, A. M. Deciphering the role of PI3K/AKT/mTOR pathway in breast cancer biology and pathogenesis. **Clinical Breast Cancer**, v. 10, p. S59-S65, 2010.

MERIC-BERNSTAM, F.; GONZALEZ-ANGULO, A. M. Targeting the mTOR signaling network for cancer therapy. **Journal of Clinical Oncology**, v. 27, p. 2278-87, 2009.

MULLINS, M.; DERNELL, W.; WITHROW, S.; EHRHART, E.; THAMM, D.; LANA, S. Evaluation of prognostic factors associated with outcome in dogs with multiple cutaneous mast cell tumors treated with surgery with and without adjuvant treatment: 54 cases (1998-2004). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 228, n.1, p. 91-95, 2006.

MURAI, A.; ABOU ASA, S.; KODAMA, A.; SAKAI, H.; HIRATA, A.; YANAI, T. Immunohistochemical analysis of the AKT/mTOR/4E-BP1 signalling pathway in canine haemangiomas and haemangiosarcomas. **Journal of Comparative Pathology**, v. 147, n. 4, p. 1-11, 2012.

MURPHY, S.; SPARKES, A.; SMITH, K.; BLUNDEN, A.; BREARLEY, M. Relationships between the histological grade of cutaneous mast cell tumours in dogs, their survival and the efficacy of surgical resection. **Veterinary Record**, v. 154, p. 743-46, 2004.

NORTHRUP, N.; HARMON, B.; GIEGER, T.; BROWN, C.; CARMICHEL, K.; GARCIA, A.; LATIMER, K.; MUNDAY, J.; RAKICH, P.; RICHEY, L.; STEDMAN,

N.; HOWERTH, E. Variation among pathologists in histologic grading of canine cutaneous mast cell tumors. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 17, p. 245-48, 2005.

PAOLONI, M. C.; MAZCKO, C.; FOX, E.; FAN, T.; LANA, S.; KISSEBERTH, W.; VAIL, D. M.; NUCKOLLS, K.; OSBORNE, T.; YALKOWSY, S. GUSTAFSON, D.; YU, Y.; CAO, L.; KHANNA, C. Rapamycin pharmacokinetic and pharmacodynamic relationships in osteosarcoma: A comparative oncology study in dogs. **Plos One**, v. 4, n. 6, p. 1-10, 2010.

PATNAIK, A.; EHLER, W.; MACEWEN, E. Canine cutaneous mast cell tumor: morphologic grading and survival times in 83 dogs; **Veterinary Pathology**, v.21, p.469–474, 1984.

PINCZOWSKI, P.; TORRES NETO, R.; FABRIS, V. E.; AMORIM, R. L. Mastocitoma cutâneo canino: variação entre observadores na graduação histopatológica. **Clínica Veterinária**, n. 77, p. 76-78, 2008.

PREZIOSI, R.; MORINI, M.; SARLI, G. Expression of the KIT protein (CD117) in primary cutaneous mast cell tumors of the dog. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 16, p. 554-61, 2004.

PREZIOSI, R.; SARLI, G.; PALTRINIERI, M. Multivariate Survival Analysis of Histological Parameters and Clinical Presentation in Canine Cutaneous Mast Cell Tumours. **Veterinary Research Communications**, v. 31, p. 287-96, 2007.

QIU, C. W.; LIN, D. G.; WANG, J. Q.; WANG, L. Expression and significance of PTEN in canine mammary gland tumours. **Research in Veterinary Science**, n. 85, p. 383-388, 2008a.

QIU, C. W.; LIN, D. G.; WANG, J. Q.; LI, C. Y.; DENG, G. Z. Expression and significance of PTEN and VEGF in canine mammary gland tumours. **Veterinary Research Communications**, n. 32, p. 463-472, 2008b.

RODRIGUEZ, S.; FADLALLA, K.; GRAHAM, T.; TAMERU, B.; FERMIN, C. D.;

SAMUEL, T. Immunohistochemical evaluation of AKT protein activation in canine mast cell tumours. **Journal of Comparative Pathology**, v. 147, n. 2-3, p. 171-176, 2012.

ROMANSIK, E.; REILLY, C.; KASS, P.; MOORE, P.; LONDON, C. Mitotic index is predictive for survival for canine cutaneous mast cell tumors. **Veterinary Pathology**, v. 44, p. 335-41, 2007.

RONG, L.; LIVINGSTONE, M.; SUKARIEH, R.; PETROULAKIS, E.; GINGRAS, A. C.; CROSBY, K.; SMITH, B.; POLAKIEWICZ, R. D.; PELLETIER, J.; FERRAIUOLO, M. A.; SONENBERG, N. Control of eIF4E cellular localization by eIF4E-binding proteins, 4E-BPs. **RNA**, v. 14, n. 7, p.1318-27, 2008.

ROSNER, M.; HENGSTSCHLÄGER, M. Nucleocytoplasmic localization of p70 S6K1, but not of its isoforms p85 and p31, is regulated by TSC2/mTOR. **Oncogene**, v. 30, n.44, p.4509-22, 2011.

RUVINSKY, I.; MEYUHAS, O. Ribosomal protein S6 phosphorylation: from protein synthesis to cell size. **Trends Biochemistry Science**, v. 31, p. 342–346, 2006.

SAKAI, H.; NODA, A.; SHIRAI, N.; IIKADA, T.; YANAI, T.; MASEGI, T. Proliferative Activity of Canine Mast Cell Tumours Evaluated by Bromodeoxyuridine Incorporation and Ki-67 Expression. **Journal of Comparative Pathology**, v. 127, p. 233-38, 2002.

SÉGUIN, B.; BESACON, M.; MCCALLAN, J.; DEWE, L.; TENWOLDE, M.; WONG, E.; KENT, M. Recurrence Rate, Clinical Outcome, and Cellular Proliferation Indices as Prognostic Indicators after Incomplete Surgical Excision of Cutaneous Grade II Mast Cell Tumors: 28 Dogs (1994-2002). **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 20, p. 933-40, 2006.

SCASE, T.J.; EDWARDS, D.; MILLER, J.; HENLEY, W.; SMITH, K.; BLUNDEN, A.; MURPHY, S. 2006. Canine mast cell tumors: correlation of

apoptosis and proliferation markers with prognosis. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 20, p.151-158, 2006.

SFILIGOI, G.; RASSNICK, K.; SCARLETT, J.; NORTHRUP, N.; GIEGER, T. Outcome of dogs with mast cell tumors in the inguinal or perineal region versus other cutaneous locations: 124 cases (1990-2001). **Journal of American Veterinary Medicine Association**, v. 226, n. 8, p.1368-74, 2005.

SHIN, J.; PAN, H.; ZHONG, X. P. Regulation of mast cell survival and function by tuberous sclerosis complex 1. **Blood**, v. 119, p. 3306–3314, 2012.

SHAW, R. J. mTOR signaling: RAG GTPases transmit the amino acid signal. **Trends Biochemistry Science**, v. 33, p. 565–568, 2008.

SIMÕES, J.; SCHONING, P. Canine mast cell tumors: a comparison of staining techniques. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 6, p. 458-65, 1994.

STREFEZZI, R.; XAVIER, J.; CATÃO-DIAS, J. Morphometry of Canine Cutaneous mast Cell Tumors. **Veterinary Pathology**, v. 40, p. 268-75, 2003.

STREFEZZI, R. F; KLEEB, S.R; XAVIER, J.G; DIAS, J.L.C. Prognostic indicators for mast cell tumours. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, v. 2, n. 2, p. 110-121, 2009.

STREFEZZI, R. F; KLEEB, S. R; XAVIER, J. G; DIAS, J. L. C. Avaliação da proliferação celular como indicador prognóstico para mastocitomas cutâneos caninos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 7, p. 559-565, 2010.

TAYLOR, M. L.; METCALFE, D. D. Kit signal transduction. **Hematology/Oncology clinics of North American**, v. 14, p. 517-535, 2000.

TÊTU, B.; BRISSON, J. Prognostic significance of her-2/neu oncoprotein expression in node-positive breast cancer: the influence of the pattern of immunostaining and adjuvant therapy. **Cancer**, v. 73, p. 2359-65, 1994.

THAMM, D.; TUREK, M.; VAIL, D. Outcome and Prognostic Factors Following Adjuvant Prednisone/Vinblastine Chemotherapy for High-Risk Canine Mast Cell Tumour: 61 Cases. **Journal of Veterinary Medicine Science**, v. 68, n. 6, p. 581-87, 2006.

TSURUTANI, J.; FUKUOKA, J.; TSURUTANI, H.; SHIH, J. H.; HEWITT, S. M.; TRAVIS, W. D.; JEN, J.; DENNIS, P. A. Evaluation of two phosphorylation sites improves the prognostic significance of Akt activation in non-small cell lung cancer tumors. **Journal of Clinical Oncology**, v. 24, p. 306-314, 2006.

WEBSTER, J. D.; KIUPEL, M.; YUZBASIYAN-GURKAN, V. Evaluation of the kinase domain of c-KIT in canine cutaneous mast cell tumors. **BMC Cancer**, v. 6, p. 85, 2006.

WEBSTER, J. D.; YUZBASIYAN-GURKAN, V.; MILLER, R. A.; KANEENE, J. B.; KIUPEL, M. Cellular Proliferation in Canine Cutaneous Mast Cell Tumors: Associations with c-KIT and Its Role in Prognostication. **Veterinary Pathology**, v. 44, p. 298–308, 2007.

ZEMKE, D.; YAMINI, B.; YUZBASYAN-GURKAN, V. Mutations in the Juxtamembrane Domain of c-kit are Associated with Higher Grade Mast Cell Tumors in Dogs. **Veterinary Pathology**, v. 39, n. 5, p. 529-35, 2002.

APÊNDICE 1

Tabela 1. Estadiamento clínico do mastocitoma canino segundo o Canine Mast Cell Disease. 1º Encontro Mundial de Oncologia Veterinária – ESVONC/VCS, Copenhagen, 2008. Jaboticabal, 2014.

| Estádio | Tumor | Linfonodo Regional | Metástase |
|----------------|--|---------------------------|------------------|
| I | Único, <3cm, bem circunscrito | - | - |
| II | +1 nódulo, <3cm, c/ distância interlesional >10cm, bem circunscrito | - | - |
| III | 1 ou +, >3cm, c/ distância interlesional <10cm, mal circunscrito ou ulcerado | - | - |
| IV | Qualquer tipo lesional | + | - |
| V | Qualquer tipo lesional | - ou + | + |

Sufixos a: sem sinais sistêmicos, b: com sinais sistêmicos

Tabela 2. Dados clínicos dos pacientes com mastocitoma cutâneo, grupo com SV \leq 6 meses. Jaboticabal, 2014.

| PACIENTE | RAÇA | SEXO | IDADE | LOCALIZAÇÃO | ULCERAÇÃO | CONSISTÊNCIA | NÓDULOS | TAMANHO |
|----------|-----------------|------|---------|-------------------------------|-----------|--------------|-----------|---------|
| 1 | Boxer | M | 10 anos | Cabeça e pescoço | Sim | Macio | Múltiplos | > 3 cm |
| 3 | Rottweiler | F | 10 anos | Abdominal, inguinal, perineal | Não | Macio | 1 | > 3 cm |
| 6 | Fox Paulistinha | M | 6 anos | Abdominal, inguinal, perineal | Não | Firme | 1 | > 3 cm |
| 19 | Pinscher | M | 10 anos | Cabeça e pescoço | Sim | Macio | Múltiplos | > 3 cm |
| 25 | SRD | M | 5 anos | Abdominal, inguinal, perineal | Sim | Firme | Múltiplos | > 3 cm |
| 26 | Pinscher | M | 8 anos | Abdominal, inguinal, perineal | Sim | Firme | 1 | > 3 cm |
| 27 | Pit Bull | M | 8 anos | Membro pélvico/ torácico | Sim | Firme | 1 | > 3 cm |
| 34 | Sharpei | M | 11 anos | Membro pélvico/ torácico | Não | Macio | Múltiplos | > 3 cm |
| 35 | SRD | F | 13 anos | Cabeça e pescoço | Não | Firme | 1 | > 3 cm |
| 44 | Pit Bull | F | 5 anos | Abdominal, inguinal, perineal | Sim | Firme | Múltiplos | > 3 cm |
| 46 | Labrador | M | 13 anos | Tórax | Sim | Firme | 1 | > 3 cm |
| 48 | Pinscher | F | 7 anos | Membro pélvico/ torácico | Não | Macio | 1 | > 3 cm |
| 50 | Fox Paulistinha | F | 7 anos | Cabeça e pescoço | Não | Firme | Múltiplos | < 3 cm |
| 52 | Dachshund | F | 13 anos | Cabeça e pescoço | Não | Firme | 1 | > 3 cm |

F: Fêmea; M: Macho

Tabela 3. Dados clínicos dos pacientes com mastocitoma cutâneo, grupo com SV \leq 6 meses. Jaboticabal, 2014.

| PACIENTE | LINFONODO | METÁSTASE | ESTADIO | TEMPO DE EVOLUÇÃO | RECIDIVA | SOBREVIDA (DIAS) | VELOCIDADE DE CRESCIMENTO |
|----------|-----------|-----------|---------|-------------------|----------|------------------|---------------------------|
| 1 | N1 | M0 | IV | Até 1 ano | Sim | 131 dias | Rápido |
| 3 | N1 | M0 | IV | Até 1 ano | Sim | 100 dias | Rápido |
| 6 | N1 | M0 | IV | Até 1 ano | Não | 14 dias | Rápido |
| 19 | N1 | M0 | IV | Até 1 ano | Sim | 10 dias | Rápido |
| 25 | N1 | M1 | V | Até 1 ano | Não | 30 dias | Rápido |
| 26 | N1 | M0 | IV | Até 1 ano | Sim | 21 dias | Rápido |
| 27 | N1 | M0 | IV | Até 1 ano | Não | 66 dias | Rápido |
| 34 | N1 | M1 | V | Até 1 ano | Não | 50 dias | Rápido |
| 35 | N1 | M0 | IV | Até 1 ano | Não | 103 dias | Rápido |
| 44 | N1 | M1 | V | Até 1 ano | Não | 56 dias | Rápido |
| 46 | N0 | M1 | V | Até 1 ano | Sim | 97 dias | Rápido |
| 48 | N1 | M0 | V | Até 1 ano | Sim | 120 dias | Rápido |
| 50 | N1 | M0 | IV | Até 1 ano | Não | 180 dias | Rápido |
| 52 | N1 | M0 | IV | Até 1 ano | Não | 45 dias | Rápido |

N1: presença de metástases em linfonodos regionais; N0: ausência de metástases em linfonodos regionais; M1: presença de metástases à distância, M0: ausência de metástases à distância

Tabela 4. Dados clínicos dos pacientes com mastocitoma cutâneo, grupo com SV > 6 meses. Jaboticabal, 2014.

| PACIENTE | RAÇA | SEXO | IDADE | LOCALIZAÇÃO | ULCERAÇÃO | CONSISTÊNCIA | NÓDULOS | TAMANHO |
|----------|-----------------|------|---------|-------------------------------|-----------|--------------|-----------|---------|
| 2 | Boxer | M | 8 anos | Tórax | Não | Firme | 1 | < 3 cm |
| 4 | Labrador | F | 7 anos | Abdominal, inguinal, perineal | Não | Macio | 1 | > 3 cm |
| 5 | SRD | M | 8 anos | Membro pélvico/ torácico | Não | Macio | Múltiplos | < 3 cm |
| 7 | Pit Bull | F | 6 anos | Abdominal, inguinal, perineal | Não | Macio | Múltiplos | < 3 cm |
| 8 | Pit Bull | F | 8 anos | Tórax | Não | Macio | 1 | < 3 cm |
| 9 | Boxer | F | 6 anos | Tórax | Não | Macio | 1 | < 3 cm |
| 11 | SRD | F | 6 anos | Cabeça e pescoço | Não | Firme | Múltiplos | < 3 cm |
| 13 | Basset Hound | M | 8 anos | Tórax | Não | Firme | 1 | < 3 cm |
| 14 | SRD | M | 8 anos | Membro pélvico/ torácico | Não | Macio | 1 | > 3 cm |
| 15 | Dachshund | F | 11 anos | Abdominal, inguinal, perineal | Não | Firme | 1 | < 3 cm |
| 16 | Boxer | F | 7 anos | Membro pélvico/ torácico | Não | Macio | 1 | < 3 cm |
| 17 | SRD | M | 6 anos | Tórax | Sim | Macio | 1 | > 3 cm |
| 18 | Pit Bull | F | 10 anos | Membro pélvico/ torácico | Não | Macio | 1 | > 3 cm |
| 21 | Boxer | F | 6 anos | Membro pélvico/ torácico | Não | Macio | Múltiplos | < 3 cm |
| 22 | Staffordshire | M | 9 anos | Tórax | Não | Firme | Múltiplos | > 3 cm |
| 23 | Bulldog francês | M | 10 anos | Abdominal, inguinal, perineal | Não | Macio | 1 | < 3 cm |
| 28 | Pug | F | 8 anos | Abdominal, inguinal, perineal | Não | Macio | Múltiplos | < 3 cm |
| 30 | Pit Bull | M | 7 anos | Membro pélvico/ torácico | Não | Firme | 1 | < 3 cm |
| 31 | SRD | F | 8 anos | Abdominal, inguinal, perineal | Não | Macio | 1 | < 3 cm |
| 32 | SRD | F | 10 anos | Tórax | Não | Macio | 1 | < 3 cm |
| 37 | SRD | M | 10 anos | Tórax | Não | Macio | Múltiplos | < 3 cm |
| 38 | Fila Brasileiro | F | 9 anos | Abdominal, inguinal, perineal | Sim | Macio | 1 | > 3 cm |
| 39 | Poodle | F | 12 anos | Abdominal, inguinal, perineal | Não | Macio | 1 | < 3 cm |
| 40 | Pit Bull | F | 4 anos | Membro pélvico/ torácico | Sim | Macio | 1 | < 3 cm |

Continua ...

... continuação

| | | | | | | | | |
|----|----------------|---|---------|-------------------------------|-----|-------|-----------|--------|
| 41 | Boxer | M | 7 anos | Membro pélvico/ torácico | Não | Macio | 1 | > 3 cm |
| 43 | SRD | M | 11 anos | Abdominal, inguinal, perineal | Não | Macio | 1 | < 3 cm |
| 45 | SRD | M | 5 anos | Membro pélvico/ torácico | Não | Macio | Múltiplos | < 3 cm |
| 47 | Boxer | F | 6 anos | Tórax | Sim | Macio | 1 | > 3 cm |
| 51 | Dogo Argentino | F | 6 anos | Cabeça e pescoço | Não | Firme | 1 | < 3 cm |
| 53 | Boxer | F | 5 anos | Membro pélvico/ torácico | Sim | Firme | 1 | > 3 cm |
| 54 | Pit Bull | F | 10 anos | Abdominal, inguinal, perineal | Não | Firme | 1 | < 3 cm |
| 55 | SRD | F | 8 anos | Tórax | Sim | Firme | 1 | < 3 cm |

F: Fêmea; M: macho

Tabela 5. Dados clínicos dos pacientes com mastocitoma cutâneo, grupo com SV > 6 meses. Jaboticabal, 2014.

| PACIENTE | LINFONODO | METÁSTASE | ESTADIO | TEMPO DE EVOLUÇÃO | RECIDIVA | SOBREVIDA (DIAS) | VELOCIDADE DE CRESCIMENTO |
|----------|-----------|-----------|---------|-------------------|----------|------------------|---------------------------|
| 2 | NO | MO | I | 2 a 3 anos | Sim | Vivo | Lento |
| 4 | NO | MO | III | Até 1 ano | Não | Vivo | Rápido |
| 5 | NO | MO | II | Até 1 ano | Não | Vivo | Lento |
| 7 | NO | MO | II | Até 1 ano | Sim | Vivo | Lento |
| 8 | NO | MO | I | Até 1 ano | Não | 256 | Lento |
| 9 | NO | MO | I | Até 1 ano | Não | Vivo | Lento |
| 11 | NO | MO | II | Até 1 ano | Sim | Vivo | Lento |
| 13 | NO | MO | I | Até 1 ano | Não | Vivo | Lento |
| 14 | NO | MO | III | Até 1 ano | Não | 218 | Lento |
| 15 | NO | MO | I | Até 1 ano | Não | Vivo | Lento |
| 16 | NO | MO | I | Até 1 ano | Não | Vivo | Rápido |
| 17 | NO | MO | III | Até 1 ano | Não | Vivo | Rápido |

Continua ...

... continuação

| | | | | | | | |
|----|----|----|-----|------------|-----|------|--------|
| 18 | N0 | M0 | III | > 3 anos | Sim | Vivo | Lento |
| 21 | N0 | M0 | II | Até 1 ano | Não | Vivo | Rápido |
| 22 | N0 | M0 | III | Até 1 ano | Sim | 370 | Lento |
| 23 | N0 | M0 | I | Até 1 ano | Não | Vivo | Lento |
| 28 | N0 | M0 | II | 2 a 3 anos | Não | Vivo | Lento |
| 30 | N0 | M0 | I | 2 a 3 anos | Não | Vivo | Lento |
| 31 | N0 | M0 | I | Até 1 ano | Não | Vivo | Rápido |
| 32 | N0 | M0 | I | 1 a 2 anos | Não | Vivo | Lento |
| 37 | N0 | M0 | II | > 3 anos | Não | Vivo | Lento |
| 38 | N0 | M0 | III | Até 1 ano | Não | 287 | Rápido |
| 39 | N0 | M0 | I | Até 1 ano | Não | 460 | Lento |
| 40 | N0 | M0 | I | Até 1 ano | Não | Vivo | Lento |
| 41 | N0 | M0 | III | Até 1 ano | Não | Vivo | Lento |
| 43 | N0 | M0 | I | Até 1 ano | Não | Vivo | Lento |
| 45 | N0 | M0 | II | Até 1 ano | Não | Vivo | Lento |
| 47 | N0 | M0 | III | Até 1 ano | Não | Vivo | Rápido |
| 51 | N0 | M0 | I | Até 1 ano | Sim | Vivo | Lento |
| 53 | N0 | M0 | III | Até 1 ano | Sim | Vivo | Lento |
| 54 | N0 | M0 | I | Até 1 ano | Sim | Vivo | Rápido |
| 55 | N0 | M0 | III | > 3 anos | Não | Vivo | Lento |

N1: presença de metástases em linfonodos regionais; N0: ausência de metástases em linfonodos regionais; M1: presença de metástases à distância, M0: ausência de metástases à distância.

Tabela 6. Relação dos tratamentos instituídos para cada pacientes do grupo SV \leq 6 m. Jaboticabal, 2014.

| PACIENTE | TRATAMENTO |
|-----------------|---|
| 1 | Cirurgia + Vimblastina + Lomustina |
| 3 | Cirurgia + Vimblastina + Lomustina + Prednisona |
| 6 | Vimblastina + Prednisona |
| 19 | Cirurgia |
| 25 | Cirurgia |
| 26 | Lomustina + Prednisona |
| 27 | Cirurgia + Vimblastina + Prednisona |
| 34 | Inibidor de Tirosina Quinase (ITK) |
| 35 | Lomustina + Prednisona |
| 44 | Vimblastina + Lomustina |
| 46 | Cirurgia |
| 48 | Cirurgia + Vimblastina + Prednisona |
| 50 | Cirurgia + Vimblastina + Lomustina + ITK |
| 52 | Cirurgia + Vimblastina + Lomustina |

Tabela 7. Relação dos tratamentos instituídos para cada paciente do grupo SV > 6 m. Jaboticabal, 2014.

| PACIENTE | TRATAMENTO |
|-----------------|-------------------------------------|
| 2 | Cirurgia + Vimblastina + Prednisona |
| 4 | Cirurgia |
| 5 | Cirurgia + Vimblastina + Prednisona |
| 7 | Cirurgia + Vimblastina + Prednisona |
| 8 | Cirurgia + Vimblastina + Prednisona |
| 9 | Cirurgia + Vimblastina + Prednisona |
| 11 | Cirurgia + Vimblastina + Prednisona |
| 13 | Cirurgia |
| 14 | Cirurgia |
| 15 | Cirurgia |
| 16 | Cirurgia |
| 17 | Cirurgia |
| 18 | Cirurgia |
| 21 | Cirurgia + Lomustina + Prednisona |
| 22 | Cirurgia + Vimblastina + Prednisona |
| 23 | Cirurgia + Vimblastina + Prednisona |
| 28 | Cirurgia + Vimblastina + Prednisona |
| 30 | Cirurgia |
| 31 | Cirurgia |
| 32 | Cirurgia + Vimblastina + Prednisona |
| 37 | Cirurgia + Vimblastina + Prednisona |
| 38 | Cirurgia + Vimblastina + Prednisona |
| 39 | Cirurgia |
| 40 | Cirurgia |
| 41 | Cirurgia + Vimblastina + Prednisona |
| 43 | Cirurgia + Vimblastina + Prednisona |
| 45 | Cirurgia |
| 47 | Cirurgia |
| 51 | Cirurgia + Lomustina + Prednisona |
| 53 | Cirurgia |
| 54 | Cirurgia + Vimblastina + Lomustina |
| 55 | Cirurgia |