

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS DE BOTUCATU

EXPRESSÃO DE FATOR DE CRESCIMENTO SEMELHANTE À
INSULINA (IGF-1), ALVO DA RAPAMICINA EM MAMÍFEROS (M-
TOR), FATOR DE CÉLULA TRONCO (SCF) E RECEPTOR C-KIT
(CD117) EM MASTOCITOMAS CUTÂNEOS CANINOS EM
LÂMINAS DE ARRANJO DE MATRIZ TECIDUAL (TMA)

RAQUEL BENETON FERIOLI

Botucatu - SP
Fev-2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS DE BOTUCATU

EXPRESSÃO DE FATOR DE CRESCIMENTO SEMELHANTE À
INSULINA (IGF-1), ALVO DA RAPAMICINA EM MAMÍFEROS (M-
TOR), FATOR DE CÉLULA TRONCO (SCF) E RECEPTOR C-KIT
(CD117) EM MASTOCITOMAS CUTÂNEOS CANINOS EM
LÂMINAS DE ARRANJO DE MATRIZ TECIDUAL (TMA)

RAQUEL BENETON FERIOLI

Dissertação apresentada junto ao programa de
Pós-Graduação em Medicina Veterinária para a
obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Renée Laufer Amorim

Botucatu – SP
Fev- 2012

Raquel Beneton Ferioli

EXPRESSÃO DE FATOR DE CRESCIMENTO SEMELHANTE À INSULINA (IGF-1),
ALVO DA RAPAMICINA EM MAMÍFEROS (M-TOR), FATOR DE CÉLULA TRONCO
(SCF) E RECEPTOR C-KIT (CD117) EM MASTOCITOMAS CUTÂNEOS CANINOS
EM LÂMINAS DE ARRANJO DE MATRIZ TECIDUAL (TMA)

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Renée Laufer Amorim
Presidente e Orientadora
Departamento de Clínica Veterinária
FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof^a. Dr^a. Giovana Wingeter Di Santis
Membro
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva
UEL – Londrina

Prof.Dr. Julio Lopes Sequeira
Membro
Departamento de Clínica Veterinária
FMVZ – UNESP – Botucatu

Botucatu, 17 de fevereiro de 2012.

Dedicatória

Dedico este trabalho a todos a quem eu amo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a *Deus* por me conceder a vida e permitir que pudesse estar nos lugares por onde já passei e conviver com as pessoas maravilhosas que conheci.

Sou e sempre serei grata aos meus *país* e ao amor que têm por mim.

Agradeço à *vida* por me dar o privilégio de conhecer a pessoa mais linda: *Alfredo*, obrigada por todo amor, companheirismo e apoio incondicional em todos os momentos... *Te amo!*

À professora e orientadora *Renée* por me acolher, orientar e se preocupar em todas as instâncias da vida. Obrigada!

Obrigada a todos os *amigos*, por serem quem são e por demonstrarem o amor que sentem! Não quero e nem poderia citar nomes, pois os amigos têm seu lugar no coração, que é só deles e que cada um sabe que têm!

Obrigada ao professores *Julio Lopes*, *Noeme Rocha*, *Giovana Wingeter*, *Antônio Carlos Faria* e *Ana Paula Bracarense* pelos ensinamentos, incentivo, conselhos e ajuda!

Agradeço aos colegas de trabalho: pós-graduandos (*Mari*, *Rafa*, *Cadu*, *Marcela*, *Isabelle*, *Márcia*, *Rodolfo*, *Arita*, *Ana Paula*, *Ana Angelita*, *Taís*, *Lídi* e *Tici*) pelo convívio, conversas, conselhos, ajudas e companheirismo!

Meus sinceros agradecimentos aos funcionários: *Maury Raul*, *María Valéria* e *Claudíney* por serem tão solícitos, prestativos e atenciosos, pelas risadas e causos!

Muito obrigada aos residentes (*Thaís*, *Díogo* e *Claudía*) por compartilharem seus casos da rotina, suas dúvidas, conhecimentos e amizade!

Obrigada à *Sabrina dos Santos Costa* e ao Prof. *Antônio Calos Alessi* que possibilitaram a utilização das amostras do Serviço de Patologia Veterinária da FCAV – Unesp de Jaboticabal.

Muito obrigada à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior *CAPES* pela concessão de bolsa de estudos.

Agradeço infinitamente aos *pacientes* do Hospital do Câncer de Maringá pelas lições de vida.

LISTA DE TABELAS

	Página
TABELA 1- Descrição dos anticorpos primários utilizados na técnica de imunoistoquímica, fabricante, clone, controle positivo, diluição e padrão de marcação.....	28
TABELA 2- Distribuição das variáveis associadas à classificações patológicas segundo as proteínas analisadas no MTC cutâneo canino.....	72
TABELA 3- Distribuição das variáveis epidemiológicas segundo as proteínas analisadas no MTC canino.....	73
TABELA 4- Distribuição dos escores de marcação e da intensidade de marcação das proteínas analisadas no MTC canino.....	74

LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1- Mastocitoma cutâneo canino, na coluna das esquerda amostras classificadas como de baixo grau de malignidade e na coluna da direita de alto grau de malignidade, de acordo com Kiupel et al. (2011) em aumento de (400x), barra 20µm. A, B: Coloração de hematoxilina e eosina. C, D: Imunomarcacão para o anticorpo anti-CD117 (c-KIT) padrão membranoso e citoplasmático focal. E, F: Imunomarcacão para o anticorpo anti-SCF.....	32
FIGURA 2- Mastocitoma cutâneo canino, na coluna das esquerda amostras classificadas como de baixo grau de malignidade e na coluna da direita de alto grau de malignidade, de acordo com Kiupel et al. (2011) em aumento de (400x), barra 20µm. G, H: Imunomarcacão para o anticorpo anti-IGF-1 alguns mastócitos marcados fortemente e marcação moderada e difusa. I, J: Imunomarcacão para o anticorpo anti-m-TOR marcação forte e moderada.....	33

SUMÁRIO

	Página
CAPÍTULO 1	
INTRODUÇÃO.....	3
REVISÃO DA LITERATURA.....	4
CAPÍTULO 2 – Trabalho científico.....	21
Resumo.....	21
Abstract.....	22
CAPÍTULO III	
CONCLUSÕES GERAIS.....	53
BIBLIOGRAFIA.....	54
Anexos.....	71

FERIOLI, R.B. **Expressão de fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1), alvo da rapamicina em mamíferos (m-TOR), fator de célula tronco (SCF) e receptor c-KIT (CD117) em mastocitomas cutâneos caninos em lâminas de arranjo de matriz tecidual (TMA)**. Botucatu, 2012, 75p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

RESUMO

O mastocitoma cutâneo (MTC) canino é uma neoplasia maligna constituída por mastócitos, que corresponde a aproximadamente 11% das neoplasias cutâneas do cão. A classificação histopatológica em três graus de malignidade, proposta por Patnaik et al. (1984) para os MTCs é o principal fator prognóstico. Recentemente, uma nova classificação com dois graus de malignidade foi proposta (KIUPEL et al., 2011) e parece trazer menor discordância na graduação. Neste estudo foram avaliadas as expressões proteicas de SCF, IGF-1, m-TOR e c-KIT através da técnica de imunoistoquímica (IHQ) em MTCs caninos em busca de novos fatores prognósticos. Analisaram-se as relações entre estas quatro proteínas e, entre IGF-1 e SCF com fatores prognósticos como o grau histológico, índice mitótico e proliferação celular, além de dados epidemiológicos como idade, gênero, porte físico e localização da lesão. Foram utilizadas 133 amostras de MTCs de 133 cães dispostas em lâminas de microarranjo de tecidos (TMA). A associação estatística foi observada entre a expressão de SCF e grau histológico de acordo com Kiupel et al. (2011), índice mitótico, proliferação celular pelo KI-67, localização da lesão, idade, c-KIT e IGF-1. A expressão do fator de crescimento IGF-1 teve relação com o índice mitótico, o porte físico dos animais e a expressão de c-KIT e m-TOR. A expressão de SCF está relacionada ao padrão aberrante de expressão do seu receptor c-KIT. Com base nas relações observadas podemos concluir que as proteínas IGF-1, m-TOR, SCF e c-KIT interagem no desenvolvimento dos MTCs caninos e que cães de porte grande e gigante apresentam maior expressão de IGF-1, corroborando com maior incidência de MTCs nestas raças.

Palavras chave: Cão; fatores de crescimento tecidual; mastocitoma cutâneo

FERIOLI, R.B. Expression of insulin-like growth factor type 1 (IGF-1), mammalian target of rapamycin (m-TOR), stem cell factor (SCF) and c-KIT receptor (CD117) in cutaneous mast cell tumors in tissue microarray (TMA) slides. Botucatu, 2012, 75p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho.”

ABSTRACT

The canine mast cell tumor (MTC) is a malignant neoplasm composed of mast cells, which corresponds to approximately 11% of cutaneous neoplasms of the dog. The histopathological classification in three grades of malignancy, proposed by Patnaik et al. (1984), for MTCs is the main prognostic factor. Recently, a new classification with two malignancy degrees was suggested (KIUPEL et al., 2011) and seems to bring less disagreement in diagnosis. We carried out the study evaluating the protein expression of SCF, IGF-1, m-TOR and c-KIT by immunohistochemical technique (IHC) in canine MTCs searching new prognostic factors. We analyzed the relationships between these four proteins, and between IGF-1 and SCF with prognostic factors such as histological grade, mitotic index and cell proliferation, as well as epidemiological data such as age, gender, physical size and location of the lesion. Were used 133 samples of canine MTCs. The statistical association was observed between the expression of SCF and histological grade according to Kiupel et al. (2011), mitotic index, cell proliferation by Ki-67, lesion location, age, c-KIT and IGF-1. The growth factor IGF-1 expression was related to mitotic index, the animals physical size and the m-TOR expression. The SCF expression is related to the aberrant pattern of expression of its c-KIT receptor. The association between the IGF-1 expression and the animal size was observed, and seems to interact with the m-TOR co-expression. Based on the observed relationships we can conclude that IGF-1, m-TOR, SCF and c-KIT proteins interacts on the development of canine MTCs, and large and giant-sized animals show higher expression of IGF-1, confirming increased incidence of MTCs on these races.

Keywords: dog; tissue growth factors, cutaneous mast cell tumor

INTRODUÇÃO

O mastocitoma cutâneo (MTC) é uma neoplasia maligna constituída por mastócitos, que corresponde aproximadamente 11% das neoplasias cutâneas do cão (VILLAMIL et al., 2011). O comportamento biológico do MTC é muito variável, podendo se apresentar como nódulo único com a cura pela excisão cirúrgica até uma doença metastática fatal (WEBSTER, et al., 2008). A classificação histopatológica em três graus de malignidade, proposta por Patnaik et al. (1984), para os MTCs é o principal fator prognóstico, porém, há discordância entre patologistas na utilização destes critérios. Recentemente, uma nova classificação com dois graus de malignidade foi proposta (KIUPEL et al., 2011) e parece trazer menor discordância no diagnóstico, além de melhor correlação com o tempo de sobrevida. A tecnologia de arranjo em matriz tecidual (TMA – *tissue microarray*) permite uma aceleração massiva de estudos correlacionando achados moleculares *in situ* com informações clínico-patológicas (BUBENDORF et al., 2001) utilizada também no estudo dos MTCs (WEBSTER et al., 2006).

O fator de célula tronco (SCF) e seu receptor c-KIT são expressos em uma grande variedade de células, incluindo mastócitos (IEMURA et al., 1994). Na literatura veterinária não há dados sobre a expressão do IGF-1, SCF e m-TOR, em mastocitomas cutâneos caninos através da técnica de imunoistoquímica.

Na tentativa de colaborar com o estabelecimento do prognóstico pelos clínicos para os pacientes com MTC, novos modelos de classificação são necessários, como foi proposto por Kiupel et al. (2011). O objetivo deste trabalho é de relacionar os marcadores, IGF-1, m-TOR, SCF e c-KIT com dados epidemiológicos dos animais em busca de novos biomarcadores prognósticos para os MTCs. A hipótese principal é de que os fatores de crescimento (SCF e IGF-1) e a proteína integradora de sinais m-TOR influenciam no desenvolvimento do MTC.

Com o intuito de prover novas informações a respeito da classificação do MTC, uma vez que a graduação histopatológica proposta por Patnaik et al. (1984) apresenta controvérsia entre observadores (NORTHRUP et al., 2005;

PINCZOWSKI et al., 2008), este trabalho dá continuidade às pesquisas com MTCs caninos.

REVISÃO DE LITERATURA

Mastocitoma canino

Somente poucos anos após a descoberta dos mastócitos por von Recklinghausen e após a primeira descrição detalhada deste tipo celular por Paul Ehrlich em 1878 em sua tese de doutorado intitulada¹ “Contribuições para a teoria e a prática das colorações histológicas” Bashford, Murray e Cramer em 1905 relataram pela primeira vez o mastocitoma cutâneo canino lançando a semente para que em 1942 Bloom trouxesse novas informações a respeito desta neoplasia (HEAD et al., 1958; CRIVELLATO et al., 2003; AMON et al., 2010).

O MTC é uma neoplasia maligna com origem nos mastócitos, Villamil et al., (2011) realizaram um estudo retrospectivo que avaliou 25.996 casos de neoplasias cutâneas em cães nos EUA entre 1964-2002, observaram que 11% dos casos eram MTCs, sendo o terceiro tipo de neoplasia mais comum, atrás apenas do lipoma e adenoma respectivamente. A literatura frequentemente refere que 7-21% das neoplasias de pele do cão são MTCs (FINNIE et al., 1979; PRIESTER, 1973; BRODEY, 1970; ROTHWELL, 1987; GOLDSCHMIDT e SHOFER, 1992).

Esta neoplasia ocorre mais frequentemente em animais com média de idade de nove anos (THAMM e VAIL, 2007). Até o ano de 2011 não havia se observado predileção sexual ou relação entre o gênero e tempo de sobrevivência global em MTCs, exceto pelo trabalho de Kiupel et al., (2005) que observaram tempo de sobrevivência menor em machos tratados apenas com excisão cirúrgica. No entanto, Laufer-Amorim (2011) observou correlação entre graduações

¹ Beiträge zur Theorie und Praxis der histologischen Färbung.

histológicas (PATNAIK et al., 1984; KIUPEL et al., 2011) e o sexo dos animais, sendo que as fêmeas apresentaram mais tumores de menor grau de malignidade do que os machos. White et al., (2011) relatam um aumento no risco em desenvolver MTC em fêmeas castradas em comparação com fêmeas não castradas, o mesmo ocorreu com os machos. Há uma forte evidência de predisposição racial, sugerindo uma contribuição genética para o desenvolvimento do mastocitoma. Raças como o Boxer, Boston Terrier, Bullmastiff e Labrador são as mais acometidas (THAMM e VAIL, 2007). Em seu trabalho, White et al., (2011) confirmam essa predisposição previamente relatada, e sugerem que muitas outras raças como Rodhesian ridgeback, Weimaraner, Vizla e Bernese mountain dog, também podem apresentar um alto risco em desenvolver MTC.

O mastocitoma ocorre em todo o organismo, mas no tegumento os locais de maior ocorrência são o tronco e extremidades (KIUPEL et al., 2005; THAMM e VAIL, 2007). O mastocitoma cutâneo apresenta-se, principalmente, como lesão única, sendo que vários nódulos primários também podem ocorrer (KIUPEL et al., 2005; MULLINS et al., 2006, THAMM e VAIL, 2007). Alguns estudos sugerem que mastocitomas localizados no leito ungueal, escroto, regiões, prepucial, inguinal e perineal apresentam maior agressividade (CAHALANE et al., 2004; KIUPEL et al., 2005; SFILIGOI et al., 2005). Mastocitomas localizados no focinho apresentam maior frequência de metástase para linfonodo regional quando comparado com outras regiões (GIEGER et al., 2003).

Outros estudos recentes sugerem que mastocitomas subcutâneos podem apresentar um comportamento biológico diferente daqueles com infiltrado dérmico e estão associados com tempo de sobrevida maior (THOMPSON et al., 2011 a; THOMPSON et al., 2011 b). Os resultados desses estudos demonstraram que os perfis de prognósticos baseados na graduação histológica, índice de proliferação pela contagem de figuras de mitose e expressão pelo KI-67, bem como o padrão da proteína KIT se aplicam também a esses tumores (THOMPSON et al., 2011 a; THOMPSON et al., 2011 b).

O MTC canino pode apresentar recidivas locais, surgimento de novas lesões ou metástases principalmente para linfonodos regionais, baço, fígado e medula óssea (ENDICOTT et al., 2007; THAMM e VAIL, 2007).

Os sinais clínicos refletem a extensão do envolvimento sistêmico e a presença ou ausência de síndrome paraneoplásica atribuída a degranulação dos mastócitos e a liberação, principalmente, de histamina e heparina. O animal pode apresentar sinais clínicos sistêmicos como anorexia, êmese ou hematêmese, diarréia, melena e anemia (THAMM e VAIL, 2007).

O diagnóstico acurado é importante para escolha apropriada do tratamento e determinação do prognóstico, que pode ser feito por meio dos exames citológico e histológico da massa tumoral (PATNAIK et al., 1984; KRICK et al., 2009; KIUPEL et al., 2011).

O exame citológico deve ser realizado antes de qualquer conduta terapêutica, porém a histologia é necessária para graduar o tumor e determinar, nos casos de exérese cirúrgica, se as margens de tecido normal estão livres de células neoplásicas (BOSTOCK, 1973; PATNAIK et al., 1984; KRICK et al., 2009; KIUPEL et al., 2011).

Considerando as variações histológicas e o comportamento biológico do mastocitoma, Patnaik et al. (1984) criaram uma classificação e propuseram sua adoção. Os critérios utilizados para diferenciar os níveis de malignidade do tumor incluem: grau de pleomorfismo celular, número de figuras de mitose, características e intensidade dos grânulos citoplasmáticos, e extensão do tumor. Esta classificação permite graduar os mastocitomas em: grau 1 (bem diferenciado), grau 2 (moderadamente diferenciado ou intermediário) e grau 3 (pouco diferenciado).

No estudo de Patnaik et al. (1984) 93% dos pacientes com mastocitoma grau 1 sobreviveram aproximadamente 4 anos, enquanto 47% dos pacientes com tumores grau 2 e 6% com tumores grau 3, tratados com cirurgia, sobreviveram pelo mesmo período de tempo.

No entanto, a subjetividade desta classificação faz com que haja uma discrepância considerável entre observadores na sua aplicação. Tais fatos foram descritos por Northrup et al. (2005) e também por nosso grupo de pesquisa (PINCZOWSKI et al., 2008). No estudo de Pinczowski et al. (2008),

21,4% dos mastocitomas obtiveram a mesma graduação por todos os observadores (quatro observadores) e 7,1% receberam os três graus possíveis de classificação histológica.

Algumas hipóteses foram geradas para justificar essa discrepância na classificação dos mastocitomas, como a subjetividade da graduação, dificuldade em determinar a intensidade de granulação intracitoplasmática, alterações celulares ou até mesmo a heterogeneidade na população celular em diferentes campos do mesmo tumor (NORTHRUP et al., 2005; PINCZOWSKI et al., 2008, KIUPEL et al., 2011).

Recentemente, Kiupel et al. (2011) propuseram uma nova classificação histológica para os mastocitomas, em dois graus: baixo e alto grau de malignidade, caracterizado por pelo menos uma das seguintes características: sete figuras de mitose em dez campos de maior aumento (400x); iniciando a contagem a partir do campo de maior número de figuras de mitose; ao menos três células multinucleadas (três ou mais núcleos) em dez campos de maior aumento (400x); ao menos três núcleos bizarros (núcleos altamente atípicos, edentados, segmentados e de forma irregular) em dez campos de maior aumento (400x) e cariomegalia (diâmetros nucleares de pelo menos 10% das células neoplásicas variando em pelo menos duas vezes). Seis patologistas avaliaram dez mastocitomas como de alto grau, tumores estes que tinham recebido a graduação de Patnaik discordante. Neste trabalho houve 100% de concordância entres os seis patologistas na graduação dos mastocitomas de baixo e alto grau de malignidade (Kiupel et al., 2011). De acordo com esta classificação o tempo médio de sobrevida dos cães com MTC de alto grau de malignidade foi menor que quatro meses e maior que dois anos para os cães com tumores de baixo grau.

O estadiamento do mastocitoma envolve a localização e graduação do tumor, avaliação dos linfonodos regionais, por meio de palpação, exame citológico e a observação de metástases à distância, principalmente em fígado e baço, seja por exames de imagens ou pela confirmação citopatológica ou histopatológica (THAMM e VAIL, 2007; MARCONATO et al., 2008; KRICK et al., 2009; WEBSTER et al. 2011).

A escolha da terapia está relacionada com o estadiamento clínico do tumor, acesso e disponibilidade financeira do proprietário (THAMM e VAIL, 2007).

Para a maioria dos casos a cirurgia convencional, ainda é a principal modalidade terapêutica para a doença (WEISSE et al., 2002; THAMM et al., 2006; STANCLIFT et al., 2008; WEBSTER et al., 2008). A excisão cirúrgica com margens laterais de 2 a 3 cm de tecido normal e um plano fascial de profundidade, geralmente é curativa para os tumores bem diferenciados e moderadamente diferenciados (BOSTOCK et al., 1973; PATNAIK et al., 1984; SEGUIN et al., 2001; WEISSE et al., 2002; SEGUIN et al., 2006; FULCHER et al., 2006).

A radioterapia confere bons resultados para o controle local da doença nos casos em que os tumores excisados apresentam margens cirúrgicas comprometidas ou massas tumorais impossíveis de remoção, devido sua localização ou dimensão (TURREL et al., 1988; LADUE et al., 1998; DOBSON et al., 2004; THAMM e VAIL, 2007).

A quimioterapia é indicada para os cães com massas tumorais inoperáveis, devido sua localização ou dimensão ou em casos de metástase (GERRITSEN et al., 1998; DAVIES et al., 2004; THAMM et al., 2006; CAMPS-PALAU et al., 2007; HAYES et al., 2007; ISOTANI et al., 2008; WEBSTER et al., 2008; HAHN et al., 2008; COOPER et al. 2009; LONDON et al., 2009; RASSNICK et al., 2010). Como os mastocitomas grau 3 apresentam grande probabilidade de metastatizar e conferem ao paciente um período curto de sobrevida a quimioterapia adjuvante nesses casos também é indicada, independentemente de evidência de metástase (WEBSTER et al., 2008).

A etiopatogenia do mastocitoma e a razão para sua elevada incidência são desconhecidas (WEBSTER et al., 2006). Em 1999, foram descritas mutações em pontos do gene *KIT* que codifica o domínio justamembrana do receptor tirosina-quinase em mastócitos neoplásicos de cães (LONDON et al., 1999), confirmadas por Webster et al. (2004) que correlacionaram mutações no *KIT*, e a localização aberrante da proteína KIT em MTC caninos. A principal mutação encontrada foi, a duplicação em tandem interna que causa fosforilação constitutiva do receptor, sem que ocorra a necessidade da ligação

com o fator estimulador de célula tronco (SCF). Isso explicaria o crescimento descontrolado dos tumores e a associação das duplicações em tandem com a malignidade desta neoplasia e uma provável causa do tumor (LONDON et al., 1999; REGUERA et al., 2000; DOWING et al., 2002; WEBSTER et al., 2004, WEBSTER et al., 2006).

Fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1)

O sistema IGF é composto do receptor de fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1R), fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1), fator de crescimento semelhante à insulina tipo 2 (IGF-2), insulina e seis proteínas ligantes de IGF (IGFBP-1-6). O IGF-1R e o receptor de insulina (IR) são receptores tirosina quinase (RTK) semelhantes (GALLAGHER e LEROITH, 2011). Em animais e seres humanos tanto a expressão de IGF-1 quanto de IGF-1R são necessárias para o crescimento celular (LIU et al., 1993).

IGF-1 foi inicialmente identificado como um fator sérico induzido pelo hormônio do crescimento pituitário (GH). Alguns anos depois IGF-1 e IGF-2 foram purificados, e observou-se que o IGF-1 era idêntico a somatomedina. Ambos foram chamados de “fator de crescimento semelhante à insulina” devido a homologia muito próxima a insulina e porque seus efeitos sobre o crescimento das células e tecidos predominam sobre àqueles do metabolismo (DAUGHADAY et al., 1987).

O fator de crescimento IGF-1 possui características tanto de hormônio circulante quanto de fator de crescimento tecidual. A maior parte do IGF-1 encontrado na circulação é produzida pelo fígado. A regulação da produção hepática de IGF-1 é complexa, e o hormônio do crescimento (GH) tem um papel dominante na regulação da expressão gênica do IGF-1. O GH, por sua vez, é produzido pela hipófise anterior sob a regulação de fatores hipotalâmicos, somatostatina e hormônio liberador de hormônio do crescimento (GHRH).

Inicialmente, supôs-se que virtualmente todo o IGF-1 tinha sua origem no fígado e era transportado por mecanismos endócrinos aos seus locais de

ação. No entanto, agora é reconhecido que o IGF-1 também é sintetizado em outros órgãos onde ele exerce efeitos autócrinos e parácrinos (ANUNZIATTA, et al., 2011).

Fosforilação do IGF-1R ou do receptor híbrido IGF-1R/IR-A pela ligação do IGF-1 ou IGF-2 predominantemente conduz à sinalização mitogênica (BELFIORE et al., 2009). O alvo subsequente imediato do IGF-1R é a proteína substrato do receptor de insulina (IRS) (BASERGA, 2009), que serve unicamente como uma ponte para os alvos ligantes subsequentes do IGF-1R. Uma vez que o IRS-1 ou IRS-2 leve à fosforilação da tirosina efetores são recrutados e ligados por meio de seus domínios SH2 ou PTB para mediar as ações do IGF-1R. Esta é a diferença de outros receptores de tirosina quinase (RTKs), que se ligam diretamente aos seus efetores subsequentes imediatos. Há exceções para esta modalidade com sinalização para a quinase regulada por sinal extracelular (Erks 1-2) acoplada pela ligação da proteína sinalizante (Shc) e homóloga (Src) que contém colágeno e a Src 66 com o IGF-1R (SONG et al., 2004).

IGF-1 e IGF-2 ligam-se à subunidade- α do IGF-1R, conduzindo à autofosforilação da subunidade- β e consequentemente ativação das vias sinalizadoras intracelulares: a via da proteína quinase ativadora de mitose (MAPK), a via da quinase-3 fosfatidilinositol (PI3K), ou a via transdutora de sinal Janus quinase e ativadora da transcrição (JAK/STAT) (LEVINE et al., 2006; SAMANI et al, 2007). O resultado da ativação da via MAPK é o aumento da proliferação celular, considerando que a ativação da via da PI3K inibe a apoptose e estimule a síntese protéica, e a via da JAK/STAT ativa a transcrição gênica e pode ser responsável pela atividade transformadora do IGF-1R (LEVINE et al., 2006; SAMANI et al, 2007).

A atividade biológica do IGF-1 é dependente da sua capacidade de induzir sinais intracelulares necessários para o crescimento celular. Na maioria das células, as respostas ao IGF-1 são mediadas pelo seu receptor (IBRAHIM e YEE, 2004) e estão relacionados à natureza permissiva de sua sinalização, que sustenta o microambiente de uma forma que pode levar à tumorigênese (ROSENZWEIG e ATREYA, 2010). Tanto o ligante quanto o receptor têm sido implicados em neoplasias (IBRAHIM e YEE, 2004). As funções autócrina e

parácrina dos dois ligantes principais (IGF-1 e IGF-2) parecem estar desreguladas em neoplasias (ROSENZWEIG e ATREYA, 2010).

Estudos em animais demonstram que a expressão do IGF-1R induz o crescimento tumoral e metástase, no entanto a diminuição da expressão do IGF-1R resulta em diminuição do crescimento tumoral na maioria dos tumores (JONES et al., 2009). A expressão do fator de crescimento semelhante à insulina em cães até agora foi pouco estudada, principalmente em doenças como neoplasias. MacEwen et al. (2004) observaram a expressão de IGF-1R em linhagens de células de osteossarcomas de cães e humanos associando-a a tumores mais agressivos e demonstraram pela primeira vez o IGF-1 como fator mitogênico para linhagens de células de osteossarcomas de cães.

Finotello et al. (2009) relataram o caso de um tumor neuroendócrino pancreático com origem nas ilhotas de Langerhans, que expressava IGF-2 demonstrado pela técnica de imunoistoquímica e que produzia este fator de forma endócrina, demonstrado pela detecção dos níveis séricos pré e pós-cirúrgicos. O trabalho de Queiroga et al. (2009) avaliou as concentrações séricas e intratumorais de IGF-1 em tumores de mama de cadelas e observou que os animais com tumores possuíam níveis séricos maiores de IGF-1 em relação ao grupo controle, o mesmo ocorreu em relação à concentração nas células neoplásicas e nas células de glândulas mamárias normais.

A avaliação dos níveis séricos de IGF-1 também foi realizada em um trabalho que utilizou cães com hepatopatias, cães saudáveis e cães com doenças não hepáticas. Os pesquisadores constataram que, os níveis plasmáticos de IGF-1 foram significativamente menores nos cães hepatopatas em relação aos saudáveis e aos que possuíam outro tipo de enfermidade. Inclusive na comparação entre o grupo de animais que tinham algum tipo de neoplasia maligna hepática e o grupo controle. Confirmando a suspeita de que hepatopatias influenciam negativamente na concentração sérica do IGF-1 em cães, que pode estar relacionada à perda de tecido funcional do fígado, onde este fator de crescimento é sintetizado (NEUMANN et al., 2007).

Alvo da rapamicina em mamíferos (m-TOR)

No início dos anos 1990 durante o programa que buscava alterações genéticas em leveduras como o *Saccharomyces cerevisiae* foram identificados dois genes *TOR* (*target of rapamycin*) (*TOR1* e *TOR2*) e deram uma ideia inicial da importância da proteína TOR no controle da proliferação celular. (HEITMAN et al., 1991; THOMSON et al., 2009; BAI e JIANG, 2010). O mTOR é uma proteína quinase serina/treonina com um peso molecular de aproximadamente 289 kDa evolutivamente conservada e idêntica em até 60%, em humanos e outros mamíferos, que possui um papel central no desenvolvimento de mamíferos (THOMSON et al., 2009; BAI e JIANG, 2010). Integra sinais de diversas vias, incluindo nutrientes (por exemplo, aminoácidos e glicose), fatores de crescimento (insulina e fator de crescimento semelhante à insulina entre outros), hormônios (leptina) e fatores estressantes (hipóxia, desnutrição e dano ao DNA) para regular uma variedade grande de funções da célula eucariótica, como a tradução, transcrição, produção de proteínas, crescimento celular, diferenciação, sobrevivência da célula, metabolismo, balanço energético e resposta ao estresse (DOBASHI et al., 2011; HWANG e KIM, 2011; WATANABE et al., 2011).

A história da droga rapamicina e do seu alvo celular TOR surgiu a partir do conhecimento de um composto isolado do *Streptomyces hygroscopicus*, de amostras de solo obtidas por um grupo de pesquisadores brasileiros em 1965, na ilha de Páscoa no Pacífico sul, outrora chamada de Rapa Nui na língua nativa. No ano de 1975 foram publicados dois trabalhos relatando a descoberta e a caracterização da rapamicina um antibiótico lactona macrocíclico com atividade antifúngica principalmente contra *Candida albicans* (SEHGAL et al., 1975; VEZINA et al., 1975; ALLBANIEL et al., 2007; DOBASHI et al., 2011).

Cafferkey et al. (1993) descreveram o ligante celular para a rapamicina, a proteína FKBP12 em modelos de leveduras, que é codificada pelo gene *RBP1*, deleções neste gene resultaram em resistência recessiva a droga. Neste mesmo trabalho outros dois genes o *DRR1* e *DRR2* (para a resistência dominante a rapamicina) foram definidos por análise genética que indicaram que mutações dominantes não são alélicas para mutações no gene *RBP1*. E

afirmaram com base no trabalho de Kunz et al. (1993) publicado logo após a submissão do seu artigo que, comparando a sequência do DNA, mapeando os cromossomos e de acordo com o fenótipo das interrupções genéticas os genes *DDR1* e *DDR2* são idênticos aos genes *TOR1* e *TOR2* respectivamente. *TOR1* e *TOR2* foram anteriormente identificados no trabalho de Heitman et al. (1991) em *Saccharomyces cerevisiae*.

Dois complexos são formados com o m-TOR, o complexo m-TOR 1 (m-TORC1) e o complexo m-TOR 2 (m-TORC2) (KIM et al., 2002; SARBASSOV et al., 2005; HWANG e KIM, 2011). Em geral, o m-TORC1 é sensível a rapamicina, ele possui o domínio catalítico FRB que é o domínio onde o complexo FKBP12-rapamicina liga-se e exerce suas ações inibitórias sobre a atividade quinase do complexo RAPTOR-m-TOR. A droga não desloca nem substitui o GβL ou o RAPTOR do m-TORC1, mas, desestabiliza fortemente a interação entre o RAPTOR –m-TOR. Não está claro o porquê da sensibilidade dose dependente do m-TORC2 a rapamicina, sabe-se que o complexo FKBP12-rapamicina não se liga ao complexo m-TOR que contém o RICTOR. Um componente não identificado do complexo ou o RICTOR pode bloquear ou ocupar o sítio de ligação do FKBP12-rapamicina ou destruir alostéricamente o complexo FKBP12-rapamicina (KIM et al., 2002; SARBASSOV et al., 2005; HWANG e KIM, 2011).

Diversos sinais decorrentes de fatores de crescimento (como insulina, IGF-1), várias citocinas ligadas às moléculas coestimulatórias e receptores de antígenos, proteínas WNT, níveis de energia celular, bem como hipóxia, estresse celular e dano ao DNA determinam a atividade do m-TORC1 (BERNSTAM e ANGULO, 2009; THOMSON et al., 2009). Estes sinais ativam o complexo m-TORC1 diretamente ou têm seus efeitos mediados através do complexo esclerose tuberosa 1 e 2 (TSC1-TSC2 que é o principal regulador negativo do m-TORC1 em resposta ao estado nutricional da célula (SARBASSOV et al., 2005). Níveis baixos de energia e nutrientes resultam na redução de ATP (adenosina 5' trifosfato) levando a produção da AMPK (AMP quinase dependente) (STRIMPAKOS et al., 2009). A ativação da sinalização do RAS-MAPK (proteína quinase ativadora da mitose) e fosfatidilinositol quinase 3 (PI3K)-AKT (proteína quinase alfa serina/treonina) resulta na fosforilação

inibitória do TSC2 em muitos sítios, e ativa o TSC1/TSC2 (STRIMPAKOS et al., 2009).

Fatores mitogênicos (insulina, hormônios e fatores de crescimento) agem através de seus receptores de membrana, por exemplo, receptor de fator de crescimento semelhante à insulina (IGF1-R) e receptores tirosina quinase (RTK) (THOMSON et al., 2009). Eles ativam moléculas localizadas do lado citoplasmático da membrana celular como o substrato do receptor de insulina (IRS) e RAS, sendo que ambos levam a ativação da PI3K, que é uma molécula chave da via do mTOR (STRIMPAKOS et al., 2009).

O papel e a função do complexo m-TORC2 não são tão bem entendidos quanto no m-TORC1 (THOMSON et al., 2009; BAI e JIANG, 2010; ZINZALLA et al., 2011). O que se sabe a respeito é que ele também é estimulado por nutrientes, insulina e fatores de crescimento (BALLOU e LIN, 2008; STRIMPAKOS et al., 2009; THOMSON, et al., 2009; BAI e JIANG, 2010; ZINZALLA et al., 2011). O tratamento prolongado com rapamicina leva a desfosforilação completa e translocação citoplasmática do RICTOR nuclear e mSIN1, o que correlaciona-se com a redução dos níveis de m-TORC2 (AKCAKANAT et al., 2007).

Devido à via sinalizadora do m-TOR ser estritamente associada com funções celulares, esta proteína desempenha um papel fundamental no desenvolvimento de algumas neoplasias e outras doenças em humanos, como o diabetes tipo II, desordens imunológicas, neoplasias, alterações metabólicas, doenças cardiovasculares, desordens neurológicas, doenças relacionadas à idade, complexo esclerose tuberosa e a linfangioleiomiomatose, as duas últimas causadas por mutações nos genes supressores tumorais *TSC1* e *TSC2*, que produzem proteínas reguladoras envolvidas na via de sinalização do m-TOR, até o presente momento não foram relatadas mutações no gene *MTOR*. (SARBASSOV et al., 2005; ALLBANEL et al., 2007).

Estudos envolvendo linhagens de células de diversos tecidos normais e neoplásicos de cães foram realizados, e demonstraram a presença do m-TOR e proteínas associadas à sua via de sinalização, como na avaliação da expressão de m-TOR, p70S6K (S6K1) e suas formas fosforiladas em linhagens

de células de mastocitomas, osteossarcomas e melanomas de cães (REBUZZI et al., 2007, GORDON et al., 2008; KENT et al., 2009).

A presença do m-TOR e de outros membros de sua via de sinalização e vias correlacionadas tanto nas formas totais quanto fosforiladas, foi observada em células eucarióticas de mamíferos como o homem (XIANG et al., 2011) e cães (GORDON et al., 2008; KENT et al., 2009) e estimulam estudos de oncologia comparada e de potenciais alvos terapêuticos, além de avaliar a utilização de inibidores do m-TOR em cães, como fez Paoloni et al. (2010) concluindo que a rapamicina pode ser administrada com segurança em cães e pode apresentar efeitos terapêuticos. Com base nos resultados os autores confirmam que o cão pode ser utilizado no aprimoramento do uso da rapamicina e de outros inibidores do m-TOR.

Receptor c-KIT (CD117)

O gene *KIT* foi inicialmente caracterizado por Besmer e colaboradores em 1986 como um oncogene viral (*v-kit*) do vírus do sarcoma felino H24-FeSV. Complementarmente, clonagem de sequências de DNA de tecidos de humanos e camundongos por Yarden et al., (1987) e Qiu et al., (1988) mostraram que *v-kit* surgiu por transdução e truncagem de um gene celular o proto-oncogene *c-KIT*. A proteína KIT é um membro do tipo III da família de receptores de tirosina quinase e exibe homologia extensa com o receptores transmembrana para fator estimulante de colônia tipo 1 (CSF-1R), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF-R) e fator de permeabilidade vascular /fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF-R) (BESMER et al., 1986; DEVRIES et al., 1992; QIU et al., 1988; ROSKOSKI, 2005; YARDEN et al., 1987).

O receptor KIT é o receptor para o fator de célula tronco SCF, também conhecido como fator de crescimento para mastócitos (LONDON, et al., 1999; ROSKOSKI, 2005). A proteína KIT inclui um domínio extracelular composto de cinco domínios semelhantes à imunoglobulinas (codificado pelos exons 1-9), um domínio transmembrana (exons 11-21). O domínio intracelular é, além disso, dividido em um domínio justamembrana regulatório negativo (exons 11 e 12) e um domínio tirosina kinase citoplasmático que é dividido por uma

inserção até o ligante de ATP (trifosfato de adenosina) (exon 13) e lobos fosfotransferases (exon 17) (LETARD et al., 2008; ROSKOSKI, 2005).

Como em vários outros receptores tirosina quinase, a ativação pelo ligante induz a dimerização do receptor, que ativa a tirosina quinase, resultando em autofosforilação e a fosforilação de substratos exógenos. Esta fosforilação então, leva à transdução do sinal subsequente (LETARD et al., 2008).

A ativação do receptor KIT (via SCF) leva a um aumento da proliferação, sobrevivência prolongada e aumento na liberação de mediadores tanto em mastócitos normais quanto nos mastócitos neoplásicos (AMON et al., 2010).

Estudos realizados com técnica de imunoistoquímica determinaram padrões anormais de expressão do receptor KIT nos mastocitomas cutâneos (WEBSTER et al., 2004). Foram identificados três padrões de localização da proteína KIT em mastócitos neoplásicos, sendo eles membranoso (padrão 1), citoplasmático focal com perda da marcação membranosa (padrão 2) e citoplasmático difuso (padrão 3). Estes padrões foram correlacionados com a agressividade do tumor, sendo que animais que possuíam os padrões, citoplasmático focal e difuso apresentavam um prognóstico desfavorável (WEBSTER et al., 2004; GIL DA COSTA et al., 2007).

O comportamento biológico mais agressivo do mastocitoma com o aumento da expressão do receptor c-KIT pode ser explicado pelas funções que desempenham a proteína KIT e seu ligante, SCF, no desenvolvimento do mastocitoma. Uma das hipóteses é que a isoforma citoplasmática do KIT pode ser ativado pelo SCF solúvel ou pode conter constitutivamente mutações ativadoras, que levarão à inibição da apoptose, aderência de mastócitos, migração e proliferação (LONDON et al., 1999; WEBSTER et al., 2004).

Os padrões de marcação imunoistoquímica da proteína KIT são independentes das mutações no exon 11 do *c-KIT*, sugerindo que tanto o exame imunoistoquímico quanto a PCR (reação em cadeia pela polimerase) para os estudos de mutação devem ser incluídas no perfil de exames para os MTCs (WEBSTER et al., 2006). A avaliação de mutações do *c-KIT* e do padrão de KIT, não podem ser consideradas como as mais importantes para a análise da agressividade dos MTCs, mas devem ser considerados como importantes para a indicação terapêutica, já que cães com mutações no *c-KIT* e padrões

aberrantes de KIT são candidatos ao tratamento com inibidores de receptor de tirosina quinase (LONDON et al., 2009).

SCF (fator de célula tronco)

O fator de célula tronco (SCF) também conhecido como ligante do KIT ou fator de crescimento para mastócitos (LONDON, et al., 1999; LINNEKIN, et al., 2003; ROSKOSKI, 2005), é um fator de crescimento que atua *in vitro* em combinação com outros fatores de crescimento hematopoiéticos para estimular tanto as células progenitoras hematopoiéticas maduras como as primitivas (MCNIECE e BRIDDELL, 1995). O receptor para o SCF é o receptor tirosina quinase c-KIT, codificado pelo proto-oncogene *c-kit* (ZSEBO et al., 1990; PAPAYANOPOULOU et al., 1991).

Duas formas de SCF ocorrem naturalmente em decorrência de *splicing* alternativo do RNA e processos proteolíticos. A proteína estendida consiste de 248 aminoácidos (SCF²⁴⁸), que são clivados no domínio extracelular para formar a isoforma solúvel do SCF (SCFs) que consiste de 165 aminoácidos (SCF¹⁶⁵) (ANDERSON et al., 1990; TOKOZ et al., 1992). A forma curta é composta de 220 aminoácidos (SCF²²⁰) e resulta em uma forma de SCF que se destina à membrana (SCFm) (ANDERSON et al., 1990; TOKOZ et al., 1992). O SCF solúvel nativo existe como uma glicoproteína dimérica com uma massa molecular de aproximadamente 45 kDa (ZSEBO et al., 1990a). O SCF existe como isoforma solúvel e ancorada à membrana que surgem de *splicing* alternativo do RNA; ambas as isoformas contêm inicialmente um domínio extracelular, um segmento transmembrana e um componente intracelular (ROSKOSKI, 2005).

Em cultura líquida de células de medula óssea de camundongos com SCF recombinante de rato (rrSCF) populações puras de mastócitos foram geradas (MEDLOCK et al., 1990). Após duas semanas de injeções diárias de rrSCF em ratos, esfregaços de medula óssea demonstraram uma hiperplasia de mastócitos acompanhada de uma diminuição na celularidade total da medula óssea em adição a uma hipoplasia eritróide e linfóide. Mastócitos foram detectados na circulação e havia um aumento sistêmico e em tecidos do tipo

conectivo embrionário, mas não foram detectados mastócitos em mucosas (ULICH et al., 1991).

Na medula óssea 1-5% das células expressam *c-KIT* (PAPAYANOPOULOU et al., 1991). Células primitivas ($CD34^+/CD33^-$; $CD34^+/CD38^-$; e $CD34^+/HLA-DR^-$), células progenitoras maduras, megacariócitos e plaquetas expressam *c-KIT* (ASHMAN et al., 1991; BRIDDELL et al., 1991; GRABAREK et al., 1991; PAPAYANOPOULOU et al., 1991; WEISS et al., 1991).

Takeuchi et al. (2010) analisaram a expressão de SCF em quatro linhagens de mastócitos neoplásicos por *Western blotting* e detectaram a proteína em apenas uma das linhagens, embora a expressão do RNA mensageiro do SCF tenha sido detectado em todas as linhagens analisadas. Neste mesmo estudo, os autores observaram que a fosforilação do receptor *c-KIT* foi maior através da estimulação pelo SCF em três das quatro linhagens. O uso de anticorpo anti-SCF não teve efeito inibitório sobre a fosforilação do *c-KIT* em uma das linhagens, indicando que a ativação do *c-KIT* pode ser causada pela estimulação com o SCF autócrino (TAKEUCHI et al., 2010).

Diversos estudos têm descrito a habilidade do SCF em agir em sinergismo com outros fatores de crescimento para aumentar o número de células maduras, células progenitoras maduras ou células progenitoras primitivas (MCNIECE e BRIDDELL, 1995).

Arranjo de matriz tecidual, ou *tissue microarray* (TMA)

O arranjo em matriz de amostras teciduais, ou *tissue microarray* (TMA), é uma técnica descrita em 1998 por Kononen et al. (1998) com ampla aceitação pela literatura mundial. Com um conceito extremamente simples, trata-se de agrupar um grande número de amostras teciduais em um único bloco de parafina, permitindo o estudo de expressão de marcadores moleculares em larga escala com grande aproveitamento do material arquivado, do tempo e dos custos (ANDRADE et al., 2007).

Neste método, cilindros diminutos de tecido (diâmetro variando entre 0,6 a 4 mm) são removidos de uma quantidade grande de blocos de parafina

com os tecidos de interesse e subsequentemente são depositados em um bloco de parafina “receptor”. Cortes desse bloco de arranjo de matriz tecidual podem ser usados para análises *in situ* simultâneas, de centenas de neoplasias em técnicas rotineiras de colorações histoquímicas, para avaliar expressão de proteínas utilizando a imunohistoquímica e para técnicas de hibridização como a hibridização fluorescente *in situ* (FISH) e hibridização *in situ* de RNA (WEBSTER et al., 2006; BUBENDORF et al., 2001). E mais recentemente DJIDJA et al. (2010) utilizaram lâminas de TMA na técnica de imageamento químico por espectrometria de massas utilizando MALDI (Ionização/Dessorção por Laser Assistida por Matriz) para classificação molecular de carcinomas pancreáticos de humanos. Os danos aos fragmentos teciduais dos blocos doadores são minimizados por serem retirados apenas cilindros pequenos. O que é interessante para os patologistas e pesquisadores de uma forma geral, já que eles podem ter acesso ao material de arquivo ao mesmo tempo em que preservam os blocos de danos causados por consecutivos processamentos.

Entre as vantagens do uso do TMA em tumores estão, a pesquisa em larga escala de fatores prognósticos ou preditivos e a uniformização das reações nos grandes estudos retrospectivos de uma instituição de ensino e pesquisa (ANDRADE et al., 2007). Alguns estudos geraram evidências para a validação e representatividade dos dados do TMA como, por exemplo, o trabalho de Kononen et al. (1998) que encontraram as mesmas frequências de HER-2, ciclina D1 e amplificações da deleção 17q23 do cromossomo 17 em tumores mamários, de dados prévios da literatura (BUBENDORF et al., 2001).

A imunohistoquímica utilizando anticorpos que identificam elementos dos grânulos dos mastócitos como triptase, oncogenes, receptores para fatores de crescimento tumoral, marcadores da proliferação e apoptose são importantes para a determinação da agressividade do mastocitoma, e consequentemente do prognóstico do paciente (WEBSTER et al., 2011). Portanto, o uso de lâminas de TMA facilitaria a pesquisa da expressão destas proteínas, uniformizando cada reação melhorando os resultados para a avaliação de um número grande de MTCs em um mesmo estudo.

Artigo submetido à publicação na
Revista Pesquisa Veterinária Brasileira

Sob o título

“Relação da expressão proteica de fatores de crescimento celular IGF-1 e SCF
com fatores prognósticos em mastocitomas cutâneos caninos”

Relação da expressão proteica de fatores de crescimento celular IGF-1 e SCF com fatores prognósticos em mastocitomas cutâneos caninos

Raquel B. Ferioli ^{I*}; Rafael T. Neto ^I; Sabrina S. Costa ^{II}; Antonio C. Alessi ^{III}; Rafael M. Rocha ^{IV}; Renée Laufer Amorim ^I

RESUMO

O mastocitoma cutâneo (MTC) é a neoplasia maligna mais comum na pele dos cães e seu comportamento biológico é muito variável. Dentre os fatores prognósticos estudados nos MTCs, a classificação histológica, o índice proliferativo e a expressão da proteína KIT são os que apresentam uma associação mais relevante com o provável prognóstico deste tumor. O objetivo deste trabalho foi avaliar a expressão proteica de fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1), fator de célula tronco (SCF) e sua relação com o receptor tirosina quinase (c-KIT), alvo da rapamicina em mamíferos (m-TOR), grau histológico, índice proliferativo (Ki-67) e mitótico e dados epidemiológicos em MTCs caninos. Foram utilizadas 133 amostras de MTCs, provenientes de 133 cães, dispostas em lâminas de microarranjo de tecidos (TMA). A técnica de imunoistoquímica foi utilizada para a avaliação destas proteínas. Observou-se associação entre SCF e a graduação histológica proposta por Kiupel et al. (2011), índice mitótico, proliferação celular, escore de IGF-1, local da lesão, idade dos animais e padrão imunoistoquímico do receptor c-KIT. A relação de dependência também foi observada entre IGF-1 e o porte dos animais, índice mitótico, m-TOR e c-KIT. A expressão proteica de SCF se relacionou com a agressividade dos MTCs caninos, uma vez que foi mais frequente em MTCs com c-KIT citoplasmático. A relação entre a expressão de IGF-1, SCF, c-KIT e m-TOR pode estar associada à integralização de suas vias de ação. A expressão de IGF-1 está associada à MTCs em cães de porte grande.

Termos de indexação: mastocitoma, IGF-1, SCF,

IGF-1 and SCF protein expression in cutaneous mast cell tumors in dogs and relation to prognostic factors

Raquel B. Ferioli ^{I*}; Rafael T. Neto ^I; Sabrina S. Costa ^{II}; Antonio C. Alessi ^{III}; Rafael M. Rocha ^{IV}; Renée Laufer Amorim ^I

ABSTRACT

Cutaneous mast cell tumor (MCT) is one of the most common neoplasms in the skin of the dogs, and express variable biological behavior. Among the studied MTC's aspects, histological classification, proliferative index and protein expression of KIT shows the most defined connection with this tumor's prognostic. The aim of this study was evaluate the protein expression of insulin-like growth factor type 1 (IGF-1), steam cell factor (SCF) and its relationship with tyrosine kinase receptor (c-KIT), mammalian target of rapamycin (m-TOR), histological classification,(Ki67) proliferative and mitotic index and epidemiological data in MTCs. In this study was used 133 MTC samples, from 133 animals, arranged in tissue microarray (TMA) slides. The TMA was used for avaluation this proteins. An association was observed between SCF and histological grade proposed by Kiupel et al. (2011), mitotic index, cell proliferation, IGF-1, lesion site, age of the animals and immunohistochemical pattern c-KIT receptor. The dependence relationship was also observed between IGF-1 and animals' size, mitotic index, m-TOR and c-KIT. The SCF proteic expression was related to canine MTCs aggressiveness, since it is more frequent in MCTs with c-KIT cytoplasmic. The relationship between the expression of IGF-1, SCF, c-KIT e m-TOR can be associated with the integration of its actions ways. The IGF-1 expression is associated to large dogs MTCs.

Index terms: mast cell tumor, IGF-1, SCF, dog

INTRODUÇÃO

O mastocitoma cutâneo (MTC) canino é uma neoplasia maligna constituída por mastócitos, que corresponde aproximadamente 11% das neoplasias cutâneas do cão e a mais comum na pele dos cães (Villamil et al. 2011). O comportamento biológico do MTC é muito variável, podendo ser um nódulo único, com a cura pela excisão cirúrgica até uma doença metastática fatal (Tham & Vail 2007, Webster et al. 2008). Patnaik et al. (1984) propuseram uma classificação histopatológica em três graus de malignidade para os MTCs, que atualmente é o principal fator prognóstico, porém há discordância entre patologistas na graduação dos MTCs (Northrup et al. 2005, Pinczowski et al. 2008, Kiupel et al. 2011). Recentemente, uma nova classificação com dois graus de malignidade foi proposta (Kiupel et al. 2011) e parece trazer menor discordância, além de se correlacionar com o tempo de sobrevida.

O grau histológico, idade, raça, sexo, localização e mutação no proto-oncogene *KIT* são fatores preditivos nos MTCs caninos (Tham & Vail 2007). Outros fatores são o índice mitótico, proliferação celular (expressão proteica de Ki-67) e o padrão de marcação da expressão de c-KIT (Webster et al. 2004, Scase et al. 2006, Romansik et al. 2007).

Estudos indicam que, cerca de 15-40% dos MTCs contém mutações no gene *KIT* que codifica o receptor tirosina quinase c-KIT (Letard, et al. 2008, Welle et al. 2008). Seu ligante é o fator de célula tronco (SCF), conhecido também como fator de crescimento para mastócitos que é um fator de crescimento expresso em diversos tipos de tecidos (London et al. 1999, Linnekin, Jelacic, Shivakrupa 2003, Roskoski 2005).

Outro fator de crescimento importante no desenvolvimento de neoplasias é o IGF-1, que atua principalmente nas vias ativadora da mitose, da transcrição e inibidora da apoptose levando à proliferação celular (Levine et al. 2006, Samani et al. 2007). Suas ações são mediadas pelo receptor tirosina quinase IGF-1R (Ibrahim & Yee 2004). Fosforilação do IGF-1R ou do receptor híbrido IGF-1R/IR-A pela ligação do IGF-1 ou IGF-2 predominantemente conduz à sinalização mitogênica (Belfiore et al. 2009).

Recentemente White et al. (2011) observaram que cães de raças de porte grande têm um risco maior de desenvolver MTC e as raças de porte pequeno têm um risco baixo. Fatores de crescimento têm sido relacionados às neoplasias, como agentes para a manutenção da proliferação crônica e descontrolada, por diversos mecanismos (Neumann et al. 2007, Stoop et al. 2008, Yee & Wood 2008, Callan & Milne 2009, Hanahan & Weinberg 2011, Werner 2011). O uso da tecnologia de arranjo em matriz tecidual (TMA – *tissue microarray*) que permite uma aceleração dos estudos associando achados moleculares *in situ* com informações clínico patológicas (Bubendorf et al. 2001) foi utilizada também no estudo dos MTCs (Webster et al. 2006).

A expressão do IGF-1 em cães até agora foi pouco estudada, principalmente em doenças como neoplasias. Devido à via sinalizadora do m-TOR ser estritamente associada com funções celulares, esta proteína desempenha um papel fundamental no desenvolvimento de algumas neoplasias em humanos (Albanell et al. 2007). O objetivo deste estudo foi investigar a expressão dos fatores de crescimento SCF e IGF-1 em MTCs e a sua relação com o grau histológico de acordo com Patnaik et al. (1984) e Kiupel et al. (2011), índice mitótico (IM) e com expressão proteica pela técnica de imunoistoquímica (IHQ) de KI-67, m-TOR e receptor tirosina quinase (c-KIT). Os dados epidemiológicos dos cães utilizados foram: raça, idade, gênero, porte, e local da lesão, e, as suas associações com a expressão proteica do IGF-1, m-TOR, SCF e c-KIT também foram analisadas.

MATERIAL E MÉTODOS

Seleção dos casos e elaboração da plataforma de arranjo de matriz tecidual

Este trabalho foi realizado de acordo com o termo de “Princípios Éticos na Experimentação Animal” tendo sido aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

(FMVZ) – Unesp – Botucatu (Protocolo: 102/2010-CEUA). Foram selecionadas 133 amostras de MTCs, provenientes de 133 cães, dos arquivos dos Serviços de Patologia Veterinária da FMVZ (Botucatu/SP) e FCAV (Jaboticabal/SP), Unesp. O estudo retrospectivo incluiu amostras obtidas entre os anos de 2001 a 2010. Os blocos de parafina foram selecionados, novas lâminas histológicas foram confeccionadas, coradas por HE e revistas por três patologistas para confirmar o diagnóstico histopatológico de MTC e classificá-los de acordo com Patnaik et al. (1984) e Kiupel et al. (2011). Somente foram utilizados tumores primários cutâneos de animais que não receberam qualquer tipo de tratamento antitumoral antes da colheita da amostra.

Para construir os blocos de TMA, foram selecionadas as áreas representativas do grau histológico atribuído e com maior número de figuras de mitose para obtenção de um *core* de cada tumor. Utilizou-se o dispositivo manual *TissueMicroarrayer* (BeecherInstruments[®], Silver Springs, USA) para confecção de dois blocos receptores, um contendo amostras provenientes da FCAV, Jaboticabal (23 *cores*) e o outro da FMVZ, Unesp, Botucatu (110 *cores*). Os *cores* medindo 1mm de diâmetro dos blocos doadores foram dispostos com espaçamento de 0.2mm entre eles nos blocos receptores. Cortes de 3µm de espessura foram realizados consecutivamente e montados em lâminas adesivadas para este fim (Instrumedics Inc.TM). As primeiras lâminas foram utilizadas para a coloração de HE, para confirmar a presença dos tumores, as demais foram mergulhadas em parafina e acondicionadas a -20°C até a realização da técnica de IHQ.

Dados epidemiológicos

Para a obtenção das informações epidemiológicas, como raça, sexo, idade, peso do animal e localização anatômica do tumor, foram realizadas consultas aos prontuários dos pacientes, chamadas telefônicas aos proprietários e aos médicos veterinários responsáveis pelos casos. O peso foi categorizado de maneira a formar quatro grupos de acordo com White et al., (2011) com algumas adaptações. Cães de raça pura tiveram seu porte

classificado de acordo com a padronização de peso para a raça feita pelo *American Kennel Club* (AKC). Raças que não são reconhecidas pelo AKC tiveram seu porte padronizado de acordo com a Confederação Brasileira de Cinofilia (CBKC), todos os animais inclusive cães sem raça definida (SRD) foram padronizados segundo seu peso: pequeno (< 9 Kg), médio (9 - 18 kg), grande (18 ≥ 36 Kg) e gigante (> 36 Kg). Os cães considerados de raças *toy* pela AKC foram incluídos na categoria de porte pequeno. A idade dos animais também foi analisada por categorias, estabelecidas de acordo com White et al. (2011), em jovem (< 5 anos) meia idade (5 - 11 anos) e idoso (>11 anos). A localização anatômica foi dividida em: cabeça, tronco, membros, região perineal, escroto, vulva, e cauda.

Classificação histopatológica e índice mitótico

Com as lâminas originais coradas pela técnica de HE foram realizadas as classificações histopatológicas de acordo com Patnaik et al. (1984) e Kiupel et al. (2011) e a determinação do índice mitótico, feita seguindo os critérios de Romansik et al. (2007). Foi realizada a contagem do número de figuras de mitose em 10 campos de maior aumento (400x) e os tumores categorizados de acordo com Romansik et al. (2007), em menor ou igual e maior a 5 figuras de mitose.

Avaliação da expressão proteica pela técnica de imunoistoquímica em microarranjo de tecidos

As lâminas de TMA foram desparafinizadas em estufa 56⁰ C por 24 horas e posteriormente colocadas em xilol e re-hidratados em álcool etílico em concentrações decrescentes e água deionizada. A recuperação antigênica foi realizada com tampão citrato 10mM, pH 6,0, em câmara de pressão controlada por microprocessador (Pascal[®]/Dako) durante 30 segundos a 125⁰ C para os anticorpos c-KIT, KI-67, SCF, e IGF-1, para o anticorpo m-TOR utilizou-se o

mesmo tampão no entanto em micro-ondas (Continental AW-4202A, potência máxima 900W) em dois ciclos de 5 minutos cada. Em seguida, as lâminas foram resfriadas por 20 minutos a temperatura ambiente e lavadas em água deionizada.

Seguiu-se com a incubação em peróxido de hidrogênio (30 Vol.) a 3% (diluído em álcool metílico) durante 20 minutos, para o bloqueio da peroxidase endógena. As lâminas foram lavadas em água deionizada e incubadas em tampão TRIS, pH7,4, por 10 minutos. Os cortes foram submetidos ao bloqueio de proteínas inespecíficas com caseína a 3% (Leite Molico®, Nestlé) durante 1 hora a 27^o C, o excesso da solução foi retirado com solução tampão TRIS e aplicou-se em cada lâmina o anticorpo primário, levando à incubação durante 18 horas (*overnight*) em câmara úmida à 4^o C.

A seguir, as lâminas foram lavadas duas vezes com tampão TRIS pH7,4, por 5 minutos cada vez e foram incubadas com sistema de polímero (AdvanceTM, Dako) de acordo com recomendações do fabricante, a 27^o C e lavadas com TRIS pH7,4, duas vezes por 5 minutos cada. A coloração foi obtida utilizando-se solução pronta para uso de DAB (3,3' *diaminobenzidinetetrachloride*- Dako, Carpinteria, USA) por 3 minutos. Os cortes foram contra-corados com Hematoxilina de Mayer e desidratados em concentrações crescentes de álcool e xilol. Em seguida, as lâminas foram montadas com resina e lamínula.

Como controle negativo, a incubação do anticorpo primário foi substituída por soro não imune (imunoglobulina de camundongo ou coelho Dako) em lâmina com corte de MTC e como controle positivo foi utilizada lâmina com de tecido de cão, escolhido de acordo com as indicações do fabricante de cada anticorpo primário e que sabidamente reagia com cada anticorpo primário (Tabela 1). Todas as reações de controle positivo ou negativo foram feitas concomitantemente às lâminas do TMA (Tabela 1).

Para a análise da expressão proteica de cada anticorpo e para o registro das fotomicrografias, foi utilizado o programa de análise de imagens Leica Qwin versão 3.0, em microscópio óptico convencional (Leica - DMR), com câmera digital acoplada (Leica – DFC500). O padrão de imunomarcção da proteína KIT foi avaliado de acordo com Webster et al. (2004) em

citoplasmático e membranoso (Fig. 1 C e D). As marcações citoplasmática focal e difusa foram condensadas e compoem o grupo citoplasmático, tendo em vista que ambas estão associadas a um prognóstico pior (Webster et al. 2004, Gil Da Costa et al. 2007). Na avaliação da proliferação celular as células com núcleos positivos para o KI-67, foram contadas em um campo de 400x, considerando-se como ponto de corte 23 células conforme Webster et al. (2007). Só foram considerados os *cores* que tivessem pelo menos uma célula marcada para KI-67 e aqueles sem nenhuma célula positiva foram descartados do estudo. Para a avaliação da expressão de SCF, IGF-1 e m-TOR, analisou-se o percentual de células marcadas em cada *core*, classificando em escores de zero a quatro, sendo (0): negativo, (1): menos de 10% das células positivas; (2): $10 \geq 30\%$ das células positivas; (3): $31 \geq 60\%$ das células positivas; e (4): $> 60\%$ das células positivas. Para avaliação da intensidade de marcação das células que predominava em cada *core* utilizaram-se escores de um a três, sendo (1): fraca, (2): moderada; (3): forte.

Tabela 1. Descrição dos anticorpos primários utilizados na técnica de imunohistoquímica, fabricante, clone, controle positivo, diluição e padrão de marcação.

Anticorpo primário	Fabricante	Clone	Controle positivo cão	Diluição	Marcação
c-KIT (CD117)	DakoCytomation	Policlonal	Mastócitos Dermatite alérgica	1:400	Membrana/ citoplasma
Ki-67	DakoCytomation	MIB-1	Linfonodo	1:50	Nuclear
SCF	Santa Cruz	Policlonal	Fígado	1:50	Citoplasma
IGF-1	Neomarkers	M23	Rim	1:50	Citoplasma
m-TOR	Millipore	Policlonal	Próstata	1:200	Membrana/ citoplasma

Análise estatística

O teste de Qui-quadrado ou o teste exato de *Fisher* foram aplicados para avaliar a força de associação entre a expressão de SCF e IGF-1 e as graduações histológicas (Patnaik et al. 1984, Kiupel et al. 2011), índice mitótico (IM) (Romansik et al. 2007), e com a expressão proteica pela técnica de IHQ de KI-67 (para a proliferação celular), m-TOR, e receptor c-KIT. Os dados epidemiológicos dos cães (raça, idade, gênero, porte, e local da lesão) também foram avaliados quanto às suas associações com a expressão proteica do IGF-1, m-TOR, SCF e c-KIT. Para todas as análises estatísticas foi considerado o nível de significância de 5% e o programa utilizado foi o *SAS System* versão 9.2.

RESULTADOS

Das 133 amostras de MTC canino avaliadas pela classificação histopatológica descrita por Patnaik et al. (1984), 13 (10%) foram classificadas como grau 1, 88 (66%) como grau 2 e 32 (24%) como grau 3. De acordo com a descrição histopatológica feita por Kiupel et al. (2011), 34 (26%) foram classificados como de alto grau de malignidade e 99 (74%) como de baixo grau de malignidade (Fig. 1 A e B). Na avaliação do índice mitótico, 89% (118/133) dos MTCs caninos tinham até 5 figuras de mitose em 10 campos (400x) e 11% (15/133) tinham mais do que 5 figuras de mitose.

Quanto aos dados epidemiológicos tabulados, registrou-se: raça (130/133 MTCs), sexo (119/133 MTCs), idade (92/133 MTCs), peso (128/133 MTCs) e localização (81/133 MTCs), 52% (62/119) dos animais eram fêmeas e 48% (57/119) machos, o peso dos animais variou entre 4 e 72 kg, 10% (13/128) eram de porte pequeno, 5% (7/128) de porte médio, 79% (100/128) de porte grande e 6% (8/128) de porte gigante. A idade dos animais variou entre 1,5 e 13 anos, sendo 22% (20/92) cães jovens; 70% (65/92) cães de meia idade e 8% (7/92) cães idosos.

Pela técnica de imunoistoquímica foi possível avaliar a proliferação celular pela proteína KI-67, sendo que 86% (114/133) dos casos apresentaram até 23 células que expressaram KI-67 e 14% (19/133) dos casos apresentaram mais do que 23 células.

Avaliação do fator de célula tronco

Neste estudo a expressão de SCF em MTCs caninos foi observada em 100% (133/133) dos casos avaliados (Fig. 1 E e F) tanto em mastócitos quanto fibroblastos e células endoteliais dos vasos. Observamos a associação entre o escore de marcação do SCF (todos os casos receberam o escore 4: > 60% das células positivas) e o padrão de marcação do c-KIT (Fig. D e E) ($p < 0,00001$), sendo que 70% das amostras apresentaram o padrão de marcação de c-KIT citoplasmático.

Houve relação entre a intensidade de marcação do SCF e índice mitótico ($p = 0,0071$) sendo que 89% das amostras tinham IM menor ou igual a 5 figuras de mitose, destas 45% receberam escore de intensidade de marcação como moderado.

Em relação às classificações histopatológicas, houve associação apenas com a classificação proposta por Kiupel et al. (2011), tanto para a intensidade de marcação do SCF ($p = 0,0071$) quanto para o escore de marcação do SCF ($p < 0,0001$), a maioria dos MTCs caninos eram de baixo grau (74%) e apresentaram intensidade de marcação fraca e moderada (44% e 43% respectivamente).

Na avaliação de SCF em relação aos dados epidemiológicos, houve associação com a localização anatômica dos MTCs ($p < 0,0001$), sendo que 43% (56/133) dos tumores localizavam-se no tronco e membros dos animais, destes 45% apresentavam intensidade de marcação fraca e 37% moderada. Observou-se também, associação entre o escore de marcação e a idade categorizada ($p < 0,0001$). Das amostras com intensidade de marcação fraca, 68% (25/37) eram de cães de meia idade ($p < 0,0001$) e das amostras com

intensidade de marcação moderada 74% (26/35) eram de cães de meia idade ($p < 0,0001$).

Avaliação do fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1)

A expressão do fator de crescimento IGF-1 foi avaliada, e 94% (118/125) dos casos foram positivos pela técnica de IHQ. Destes, 58% (69/118) receberam o escore 4 ($> 60\%$ das células marcadas) (Fig. 2H) e 52% (61/118) a intensidade de marcação fraca.

A associação entre IGF-1 e o padrão de marcação do c-KIT foi observada para o escore de marcação, dos casos com c-KIT citoplasmático (88/125), 65% (57/88) receberam o escore 4 para IGF-1, ($p = 0,0012$). Observou-se também associação da intensidade de marcação de IGF-1 e o padrão citoplasmático do c-KIT ($p = 0,0050$) com distribuição igualitária de 43% (38/88) tanto para intensidade fraca quanto para a moderada (Fig. 2H).

Em relação ao SCF, observamos a associação da intensidade de marcação do SCF com a expressão de IGF-1, tanto na avaliação por escore de marcação quanto por intensidade de marcação ($p = 0,0405$ e $p = 0,0153$) respectivamente.

A intensidade de marcação do m-TOR, se associou com a intensidade de marcação do IGF-1 ($p < 0,0001$) com 92% (114/124) dos casos sendo positivos para os dois marcadores (Fig. 2G, H e I), destes 19% (24/124) apresentaram a combinação de marcação fraca para IGF-1 e moderada para m-TOR. Foi observada também associação do escore de marcação de IGF-1 com a intensidade de marcação do m-TOR ($p = 0,0083$), 29% (33/114) com a combinação de escore 4 para IGF-1 e intensidade moderada para o m-TOR (Fig. 2J).

Quando foi avaliada a relação entre a expressão de IGF-1 e os fatores prognósticos analisados, observou-se a associação entre o escore de marcação e o índice mitótico ($p = 0,0021$), sendo que 55% dos casos (69/125) receberam escore 4 e destes 94% (65/69) tiveram IM até 5 figuras de mitose. A relação de dependência entre a distribuição da intensidade de marcação do

IGF-1 (118 amostras), segundo o porte categorizado dos animais (128 amostras) foi significativa ($p= 0,0334$) com 36% (43/118) dos cães sendo de porte grande e com intensidade de marcação fraca. Além disso, todas as amostras com intensidade de marcação forte eram de cães de porte grande (14/118).

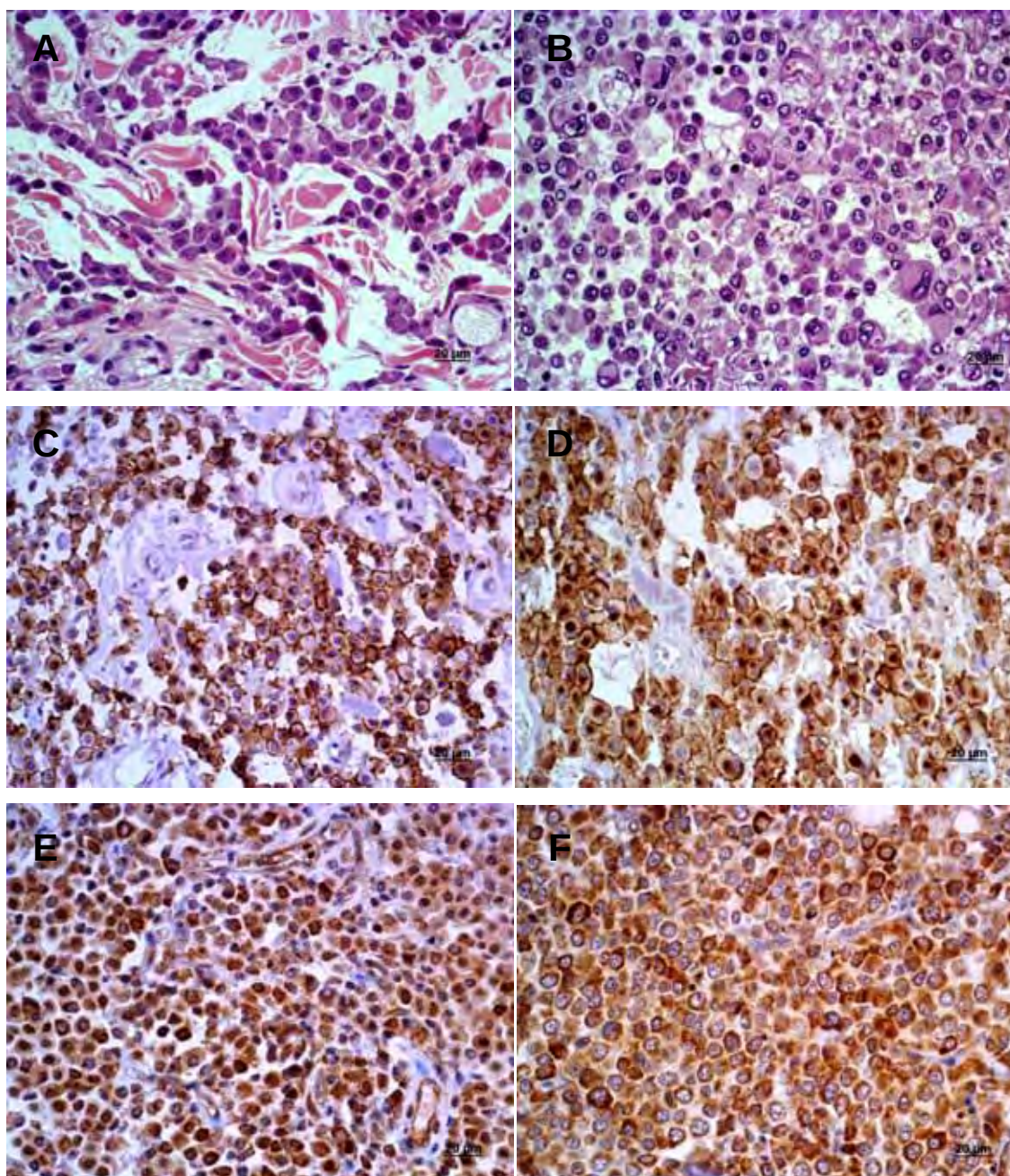


Figura 1. Mastocitoma cutâneo canino, na coluna das esquerda amostras classificadas como de baixo grau de malignidade e na coluna da direita de alto grau de malignidade, de acordo com Kiupel et al. (2011) em aumento de (400x), barra 20µm. A, B: Coloração de hematoxilina e eosina. C, D: Imunomarcação para o anticorpo anti-CD117 (c-KIT) padrão membranosos e citoplasmático focal. E, F: Imunomarcação para o anticorpo anti-SCF.

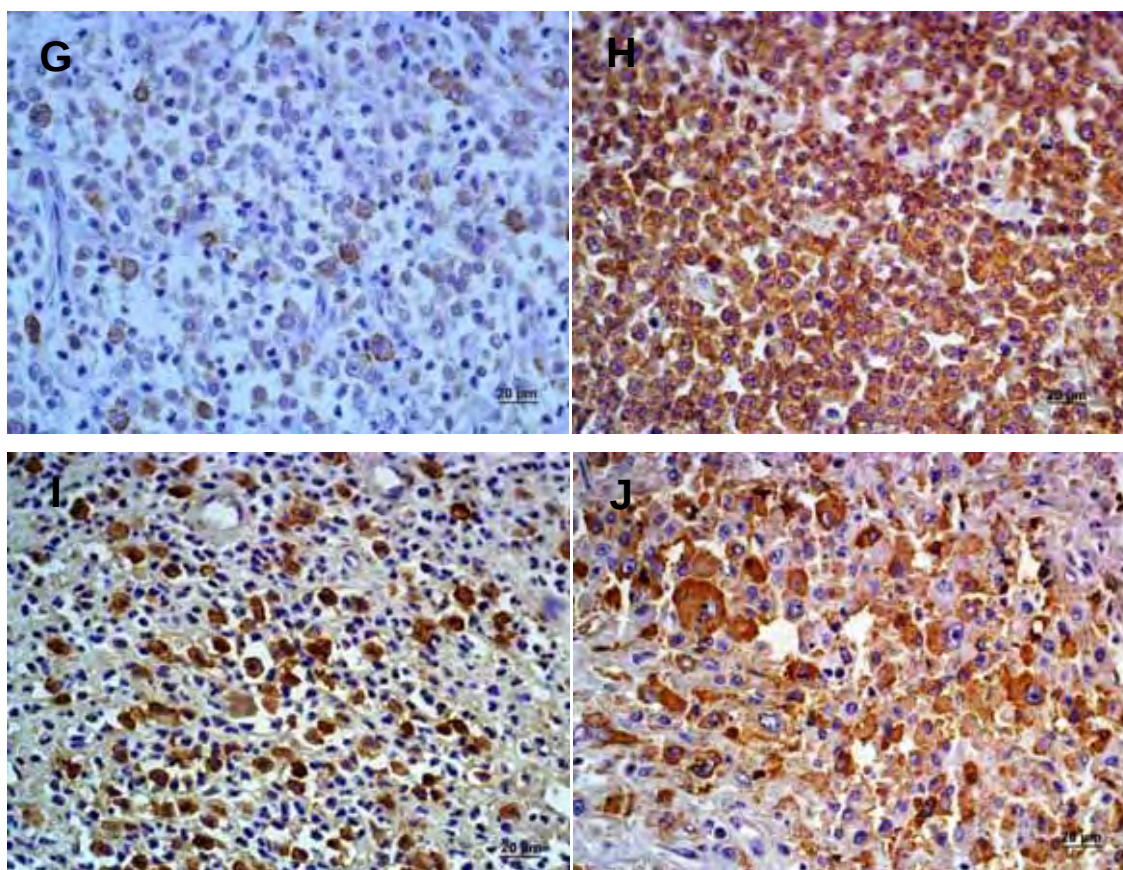


Figura 2. Mastocitoma cutâneo canino, na coluna das esquerda amostras classificadas como de baixo grau de malignidade e na coluna da direita de alto grau de malignidade, de acordo com Kiupel et al. (2011) em aumento de (400x), barra 20µm.. G, H: Imunomarcção para o anticorpo anti-IGF-1 alguns mastócitos marcados fortemente e marcação moderada e difusa. I, J: Imunomarcção para o anticorpo anti-m-TOR marcação forte e moderada.

DISCUSSÃO

Este estudo se pautou no fato de o SCF e o seu receptor c-KIT desempenharem papéis cruciais no ciclo celular, inclusive nos mastócitos, atuando na diferenciação, desenvolvimento, proliferação, quimiotaxia, adesão, sobrevivência e ativação destas células (London et al. 1999, Roskoski et al. 2005, Da Silva et al. 2006), além dos efeitos do IGF-1 sobre o crescimento celular, indução da mitose, proliferação e diferenciação celular, observados

também em diversos tipos de neoplasias (Ibrahim & Yee 2004, Jones et al. 2009, Annunziata, Granata, Ghigo 2011, Gallagher & Le Roith 2011).

O m-TOR desempenha um papel central no controle de atividades essenciais para a célula: transcrição, estabilidade proteica, biogênese ribossomal, autofagia, controle do tamanho celular entre outros (Wullschleger et al. 2006, Allbanel et al. 2007). A expressão proteica de SCF foi observada em todas as amostras avaliadas, com mais de 60% das células neoplásicas marcadas. Não há relatos na literatura sobre o papel deste fator de crescimento em MTCs caninos. Takeuchi et al. (2010) determinaram a expressão de SCF em uma linhagem de mastócitos neoplásicos de cães com o uso da técnica de *Western blotting*, e observaram que a fosforilação do receptor c-KIT pode ser causada pela via de estimulação autócrina do SCF em mastócitos que tenham mutações funcionais no gene *KIT*.

A maioria (70%) dos MTCs com padrão de marcação citoplasmática para c-KIT apresentou imunomarcação de SCF, quando comparado com os MTCs com KIT membranoso (30%). O padrão de marcação citoplasmático de c-KIT é considerado um padrão aberrante de localização da proteína KIT e demonstra maior fosforilação desta, resultando em ativação dos receptores tirosina quinase (Webster et al. 2007). Os padrões de marcação imunoistoquímica da proteína KIT são independentes das mutações no exon 11 do *KIT* (Webster et al. 2006). Takeuchi et al. (2010) também observaram fosforilação consistente do c-KIT em uma das linhagens de mastócitos avaliadas e que não apresentavam mutações no gene *KIT*. Uma das hipóteses dos autores foi a de que o receptor c-KIT poderia ser ativado pelo SCF por mecanismos autócrinos nos quais, o SCF secretado pode ser utilizado para ativar os seus próprios receptores c-KIT (Takeuchi et al. 2010).

É possível que a isoforma citoplasmática do KIT possa ser ativado pelo SCF solúvel (SCFs). Em nosso trabalho não foi possível determinar qual a isoforma do SCF (solúvel ou ancorada à membrana) foi expressa nas amostras avaliadas, pois o anticorpo utilizado detecta ambas as formas. No entanto não observamos a expressão do SCF no meio extracelular que circundava os mastócitos nos MTCs caninos analisados, exceto em células endoteliais de vasos sanguíneos e fibroblastos. O que poderia nos levar a inferir que a maior

parte do SCF expresso nos MTCs caninos que avaliamos seja a isoforma ancorada à membrana (SCF_m). Ambas as formas do SCF são biologicamente ativas com funções distintas, bem como com sobreposição de funções. SCF_m induz ativação do receptor c-KIT mais persistente do que SCF solúvel (Linnekin, Jelacic, Shivakrupa 2003). É provável que a internalização do receptor c-KIT ocorra após a sua ligação com o SCF_m. Estes fatos explicariam a associação entre a expressão do SCF e o padrão de imunomarcação citoplasmática do c-KIT, observada em nosso trabalho.

A expressão de SCF foi associada à proliferação celular e ao índice mitótico quando se avaliou a sua intensidade de marcação. A maioria dos casos (86%) teve um índice mitótico menor ou igual a 5 figuras de mitose e a proliferação celular avaliada pela proteína KI-67 comportou-se da mesma maneira, com a maior parte das amostras (65%) tendo a contagem até 7 células positivas. A contagem do número de figuras de mitose integra a graduação histológica dos MTCs (Kiupel et al. 2011), no entanto, estudos demonstraram que o IM pode ser um fator preditivo independente (Romansik et al. 2007, Elston et al. 2009). A avaliação do índice de proliferação celular pela expressão da proteína Ki-67 tem sido realizada nos MTCs pela IHQ com alto valor preditivo (Abadie, Amardeilh, Delverdier 1999; Scase et al. 2006, Webster et al., 2007, Webster et al. 2008, Maglennon et al. 2008, Thompson et al. 2011). Assim como Takeuchi et al. (2010) que não observaram efeito do SCF sobre a proliferação celular nas 3 linhagens de mastócitos neoplásicos avaliadas; observamos que a intensidade de marcação do SCF está inversamente associada a proliferação celular no MTC. A associação observada entre a expressão proteica de SCF e a graduação histopatológica proposta por Kiupel et al. (2011), teve a maioria dos MCTS como de baixo grau de malignidade, o que corrobora com os achados observados em relação ao IM e a proliferação celular em nosso trabalho, tendo em vista que MTCs de baixo grau apresentam um índice de proliferação celular menor (Kiupel et al. 2011). A divisão e a proliferação celular envolvem múltiplas proteínas que ativam e inibem estes processos, os tecidos normais controlam a produção e liberação de sinais promotores de crescimento que coordenam a entrada e a progressão da célula no ciclo de divisão celular (Hanahn & Weinberg 2011). Uma hipótese

para a associação observada entre a expressão de SCF e a menor proliferação celular nos MTCs caninos é a atuação deste fator de crescimento em mastócitos normais, sua ligação com o c-KIT é necessária para o crescimento e proliferação destas células, o que poderia explicar a expressão maior de SCF em MTCs caninos bem diferenciados, porém com controle da fosforilação deste receptor tirosina quinase, ao contrário do que poderia ser observado na localização citoplasmática de c-KIT.

A localização anatômica dos MTCs foi relacionada à expressão de SCF na avaliação por escore de marcação, sendo que 43% dos casos localizavam-se em tronco e membros. De todos os casos avaliados 40% estavam localizados no tronco e somados, tronco e membros representaram 68%. O mastocitoma ocorre em todo o organismo, mas no tegumento os locais de maior ocorrência são o tronco e extremidades (Kiupel et al. 2005, Thamm & Vail 2007). Brøden et al. (2010) também observaram em seu trabalho que 40% dos MTCs localizaram-se em tronco. Ainda não há uma explicação para esse fato. No entanto em humanos o SCF é expresso em níveis diferentes em fibroblastos, células endoteliais, ao longo da via migratória de células tronco embrionárias, células de Sertoli, folículos ovarianos, encéfalo, timo e medula óssea, bem como em níveis séricos baixos (Linnekin, Jelacic, Shivakrupa 2003). Uma das razões para a prevalência do MTCs em tronco e membros poderia ser a proporção entre os diferentes níveis de expressão das isoformas do SCF nestas localizações anatômicas. A maior parte dos casos apresentou intensidade de marcação moderada 40% (53/133) e 20% (26/133) apresentaram intensidade de marcação forte, destes obtivemos a informação da localização do tumor em apenas 53% (14/26) sendo a maioria em tronco e membros 64% (9/14). Essa expressão mais forte do SCF poderia explicar a prevalência maior dos MTCs em troncos e membros. Outra hipótese seria a maior proporção de fibroblastos nestas regiões, que tem a derme mais espessa em relação ao restante do corpo (Muller 2001). Os trabalhos de Kitamura et al. (1989), Fujita et al. (1989) e Jarboe & Huff (1989) relataram evidências biológicas fortes de que fibroblastos podem produzir as isoformas SCF_m e SCF_s.

A idade em categorias também foi relacionada à expressão de SCF, com predomínio em cães de meia idade (5 -11 anos) com maior expressão proteica de SCF. Este achado pode contribuir para o fato de que o MTC ocorre mais frequentemente em animais com média de idade de nove anos (Thamm & Vail 2007). Não há nenhum trabalho que tenha associado a expressão de SCF em cães e a idade dos animais. Outros fatores, além da expressão aumentada de SCF podem contribuir para o desenvolvimento dos MCTs em cães com esta faixa etária, como o padrão de expressão aberrante do c-KIT.

A expressão de IGF-1 nos MTCs caninos foi de 94% de positividade. Embora estudos prévios tenham identificado a relação entre os níveis séricos de IGF-1 e o porte em várias raças de cães (Eigenmann, Amador, Patterson 1988) e tenham sido relacionados ao crescimento em humanos (Froesch et al. 1963, Daughaday et al. 1972) o fato que deve ser lembrado é que, são os valores teciduais e não os séricos de IGF-1 que determinam o crescimento do corpo (Yakar et al. 1999).

Foi observada a associação entre a expressão de IGF-1 e c-KIT, com a maioria dos casos tendo mais do que 60% das células marcadas pelo IGF-1 e apresentando padrão de marcação citoplasmático do c-KIT. O receptor para o IGF-1 o IGF-1R é um importante receptor tirosina quinase (RTK), envolvido na sinalização mitogênica e ligado também ao desenvolvimento e progressão de neoplasias malignas (Larsson, Girnita, Girnita 2005). O aumento da expressão e ativação de RTKs é muitas vezes ligado a fenótipos agressivos de neoplasias (Sivakumar et al. 2009), nos MTCs avaliados, ocorreu fato semelhante tendo em vista que MTCs caninos que apresentam o padrão de expressão aberrante de c-KIT são considerados tumores de pior valor preditivo.

A associação entre a expressão de IGF-1 e SCF foi observada no nosso trabalho. McNiece & Bridgel (1995) descreveram a ação sinérgica entre SCF e outros fatores de crescimento. Uma possibilidade seria o SCF atuar na mobilização de mastócitos, para o local onde ele está sendo secretado em quantidade maior por fibroblastos e pelos próprios mastócitos e o IGF-1 atuar no crescimento, proliferação e diferenciação destes mastócitos. Isso explicaria a co-expressão destes dois fatores e o fato de o SCF não estar associado à MTCs caninos com alto índice mitótico, além disso observamos que apenas

49% (61/125) MTCs apresentaram a intensidade de marcação fraca para o IGF-1, o que explicaria a prevalência de MTCs mais diferenciados.

As expressões de IGF-1 e m-TOR foram observadas simultaneamente em 92% das amostras de MTCs caninos analisados. As funções do m-TOR que são mais bem entendidas em células de mamíferos estão relacionadas ao controle da transcrição e tradução do RNA mensageiro, síntese proteica biogênese ribossomal, autofagia e controle do tamanho celular (Albanell et al. 2007). A sinalização do IGF-1R pelo IGF-1 também pode estimular o crescimento de células neoplásicas, devido aos eventos patológicos moleculares envolvidos em vias de sinalização relacionadas (Annunziat, Granata, Ghigo 2011). Como o observado por Rebuzzi et al. (2007) descreveram em MTCs caninos, o envolvimento da via do m-TOR/PI3K na via de sinalização do VEGF, que por sua vez estimula a neovascularização e asobrevida das células neoplásicas. O aumento de m-TOR poderia se relacionar à angiogênese nos MTCs estudados, ligada a maior sobrevida dos mastócitos e talvez um controle de entrada no ciclo celular. Uma vez que o m-TOR está envolvido na expressão gênica e proteica da célula, o aumento concomitante de IGF-1 e m-TOR se complementam e asseguram o crescimento celular dos MCTs caninos.

As análises feitas relacionando a expressão de IGF-1 e os fatores prognósticos analisados determinaram a associação entre o escore de marcação do IGF-1 e o índice mitótico. O IGF-1 é um importante fator mitogênico devido ao seu papel na promoção da diferenciação somática (Annunziata, Granata, Ghigo 2011). A maior parte dos casos (88%) apresentou até 5 figuras de mitose, mesmo com altos escores de expressão de IGF-1. Considerando o microambiente celular, os efeitos proliferativos do IGF-1 podem ser sucedidos por indução da diferenciação celular (Annunziata, Granata, Ghigo 2011), o que pode explicar estes achados, supondo-se que os mastócitos neoplásicos já se encontravam em fase de diferenciação e não de proliferação e somando-se a isso, observamos 74% de MTCs de baixo grau de malignidade ou seja, tumores mais diferenciados.

Um dos achados mais interessantes deste trabalho foi, a associação entre a expressão do fator de crescimento IGF-1 e o porte dos animais

acometidos pelo MTC. Observamos que 82% dos casos que expressaram IGF-1 eram de cães de porte grande e gigante. Uma das hipóteses para explicar esta relação é a influência do gene *IGF1* e a sua proteína expressa o fator de crescimento IGF-1. O gene *IGF1* é um determinante genético forte do tamanho do corpo dos mamíferos, em cães um único alelo deste gene é o determinante para o porte na maioria das raças pequenas (Sutter et al. 2007). Sendo assim, o porte do animal pode influenciar no surgimento dos MTCs caninos, ligados aos receptores do tipo tirosina quinase e seus ligantes, como é o caso do IGF-1. A expressão de IGF-1 em cães até agora foi pouco estudada, principalmente em doenças como neoplasias. A expressão deste fator foi avaliada em linhagens de células de osteossarcomas e tumor neuroendócrino de pâncreas, os níveis séricos maiores foram determinados em cães com tumores de mama e neoplasias hepáticas (Macewen et al. 2004, Neumann et al. 2007, Finotello et al. 2009, Queiroga et al. 2009).

A relação de dependência entre a expressão proteica dos fatores de crescimento SCF e IGF-1 e os marcadores moleculares envolvidos em suas vias, c-KIT e m-TOR foi observada nos MTCs caninos avaliados. A expressão proteica de SCF está envolvida no desenvolvimento do MTC canino e está associada à expressão de seu receptor celular c-KIT, fatores prognósticos como o grau histológico proposto por Kiupel et al. (2011), índice mitótico e proliferação celular, e fatores epidemiológicos como a localização anatômica da neoplasia e a idade dos animais acometidos. A co-expressão do fator IGF-1 foi demonstrada em MTCs caninos e se relacionou com a expressão proteica de c-KIT, SCF e m-TOR, que pode ser explicada pela integralização das vias moleculares de ação dessas proteínas. Os diferentes padrões de expressão e associação destas proteínas, somados aos fatores prognósticos e dados epidemiológicos podem refletir o comportamento biológico variável do MTC canino.

Agradecimentos. – À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de estudos de mestrado, e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp) pelo auxílio financeiro.

REFERÊNCIAS

Abadie J.J., Amardeilh M.A., Delverdier M.E. 1999. Immunohistochemical detection of proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 in mast cell tumors from dogs. *Journal American Veterinary Medical Association*. 215:1629-1634.

Albanell J., Dalmases A., Rovira A., Rojo F. 2007. mTOR signalling in human cancer. *Clinical and Translational Oncology*. 9:484-493.

Annunziata M., Granata R., Ghigo E. 2011. The IGF system. *Acta Diabetologica*. 48 (1): 1-9.

Belfiore A., Frasca F., Pandini G., Sciacca L., Vigneri R. 2009. Insulin receptor isoforms and insulin receptor/insulin-like growth factor receptor hybrids in physiology and disease. *Endocrine Reviews*. 30: 586–623.

Brønden L.B., Eriksen T., Kristensen A.T. 2010. Mast cell tumours and other skin neoplasia in Danish dogs - data from the Danish Veterinary Cancer Registry. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 52 (6):1-6.

Bubendorf L., Nocito A., Holger M., Sauter G. 2001. Tissue microarray (TMA) technology: miniaturized pathology archives for high-throughput in situ studies. *Journal of Pathology*. 195: 72-79.

Callan A.C. & Milne E. 2009. Involvement of the IGF system in fetal growth and childhood cancer: an overview of potential mechanisms. *Cancer Cause Control*. 20: 1783-1798.

Da Silva C.A., Reber L., Frossard N. 2006. Stem cell factor expression, mast cells and inflammation in asthma. *Fundamental and Clinical Pharmacology*. 20: 21-39.

Daughaday W.H., Hall K., Raben M.S., Salmon W.D.Jr., Van Den Brande J.L., Van Wyk J.J. 1972. Somatomedin: proposed designation for sulphation factor. *Nature*. 235: 107.

Eigenmann J.E., [Amador, A.](#), [Patterson D.F.](#) 1988. Insulin-like growth factor I levels in proportionate dogs, chondrodystrophic dogs and in giant dogs. *Acta Endocrinologica (Copenhagen)*. 118 (1): 105-108.

Elston L.B., Sueiro F.A., Cavalcanti J.N., Metze K. 2009. The importance of the mitotic index as a prognostic factor for survival of canine cutaneous mast cell tumors. a validation study. *Veterinary Pathology*. 46: 362-364, author reply 364-65.

Finotello R., Marchetti V., Nesi G., Arvigo M., Baroni G., Vannozzi I., Minuto F. 2009. Pancreatic Islet Cell Tumor Secreting Insulin-Like Growth Factor Type-II in a Dog. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 23: 1289–1292.

Froesch E.R., Buergi H., Ramseier E.B., Bally P., Labhart A. 1963. A. Antibody-suppressible and nonsuppressible insulin-like activities in human serum and their physiologic significance. An insulin assay with adipose tissue of increased precision and specificity. *Journal of Clinical Investigation*. 42: 1816-1834.

Fujita J., Onoue H., Ebi Y., Nakayama H., Kanakura Y. 1989. In vitro duplication and in vivo cure of mast-cell deficiency of SI/Sid mutant mice by cloned 3T3 fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 86: 2888-2891.

Gallagher E.J. & Leroith D. 2011. Minireview: IGF, insulin, and cancer. *Endocrinology*. 152 (7): 2546-2551.

Hanahan D., Weinberg, R. A. 2011. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*. 144: 646-674.

Ibrahim Y.H. & Yee D. 2004. Insulin-like growth factor-I and cancer risk. *Growth Hormone & IGF Research*. 14: 261-269.

Jarboe D.L., Huff T.F. 1989. The mast cell-committed progenitor. II. W1W' mice do not make mast cell-committed progenitors and S//S/d fibroblasts do not support development of normal mast cell-committed progenitors. *Journal of Immunology*. 142: 2418-2423.

Kitamura Y., Nakayama H., Fujita J. 1989. Mechanism of mast cell deficiency in mutant mice of W/WV" and SI/SI" genotype, p.15-25. In: GALLI, S.J.; AUSTEN, K.F. *Mast Cell and Basophil Differentiation and Function in Health and Disease*. Raven, New York.

Kiupel M., Webster J.D., Bailey K.L., Best S., Delay J., Detrisac C.J., Fitzgerald S.D., Gamble D., Ginn P.E., Goldschmidt M.H., Hendrick M.J., Howerth E.W., Janovitz E.B., Langohr I., Lenz S.D., Lipscomb T.P., Miller M.A., Misdorp W., Moroff S., Mullaney T.P., Neyens I., O'toole D., Ramos-Vara J., Scase T.J., Schulman F.Y., Sledge D., Smedley R.C., Smith K., Snyder P.W., Southorn E., Stedman N.L., Steficek B.A., Stromberg P.C., Valli V.E., Weisbrode S.E., Yager J., Heller J., Miller R. 2011. Proposal of a two-tier histologic grading system for canine cutaneous mast cell tumors to more accurately predict biological behavior. *Veterinary Pathology*. 48: 147-155.

Larsson O., Girnita A., Girnita L. 2005. Role of insulin-like growth factor 1 receptor signalling in cancer. *Brithsh Journal of Cancer*. 92: 2097-2101.

Letard S., Yang Y., Hanssens K., Palmérini F., Leventhal P.S., Guéry S., Moussy A., Kinet P.P., Hermine O., Dubreuil P. 2008. Gain-of-function mutations in the extracellular domain of kit are common in canine mast cell tumors. *Molecular Cancer Research*. 6 (7): 1137-1144.

Levine A.J., Feng Z., Mak T.W., You H., Jin S. 2006. Coordination and communication between the p53 and IGF-1-AKT-TOR signal transduction pathways. *Genes Development*. 20: 267-275.

Linnekin D., Jelacic T., Shivakrupa. 2003. Stem cell factor, p. 393-403. In: Henry, H.L., Norman, A.W. *Encyclopedia of hormones*. 1 ed. Academic Press, Maryland Heights.

London C.A., Galli S.J., Yuuki T., Hu Z.Q., Helfand S.C., Geissler, E.N. 1999. Spontaneous canine mast cell tumors express tandem duplications in the proto-oncogene kit. *Experimental Hematology*. 27: 689-697.

Maglennon G.A., Murphy S., Adams V., Miller J., Smith K., Blunden A., Scase T.J. 2008. Association of Ki67 index with prognosis for intermediate-grade canine cutaneous mast cell tumors. *Veterinary Comparative Oncology*. 6: 268-274.

Macewen E.G., Pastor J., Kutzke J., Tsan R., Kurzman I.D., Thamm D.H., Wilson M. Radinsky R. 2004. IGF-1 Receptor Contributes to The Malignant Phenotype in Human and Canine Osteosarcoma. *Journal of Cellular Biochemistry*. 92: 77-91.

McNiece I.K. & Briddell R.A. 1995. Stem cell factor. *Journal of Leucocyte Biology*. 57: 14-22.

Neumann S., Welling H., Thuere. 2007. Insulin-like Growth Factor I Concentration in Dogs with Inflammatory and Neoplastic Liver Diseases. *Journal of Veterinary Medicine*. 54: 612-617.

Northrup N.C., Howerth E.W., Harmon B.G., Brown C.A., Carmicheal K.P., Garcia A.P., Latimer K.S., Munday J.S., Rakich P.M., Richey L.J., Stedman N.L., Gieger T.L. 2005. Variation among pathologists in the histologic grading of

canine cutaneous mast cell tumors with uniform use of a single grading reference. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 17: 561-564.

Patnaik A.K., Ehler W.J., Macewen E.G. 1984. Canine cutaneous mast cell tumors: morphologic grading and survival time in 83 dogs. *Veterinary Pathology*. 21: 469-474.

Pinczowski P., Torres Neto R., Fabris V.E., Amorim R.L. 2008. Mastocitoma cutâneo canino. Variação entre observadores na graduação histopatológica. **Clínica Veterinária**. 77: 76-78.

Queiroga F.L., Pérez-Alenza D., Silvan G., Peña L., Lopes C.L., Illera J.C. 2010. Serum and intratumoural GH and IGF-I concentrations: Prognostic factors in the outcome of canine mammary cancer. *Research in Veterinary Science*. 89: 396-403.

Rebuzzi L., Willmann M., Sonneck K., Gleixner K.V., Florian S., Kondo R., Mayerhofer M., Vales A., Gruze A., Pickl W.F., Thalhammer J.G., Valent P. 2007. Detection of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptors Flt-1 and KDR in canine mastocitoma cells. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 115: 320-333.

Romansik E.M., Reilly C.M., Kass P.H., Moore P.F., London P.F. 2007. Mitotic index is predictive for survival for canine cutaneous mast cell tumors. *Veterinary Pathology*. 44: 335-341.

Roskoski R.Jr. 2005. Signaling by Kit protein-tyrosine kinase—the stem cell factor receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 337: 1-13.

Samani A.A., Yakar S., Leroith D., Brodt P. 2007. The role of the IGF system in cancer growth and metastasis: overview and recent insights. *Endocrine Reviews*. 28: 20–47.

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*. 20: 151-158.

MULLER G.H. 2001. Structure and Functions of the Skin, p.1-70. In: *Small animal dermatology*. 6th ed. WB Saunders, Philadelphia.

Sivakumar R., Koga H., Selvendiran K., Maeyama M., Ueno T., Sata M. 2009. Autocrine loop for IGF-I receptor signaling in SLUG-mediated epithelial-mesenchymal transition. *International Journal Of Oncology*. 34: 329-338.

Stoop H., Honecker F., Van De Geijn G.J.M., Gillis A.J.M., Cools M.C., De Boer, M., Bokemeyer C., Wolffenbuttel K.P., Drop S.L.S., De Krijger R.R., Dennis N., Summersgill B., McIntyre A., Shipley J., Oosterhuis J.W., Looijenga L.H.J. 2008. Stem cell factor as a novel diagnostic marker for early malignant germ cells. *Journal of Pathology*. 216: 43-54.

Sutter N.B., Bustamante C.D., Chase K., Gray M.M., Zhao K., Zhu L., Padhukasahasram B., Karlins E., Davis S., Jones P.G., Quignon P., Johnson G.S., Parker H.G., Fretwell N., Mosher N.S., Lawler D.F., Satyaraj E., Nordborg M., Lark K.G., Wayne R.K., Ostrander E.A. 2007. A Single IGF1 Allele Is a Major Determinant of Small Size in Dogs. *Science*. 316: 112-115.

Takeuchi Y.; Fujino, Y., Watanabe M., Nakagawa T., Ohno K., Sasakic N., Sugano S., Hajime Tb. 2010. Aberrant autophosphorylation of c-Kit receptor in canine mast cell tumor cell lines. *Veterinary Immunology and Immunopatology*. 137: 208-216.

Thamm D.H. & Vail D.M. 2007. Mast cell tumors, p.402-424. In: Withrow S.J. & Vail D.M. *Small Animal Clinical Oncology*. 4th ed. WB Saunders, Philadelphia.

Thompson J.J., Pearl D.L., Yager J.A., Best S.J., Coomber B.L., Foster R.A. 2011. Canine subcutaneous mast cell tumor: characterization and prognostic indices. *Veterinary Pathology*. 48: 156-168.

Villamil J.A., Henry C.J., Bryan J.N., Ellersieck M.; Shultz L., Tyler J.W., Hahn A.W. 2011. Identification of the most common cutaneous neoplasms in dogs and evaluation of the breed and age distributions for selected neoplasms. *Journal of American Veterinary Medical Association*. 239 (7): 960-965.

Webster J.D., Kiupel M., Kaneene J.B., Miller R., Yuzbasiyan-Gurkan V. 2004. The use of KIT and tryptase expression patterns as prognostic tools for canine cutaneous mast cell tumors. *Veterinary Pathology*. 41: 371-377.

Webster J.D., Yuzbasiyan-Gurkan V., Kaneene J.B., Miller R., Resau J.H., Kiupel M. 2006. The role of c-KIT in tumorigenesis: evaluation in canine cutaneous mast cell tumors. *Neoplasia*. 8: 104-111.

Webster J.D., [Yuzbasiyan-Gurkan V.](#), [Miller R.A.](#), [Kaneene J.B.](#), [Kiupel, M.](#) 2007. Cellular proliferation in canine cutaneous mast cell tumors: associations with c-KIT and its role in prognostication. *Veterinary Pathology*. 44: 298-308.

Webster J.D., Yuzbasiyan-Gurkan V., Thamm, D.H., Hamilton, E., Kiupel, M. 2008. Evaluation of prognostic markers for canine mast cell tumors treated with vinblastine and prednisone. *BMC Veterinary Research*. 4: 32.

Welle M.M., Bley C.R., Howard J., Rüfenacht S. 2008. Canine mast cell tumours: a review of the pathogenesis, clinical features, pathology and treatment. *Veterinary Dermatology*. 19: 321–339.

Werner H. 2011. Tumor suppressors govern insulin-like growth factor signaling pathways: implications in metabolism and cancer. *Oncogene*. disponível em: <http://www.nature.com/onc/journal/vaop/ncurrent/full/onc2011447a.html>.

White C.R., Hohenhaus A.E., Kelsey J. Procter-Gray E. 2011. Cutaneous mast cell tumors: association with spay/neuter status, breed, body size, and phylogenetic cluster. *Journal of American Animal Hospital Association*. 47: 210-216.

Wullschleger S., Loewith R., Hall M. 2006. Tor signaling in growth and metabolism. *Cell*. 124: 471–484.

Yakar S., Liu J., Stannard B., Butler A., Accili D., Sauer B. Leroith, D. 1999. Normal growth and development in the absence of hepatic insulin-like growth factor I. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America – Developmental Biology*. 96: 7234-7239.

Yee D. & Wood T.L. 2008. The IGF System in Mammary Development and Breast Cancer. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*. 13: 351-352.

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

Pesquisa Veterinária Brasileira

Apresentação de manuscritos

1. Os trabalhos devem ser organizados, sempre que possível, em Título, ABSTRACT, RESUMO, INTRODUÇÃO, MATERIAL E MÉTODOS, RESULTADOS, DISCUSSÃO, CONCLUSÕES (ou combinação destes dois últimos), Agradecimentos e REFERÊNCIAS:

a) o Título do artigo deve ser conciso e indicar o conteúdo do trabalho; pormenores de identificação científica devem ser colocados em MATERIAL E MÉTODOS.

b) O(s) Autor(es) deve(m) sistematicamente encurtar os nomes, tanto para facilitar sua identificação científica, como para as citações bibliográficas. Em muitos casos isto significa manter o primeiro nome e o último sobrenome e abreviar os demais sobrenomes:

Paulo Fernando de Vargas Peixoto escreve Paulo V. Peixoto ou Peixoto P.V.; Franklin Riet-Correa Amaral escreve Franklin Riet-Correa ou Riet-Correa F.; Silvana Maria Medeiros de Sousa Silva poderia usar Silvana M.M.S. Silva, inverso Silva S.M.M.S., ou Silvana M.M. Sousa-Silva, inverso, Sousa-Silva S.M.M., ou mais curto, Silvana M. Medeiros-Silva, e inverso, Medeiros-Silva S.M.; para facilitar, inclusive, a moderna indexação, recomenda-se que os trabalhos tenham o máximo de 8 autores:

c) o ABSTRACT deverá ser apresentado com os elementos constituintes do RESUMO em português, podendo ser mais explicativos para estrangeiros. Ambos devem ser seguidos de "INDEX TERMS" ou "TERMOS DE INDEXAÇÃO", respectivamente;

d) o RESUMO deve apresentar, de forma direta e no passado, o que foi feito e estudado, indicando a metodologia e dando os mais importantes resultados e conclusões. Nos trabalhos em inglês, o título em português deve constar em negrito e entre colchetes, logo após a palavra RESUMO;

- e) a INTRODUÇÃO deve ser breve, com citação bibliográfica específica sem que a mesma assuma importância principal, e finalizar com a indicação do objetivo do trabalho;
- f) em MATERIAL E MÉTODOS devem ser reunidos os dados que permitam a repetição do trabalho por outros pesquisadores. Na experimentação com animais, deve constar a aprovação do projeto pela Comissão de Ética local;
- g) em RESULTADOS deve ser feita a apresentação concisa dos dados obtidos. Quadros devem ser preparados sem dados supérfluos, apresentando, sempre que indicado, médias de várias repetições. É conveniente, às vezes, expressar dados complexos por gráficos (Figuras), ao invés de apresentá-los em Quadros extensos;
- h) na DISCUSSÃO devem ser discutidos os resultados diante da literatura. Não convém mencionar trabalhos em desenvolvimento ou planos futuros, de modo a evitar uma obrigação do autor e da revista de publicá-los;
- i) as CONCLUSÕES devem basear-se somente nos resultados apresentados no trabalho;
- j) Agradecimentos devem ser sucintos e não devem aparecer no texto ou em notas de rodapé;
- k) a Lista de REFERÊNCIAS, que só incluirá a bibliografia citada no trabalho e a que tenha servido como fonte para consulta indireta, deverá ser ordenada alfabeticamente pelo sobrenome do primeiro autor, registrando-se os nomes de todos os autores, em caixa alta e baixa (colocando as referências em ordem cronológica quando houver mais de dois autores), o título de cada publicação e, abreviado ou por extenso (se tiver dúvida), o nome da revista ou obra, usando as instruções do "Style Manual for Biological Journals" (American Institute for Biological Sciences), o "Bibliographic Guide for Editors and Authors" (American Chemical Society, Washington, DC) e exemplos de fascículos já publicados (www.pvb.com.br).

2. Na elaboração do texto deverão ser atendidas as seguintes normas:

- a) os trabalhos devem ser submetidos seguindo o exemplo de apresentação de fascículos recentes da revista e do modelo constante do site sob "Instruções aos Autores" (www.pvb.com.br). A digitalização deve ser na

fonte Helvética, corpo 11, entrelinha simples; a página deve ser no formato A4, com 2cm de margens (superior, inferior, esquerda e direita), o texto deve ser corrido e não deve ser formatado em duas colunas, com as legendas das figuras e os Quadros no final (logo após as REFERÊNCIAS). As Figuras (inclusive gráficos) devem ter seus arquivos fornecidos separados do texto. Quando incluídos no texto do trabalho, devem ser introduzidos através da ferramenta "Inserir" do Word; pois imagens copiadas e coladas perdem as informações do programa onde foram geradas, resultando, sempre, em má qualidade;

b) a redação dos trabalhos deve ser concisa, com a linguagem, tanto quanto possível, no passado e impessoal; no texto, os sinais de chamada para notas de rodapé serão números arábicos colocados em sobrescrito após a palavra ou frase que motivou a nota. Essa numeração será contínua por todo o trabalho; as notas serão lançadas ao pé da página em que estiver o respectivo sinal de chamada. Todos os Quadros e todas as Figuras serão mencionados no texto. Estas remissões serão feitas pelos respectivos números e, sempre que possível, na ordem crescente destes. ABSTRACT e RESUMO serão escritos corridamente em um só parágrafo e não deverão conter citações bibliográficas.

c) no rodapé da primeira página deverá constar endereço profissional completo de todos os autores e o e-mail do autor para correspondência, bem como e-mails de outros autores;

d) siglas e abreviações dos nomes de instituições, ao aparecerem pela primeira vez no trabalho, serão colocadas entre parênteses e precedidas do nome por extenso;

e) citações bibliográficas serão feitas pelo sistema "autor e ano"; trabalhos de até três autores serão citados pelos nomes dos três, e com mais de três, pelo nome do primeiro, seguido de "et al.", mais o ano; se dois trabalhos não se distinguirem por esses elementos, a diferenciação será feita através do acréscimo de letras minúsculas ao ano, em ambos. Trabalhos não consultados na íntegra pelo(s) autor(es), devem ser diferenciados, colocando-se no final da respectiva referência, "(Resumo)" ou "(Apud Fulano e o ano.)"; a referência do

trabalho que serviu de fonte, será incluída na lista uma só vez. A menção de comunicação pessoal e de dados não publicados é feita no texto somente com citação de Nome e Ano, colocando-se na lista das Referências dados adicionais, como a Instituição de origem do(s) autor(es). Nas citações de trabalhos colocados entre parênteses, não se usará vírgula entre o nome do autor e o ano, nem ponto-e-vírgula após cada ano; a separação entre trabalhos, nesse caso, se fará apenas por vírgulas, exememplo: (Christian & Tryphonas 1971, Priester & Haves 1974, Lemos et al. 2004, Krametter-Froetcher et. al. 2007);

f) a Lista das REFERÊNCIAS deverá ser apresentada isenta do uso de caixa alta, com os nomes científicos em itálico (grifo), e sempre em conformidade com o padrão adotado nos últimos fascículos da revista, inclusive quanto à ordenação de seus vários elementos.

3. As Figuras (gráficos, desenhos, mapas ou fotografias) originais devem ser preferencialmente enviadas por via eletrônica. Quando as fotos forem obtidas através de câmeras digitais (com extensão ".jpg"), os arquivos deverão ser enviados como obtidos (sem tratamento ou alterações). Quando obtidas em papel ou outro suporte, deverão ser anexadas ao trabalho, mesmo se escaneadas pelo autor. Nesse caso, cada Figura será identificada na margem ou no verso, a traço leve de lápis, pelo respectivo número e o nome do autor; havendo possibilidade de dúvida, deve ser indicada a parte inferior da figura pela palavra "pé". Os gráficos devem ser produzidos em 2D, com colunas em branco, cinza e preto, sem fundo e sem linhas. A chave das convenções adotadas será incluída preferentemente, na área da Figura; evitar-se-á o uso de título ao alto da figura. Fotografias deverão ser apresentadas preferentemente em preto e branco, em papel brilhante, ou em diapositivos ("slides"). Para evitar danos por grampos, desenhos e fotografias deverão ser colocados em envelope.

Na versão online, fotos e gráficos poderão ser publicados em cores; na versão impressa, somente quando a cor for elemento primordial a impressão das figuras poderá ser em cores.

4. As legendas explicativas das Figuras conterão informações suficientes para

que estas sejam compreensíveis, (até certo ponto auto-explicativas, com independência do texto) e serão apresentadas no final do trabalho.

5. Os Quadros deverão ser explicativos por si mesmos e colocados no final do texto. Cada um terá seu título completo e será caracterizado por dois traços longos, um acima e outro abaixo do cabeçalho das colunas; entre esses dois traços poderá haver outros mais curtos, para grupamento de colunas. Não há traços verticais. Os sinais de chamada serão alfabéticos, recomeçando, se possível, com "a" em cada Quadro; as notas serão lançadas logo abaixo do Quadro respectivo, do qual serão separadas por um traço curto à esquerda.

CONCLUSÕES GERAIS

- As expressões de SCF e seu receptor c-KIT estão associadas e podem refletir a interação entre a isoforma ancorada à membrana do SCF e a internalização do c-KIT.
- Observamos a associação entre a expressão de IGF-1 e o porte dos animais sugerindo que, animais de porte grande expressam mais RTKs e isso levaria a uma prevalência maior do MTC nessas raças.
- A proliferação celular e o índice mitótico estão inversamente relacionados à expressão de SCF.
- O grau histológico de acordo com Kiupel et al. (2011) foi associado à expressão de SCF com predomínio de MTCs de baixo grau de malignidade.
- A relação entre IGF-1 e SCF pode refletir o estado de diferenciação dos tumores e explica a associação com MTCs bem diferenciados.
- As expressões de IGF-1 e m-TOR foram associadas e podem refletir a integralização das vias sinalizadoras favorecendo o desenvolvimento do MTC canino.
- A localização anatômica dos tumores foi associada à expressão intensa de SCF.

BIBLIOGRAFIA

AMON, U.; HARTMANN, K.; HORNY, H-P.; NOWAK, A. Mastocytosis – an update. *Journal of the German Society of Dermatology.*, v.8, p.659-712, 2010.

ANDERSON, D.M.; LYMAN, S.D.; BAIRD, A.; WIGNALL, J.M.; EISENMAN, J.; RAUCH, C.; MARCH, C.J.; BOSWELL, H.S.; GIMPEL, S.D.; COSMAN, D.; WILLIAMS, D.E. Molecular cloning of mast cell growth factor, a hematopoietin that is active in both membrane bound and soluble forms. *Cell*, v.63, p.235-243, 1990.

ANDRADE, V.P.; CUNHA, I.W.; SILVA, E.M.; AYALA, F.; SATO, Y, FERREIRA, S.S.; NASCIMENTO, C.F.; SOARES, F.A. O arranjo em matriz de amostras teciduais (*tissue microarray*): larga escala e baixo custo ao alcance do patologista. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v.43, p.55-60, 2007.

ANNUNZIATA, M.; GRANATA, R.; GHIGO, E. The IGF system. *Acta Diabetologica*, n. 1, v. 48, p. 1-9, 2011.

ASHMAN, L.K.; CAMBARERI, A.C.; TO, L.; LEVINSKY, R.L.; JUTTNER, C.A. Expression of the YB5.B8 antigen (c-kit proto-oncogene product) in normal human bone marrow. *Blood*, v.78, p.30-37, 1991.

BAI, X.; JIANG, Y. Key factors in m-TOR regulation. *Cellular and Molecular Life Science*, v.67, p.239–253, 2010.

BALLOU, L.M.; LIN, R.Z. Rapamycin and mTOR kinase inhibitors. *Journal of Chemical Biology*, v.1, p.27-36, 2008.

BASERGA, R. The insulin receptor substrate-1: a biomarker for cancer? *Experimental Cell Research*, v.315, p.727–32, 2009.

BELFIORE, A.; FRASCA, F.; PANDINI, G.; SCIACCA, L.; VIGNERI, R. Insulin receptor isoforms and insulin receptor/insulin-like growth factor receptor hybrids in physiology and disease. *Endocrine Reviews*, v.30, p.586–623, 2009.

BERNSTAM, F.M.; ÂNGULO, A.M.G. Targeting the mTOR Signaling Network for Cancer Therapy. *Journal of Clinical Oncology*, n.13, v.27, p.2278-2287, 2009.

BESMER, P.; MURPHY, P.C.; GEORGE, P.C.; QIU, F.; BERGOLD, P.J.; LEDERMAN, L.; SNYDER, H.W.J.R.; BRODEUR, D.; ZUCKERMAN, E.E.; HARDY, W.D. A new acute transforming feline retrovirus and relationship of its oncogene v-kit with the protein kinase gene family. *Nature*, v.320, p.415-421, 1986.

BOSTOCK, D.E. The prognosis following surgical removal of mastocytomas in dogs. *Journal of Small Animal Practice*, v.14, p.27-41, 1973.

BRIDDELL, R.A.; BRUNO, E.; COOPER, R.J.; BRANDT, J.E.; HOFFMAN, R. Effect of c-kit ligand and on in vitro human megakaryocytopoiesis. *Blood*, v.78, p.3785-3790, 1991.

BRODEY, R.S. Canine and feline neoplasia. *Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine*, v.14, p.309-354, 1970.

BUBENDORF, L.; NOCITO, A.; HOLGER, M.; SAUTER, G. Tissue microarray (TMA) technology: miniaturized pathology archives for high-throughput in situ studies. *Journal of Pathology*, v.195, p.72-79, 2001.

CAFFERKEY, R.; YOUNG, P.R.; McLAUGHLIN, M.M.; BERGSMA, D.J.; KOLTIN, D.; SATHE, G.M.; FAUCET, L.; ENG, W-K.; JOHNSON, R.K.; LIVI, G.P. Dominant Missense Mutations in a Novel Yeast Protein Related to

Mammalian Phosphatidylinositol 3-Kinase and VPS34 Abrogate Rapamycin Cytotoxicity. *Molecular and Cellular Biology*, n.10, v.13, p.6012-6023, 1993.

CAHALANE, A.K.; PAYNE, S.; BARBER, L.G.; DUDA, L.E.; HENRY, C.; J MAULDIN, G.E.; FRIMBERGER, A.E.; COTTER, S.M.; MOORE, A.S. Prognostic factors for survival of dogs with inguinal and perineal mast cell tumors treated surgically with or without adjunctive treatment: 68 cases (1994-2002). *Journal of American Veterinary Medicine Association*, v.225, p.401-408, 2004.

CAMPS-PALAU., M.A.; LEIBMAN, N.F.; ELMSLIE, R.; LANA, S.E.; PLAZA, S.; MCKNIGHT, J.A.; RISBON, R.; BERGMAN, P.J. Treatment of canine mast cell tumours with vinblastine, cyclophosphamide and prednisone: 35 cases (1997-2004). *Veterinary Comparative Oncology*, v.5, n.156-167, 2007.

COOPER, M.; TSAI, X.; BENNETT. P. Combination CCNU and vinblastine chemotherapy for canine mast cell tumours: 57 cases. *Veterinary Comparative Oncology*, v.7, p.196-206, 2009.

CRIVELLATO, E.; BELTRAMI, C.A.; MALLARDI, F.; RIBATTI, D. Paul Ehrlich's doctoral thesis: a milestone in the study of mast cells. *British Journal of Haematology*, v.23, p.19-21, 2003.

DAVIES, D.R.; WYATT, K.M.; JARDINE, J.E.; ROBERTSON, I.D.; IRWIN, P.J. Vinblastine and prednisolone as adjunctive therapy for canine cutaneous mast cell tumors. *Journal of American Animal Hospital Association*, v.40, p.124-130, 2004.

DAUGHADAY, W.H.; HALL K.; RABEN, M.S.; SALMON, W.D.JR.; VAN DEN BRANDE, J.L.; VAN WYK, J.J. Somatomedin: proposed designation for sulphation factor. *Nature*, v.235, p.107, 1972.

DEVRIES, C.; ESCOBEDO, J.A.; UENO, H.; HOUCK, K.; FERRARA, N.; WILLIAMS, L.T. The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science*, v.255, p.989-991, 1992.

DJIDJA, M.C.; CLAUDE, E.; SNEL, M.F.; FRANCESE, S.; SCRIVEN, P.; CAROLAN, V.; CLENCH, M.R. Novel molecular tumour classification using MALDI-mass spectrometry imaging of tissue micro-array. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v.397, p.587-601, 2010.

DOBASHI, Y.; WATANABE, Y.; MIWA, C.; SUZUKI, S.; KOYAMA, S. Mammalian target of rapamycin: a central node of complex signaling cascades. *International Journal of Clinical Experimental Pathology*, n.4, v.5, 476-495, 2011.

DOBSON, J.; COHEN, S.; GOULD, S. Treatment of canine mast cell tumours with prednisolone and radiotherapy. *Veterinary Comparative Oncology*, v.2, p.132-141, 2004.

DOWNING, S.; CHIEN, M.B.; KASS, P.H.; MOORE, P.E.; LONDON, C.A. Prevalence and importance of internal tandem duplications in exons 11 and 12 of c-kit in mast cell tumors of dogs. *American Journal of Veterinary Research*, v.63, p.1718-1723, 2002.

DUMONT, F.J.; MELINO, M.R.; STARUCH, M.J.; KOPRAK, S.L.; FISHER, P.A.; SIGAL, N.H. The immunosuppressive macrolides FK506 and rapamycin act as reciprocal antagonists in murine T cells. *Journal of Immunology*, v.144, p.1418-1424, 1990.

ENDICOTT M.M.; CHARNEY, S.C.; MCKNIGHT, J.A.; LOAR, A.S.; BARGER, A.M.; BERGMAN, P.J. Clinicopathological findings and results of bone marrow aspiration in dogs with cutaneous mast cell tumours: 157 cases (1999-2002). *Veterinary Comparative Oncology*, v.5, n.31-37, 2007.

FINNIE, J.W.; BOSTOCK, D.E. Skin neoplasia in dogs. *Australian Veterinary Journal*, v.55, p.602-604, 1979.

FINOTELLO, R.; MARCHETTI, V.; NESI, G.; ARVIGO, M.; BARONI, G.; VANNOZZI, I.; MINUTO, F. Pancreatic Islet Cell Tumor Secreting Insulin-Like Growth Factor Type-II in a Dog. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v.23, p.1289–1292, 2009.

FULCHER RP, LUDWIG LL, BERGMAN PJ, NEWMAN SJ, SIMPSON AM, PATNAIK AK. Evaluation of a two-centimeter lateral surgical margin for excision of grade I and grade II cutaneous mast cell tumors in dogs. *Journal of American Veterinary Medicine Association*, v.228, p.210-215, 2006.

GALLAGHER, E.J.; LEROITH, D. Minireview: IGF, insulin, and cancer. *Endocrinology*, v.152, n.7, p.2546-2551, 2011.

GERRITSEN, R.J.; TESKE, E.; KRAUS, J.S.; RUTTEMAN, G.R. Multi-agent chemotherapy for mast cell tumours in the dog. *Veterinary Quartely*, v.20, p. 28-31, 1998.

GIEGER, T.L.; THEON, 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.17, p.687-692, 2003.

GIL DA COSTA, R.M.; MATOS, E.; REMA, A.; LOPES, C.; PIRES, M.A.; GÄRTNER, F. CD117 immunoexpression in canine mast cell tumours: correlations with pathological variables and proliferation markers. *BioMed Central Veterinary Research*, n.3, v.19, p.1-7, 2007.

GOLDSCHMIDT, M.H.; SHOFER, F.S. *Skin Tumors of the dog and cat*. Oxford: Pergamon Press; 1992. p.85-89.

GORDON, I.K.; YE, Y.; 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*, n.8, v.69, p.1079-1084, 2008.

GRABAREK, J.; LEVINE, J.D.; GROOPMAN, J.E.; ZSEBO, K.M.; AVRAHAM, H. Human stem cell factor (c-kit ligant) modulates platelet aggregation. *Blood*, v.78 (supl 1), p.151a, 1991.

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.

HAYES, A.; ADAMS, V.; SMITH, K.; MAGLENNON, G.; MURPHY, S. Vinblastine and prednisolone chemotherapy for surgically excised grade III canine cutaneous mast cell tumours. *Veterinary Comparative Oncology*, v.5, 168-176, 2007.

HEAD, K.W. Cutaneous mast cell tumours in the dog, cat and ox. *The British Journal of Dermatology*, v.70, n.11, p.389-408, 1958.

HEITMAN, J.; MOWA, N.R.; HALL, M.N. Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. *Science*, v.253, p.905-909, 1991.

HOUCHENS, D.P.; OVEJERA, A.A.; RIBLET, S.M.; SLAGEL, D.E. Human brain tumor xenografts in nude mice as a chemotherapy model. *European Journal of Cancer Clinical Oncology*, v.9, p.799-805, 1983.

HWANG, S-K.; KIM, H-H. The functions of m-TOR in ischemic disease. *BMB reports*, n.8, v.44, p. 506-511, 2011.

IBRAHIM, Y.H.; YEE, D. Insulin-like growth factor-I and cancer risk. *Growth Hormone & IGF Research*, v.14, p. 261-269, 2004.

IEMURA, A.; TSAI, M.; ANDO, A.; WERSHIL, B.K.; GALLI, S.J. The c-kit ligand, stem cell factor, promotes mast cell survival by suppressing apoptosis. *American Journal of Pathology*, v.144, n.2, p.321-328, 1994.

ISOTANI, M.; ISHIDA, N.; TOMINAGA, M.; TAMURA, K.; YAGIHARA, H.; OCHI, S.; KATO, R.; KOBAYASHI, T.; FUJITA, M.; FUJINO, Y.; SETOGUCHI, A.; ONO, K.; WASHIZU, T.; BONKOBARA, M. Effect of tyrosine kinase inhibition by imatinib mesylate on mast cell tumors in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v.22, p.985-988, 2008.

JONES, R.A.; CAMPBELL, C.I.; WOOD, G.A.; PETRIK, J.J.; MOOREHEAD, R.A. Reversibility and recurrence of IGF-IR-induced mammary tumors. *Oncogene*, v.28, p.2152–2162, 2009.

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*, n.2, v.70, p.263-269, 2009.

KIM, D-H.; SARBASSOV, D.; ALI, S.M.; KING, J.E.; LATEK, R.R.; BROMAGE, H.E.; TEMPST, P.; SABATINI, D.M. mTOR Interacts with Raptor to Form a Nutrient-Sensitive Complex that Signals to the Cell Growth Machinery. *Cell*, v.110, p.163-175, 2002.

KONONEN, J.; BUBENDORF, L.; KALLIONIEMI, A.; BÄRLUND, M.; SCHRAML, P.; LEIGHTON, S.; TORHORST, J.; MIHATSCH, M.J.; SAUTER, G.; KALLIONIEMI, O.P. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nature Medicine*, v.4, p.844-847, 1998.

KRICK, E.L.; BILLINGS, A.P.; SHOFR, F.S.; WATANABE, S.; SORENMO, K.U. Cytological lymph node evaluation in dogs with mast cell tumours: association with grade and survival. *Veterinary Comparative Oncology*, n.7, p.130-138, 2009.

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. A Physiology, Pathology, Clinical Medicine*, v.52, p.280-286, 2005.

KIUPEL, M.; WEBSTER, J.D.; BAILEY, K.L.; BEST, S.; DELAY, J.; DETRISAC, C.J.; FITZGERALD, S.D.; GAMBLE, D.; GINN, P.E.; GOLDSCHMIDT, M.H.; HENDRICK, M.J.; HOWERTH, E.W.; JANOVITZ, E.B.; LANGOHR, I.; LENZ, S.D.; LIPSCOMB, T.P.; MILLER, M.A.; MISDORP, W.; MOROFF, S.; MULLANEY, T.P.; NEYENS, I.; O'TOOLE, D.; RAMOS-VARA, J.; SCASE, T.J.; SCHULMAN, F.Y.; SLEDGE, D.; SMEDLEY, R.C.; SMITH, K.; SNYDER, P.W.; SOUTHORN, E.; STEDMAN, N.L.; STEFICEK, B.A.; STROMBERG, P.C.; VALLI, V.E.; WEISBRODE, S.E.; YAGER, J.; HELLER, J.; MILLER, R. Proposal of a two-tier histologic grading system for canine cutaneous mast cell tumors to more accurately predict biological behavior. *Veterinary Pathology*, v.48, p.147-155, 2011.

KUNZ, J.; HENRIQUEZ, R.; SCHNEIDER, U.; DEUTER-REINHARD, M.; MORRA, N.R.; HALL, M.N. Target of rapamycin in yeast, TOR2, is an essential phosphatidylinositol kinase homolog required for G1 progression. *Cell*, v.73, p.585-596, 1993.

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.

LAUFER AMORIM, R. *Biomarcadores prognósticos em mastocitomas cutâneos caninos, avaliação em lâminas de arranjo de matriz tecidual (TMA)*. 2011. 61f.

Tese (Livre Docente) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

LETARD, S. YANG, Y.; HANSSENS, K.; PALMÉRINI, F.; LEVENTHAL, P.S.; GUÉRY, S.; MOUSSY, A.; KINET, P.P.; HERMINE, O.; DUBREUIL, P. Gain-of-function mutations in the extracellular domain of kit are common in canine mast cell tumors. *Molecular Cancer Research*, v.6, n.7, p.1137-1144, 2008.

LEVINE, A.J.; FENG, Z.; MAK, T.W.; YOU, H.; JIN, S. Coordination and communication between the p53 and IGF-1-AKT-TOR signal transduction pathways. *Genes Development*, v.20, p.267-275, 2006.

LINNEKIN, D.; JELACIC, T.; SHIVAKRUPA. Stem cell factor. In: HENRY, H.L.; NORMAN, A.W. *Encyclopedia of hormones*. 1 ed. Maryland Heights: Academic Press, 2003, p. 393-403.

LONDON, C.A.; GALLI, S.J.; YUUKI, T.; HU, Z.Q.; HELFAND, S.C.; GEISLER, E.N. Spontaneous canine mast cell tumors express tandem duplications in the proto-oncogene kit. *Experimental Hematology*, v.27, p.689-697, 1999.

LIU, J.P.; BAKER, J.; PERKINS, A.S.; ROBERTSON, E.J.; EFSTRATIADIS, A. Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor-I (IGF-1) and type-1 IGF receptor (IGF1r). *Cell*, v.75, p.59–72, 1993.

MACEWEN, E.G.; PASTOR, J.; KUTZKE, J.; TSAN, R.; KURZMAN, I.D.; THAMM, D.H. WILSON, M.; RADINSKY, R. IGF-1 Receptor Contributes to The Malignant Phenotype in Human and Canine Osteosarcoma. *Journal of Cellular Biochemistry*, v.92, p.77-91, 2004.

MCNIECE, I.K.; BRIDDELL, R.A. Stem cell factor. *Journal of Leucocyte Biology*, v.57, p.14-22, 1995.

MEDLOCK, E.S.; YUNG, Y.P.; MCNIECE, I.; LANGLEY, K.; MINEO DALEY, C.; DUBBELL, C.; SMITH, K.; ZSEBO, K. Role of recombinant rat stem cell factor (rrSCF) in the stimulation of the mast cell lineage. *Blood*, v.76, (supl.1), p.155a, 1990.

MULLINS, M.N.; DERNELL, W.S.; WITHROW, S.J.; EHRHART, E.J.; THAMM, D.H.; LANA, S.E. 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 American Veterinary Medicine Association*, v.228, p.91-95, 2006.

NEUMANN, S.; WELLING, H.; THUERE. Insulin-like Growth Factor I Concentration in Dogs with Inflammatory and Neoplastic Liver Diseases. *Journal of Veterinary Medicine*, v. 54, p. 612-617, 2007.

NORTHRUP, N.C.; HOWERTH, E.W.; HARMON, B.G.; BROWN, C.A.; CARMICHEAL, K.P.; GARCIA, A.P.; LATIMER, K.S.; MUNDAY, J.S.; RAKICH, P.M.; RICHEY, L.J.; STEDMAN, N.L.; GIEGER, T.L. Variation among pathologists in the histologic grading of canine cutaneous mast cell tumors with uniform use of a single grading reference. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v.17, p.561-564, 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. *PLOSONE*, n.6, v.5, Epub.

PAPAYANOPOULOU, T.; BICE, M.; BROUDY, V.C.; ZSEBO, K.M. Isolation of c-kit receptor expressing cells from bone marrow, peripheral blood, and fetal liver: functional properties and composite antigenic profile. *Blood*, v.78, p. 1403-1412, 1991.

PATNAIK, A.K.; EHLER, W.J.; MACEWEN, E.G. Canine cutaneous mast cell tumors: morphologic grading and survival time 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*, v.77, p.76-78, 2008.

PRIESTER, W.A. Skin tumors in domestic animals. Data from 12 United States and Canadian colleges of veterinary medicine. *Journal of National Cancer Institute*, v.50, p.457-66, 1973.

QIU, F.; RAY, P.; BROWN, K.; BARKER, P.E.; JHANWAR, S. RUDDLE, F.H.; BESMER, P. Primary structure of c-kit: relationship with the CSF-1/PDGF receptor kinase family oncogenic activation of v-kit involves deletion of extracellular domain and C-terminus. *EMBO Journal*, v. 7, p.1003-1011, 1988.

RASSNICK, K.M.; BAILEY, D.B.; RUSSELL, D.S.; FLORY, A.B.; KISELOW, M.A.; INTILE, J.L.; MALONE, E.K.; BALKMAN, C.E.; BARNARD, S.M. A phase II study to evaluate the toxicity and efficacy of alternating CCNU and high-dose vinblastine and prednisone (CVP) for treatment of dogs with high-grade, metastatic or nonresectable mast cell tumours. *Veterinary Comparative Oncology*, v.8, p.138-152, 2010.

REBUZZI, L.; WILLMANN, M.; SONNECK, K.; GLEIXNER, K.V.; FLORIAN, S.; KONDO, R.; MAYERHOFER, M.; VALES, A.; GRUZE, A.; PICKL, W.F.; THALHAMMER, J.G.; VALENT, P. Detection of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptors Flt-1 and KDR in canine mastocytoma cells. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v.115, p. 320-333, 2007.

REGUERA, M.J.; RABANAL, R.M.; PUIGDEMONT, A.; FERRER, L. Canine mast cell tumors express stem cell factor receptor. *American Journal of Dermatopathology*, v.22, p.49-54, 2000.

ROSENZWEIG, S.A.; ATREYA, H.S. Defining the pathway to insulin-like growth factor system targeting in cancer. *Biochemical Pharmacology*, v. 80, p. 1115-1124, 2010.

ROSKOSKI, R.JR. Signaling by Kit protein-tyrosine kinase—the stem cell factor receptor, *Biochemical and Biophysical Research Communications*. v.337, p.1-13, 2005.

ROTHWELL, T.L.; HOWLETT, C.R.; MIDDLETON, D.J.; GRIFFITHS, D.A.; DUFF, B.C. Skin neoplasms of dogs in Sydney. *Australian Veterinary Journal*, v.64, p.161-164, 1987.

SAMANI, A.A.; YAKAR, S.; LEROITH, D.; BRODT, P. The role of the IGF system in cancer growth and metastasis: overview and recent insights. *Endocrinology Reviews*, v.28, p.20–47, 2007.

SARBASSOV, D.; GUERTIN, D.A.; ALI, S.M.; SABATINI, D.M. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the Rictor-mTOR Complex. *Science*, n.5712, v.307, p.1098-1101, 2005.

SEGUIN, B.; BESANCON, M.F.; MCCALLAN, J.L.; DEWE, L.L.; TENWOLDE, M.C.; WONG, E.K.; KENT, M.S. 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.933-940, 2006.

SEHGAL, S. N.; BAKER, H.; VEZINA, C. Rapamycin (Ay-22,989), A New Antifungal Antibiotic II. Fermentation, Isolation and Characterization. *The journal of Antibiotics*, n.10, v.28, p.727-732, 1975.

SFILIGOI, G.; RASSNICK, K.M.; SCARLETT, J.M.; NORTHRUP, N.C.; GIEGER, T.L. 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, p.1368-1374, 2005.

SONG, R.X.; BARNES, C.J.; ZHANG, Z.; BAO, Y.; KUMAR, R.; SANTEN, R.J. The role of Shc and insulin-like growth factor 1 receptor in mediating the translocation of estrogen receptor alpha to the plasma membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.101, p.2076–2081, 2004.

STANCLIFT, R.M.; GILSON, S.D. Evaluation of neoadjuvant prednisone administration and surgical excision in treatment of cutaneous mast cell tumors in dogs. *Journal of American Veterinary Medical Association*, v.32, p.53-62, 2002.

STRIMPAKOS, A.S.; KARAPANAGIOTOU, E.M.; SAIF, M.W.; SYRIGOS, K.N. The role of m-TOR in the management of solid tumors: An overview. *Cancer Treatment Reviews*, n.2, v.35, p.148-159, 2009.

TAKEUCHI, Y.; FUJINO, Y.; WATANABE, M.; NAKAGAWA, T.; OHNO, K.; SASAKIC, N.; SUGANO, S.; HAJIME TSUJIMOTO. Aberrant autophosphorylation of c-Kit receptor in canine mast cell tumor cell lines. *Veterinary Immunology and Immunopatology*, v.137, p.208-216, 2010.

THAMM, D.H.; VAIL, D.M. Mast cell tumors. In: WITHROW, S.J. & VAIL, D.M. *Small Animal Clinical Oncology*. 4 ed. Philadelphia: WB Saunders, 2007. p.402-424.

THAMM, D.H.; TUREK, M.M.; VAIL, D.M. 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, p.581-587, 2006.

THAMM, D.H; VAIL, D.M. Mast cell tumors. In: WITHROW, S.J. & VAIL, D.M. *Small Animal Clinical Oncology*. 4 ed. Philadelphia: WB Saunders, 2007. p.402-424.

THOMSON, A.W.; HETH R. TURNQUIST, H.R.; RAIMONDI, G. Immunoregulatory functions of mTOR inhibition. *Nature Reviews*, v.9, p.324-337, 2009.

THOMPSON, J.J.; PEARL, D.L.; YAGER, J.A.; BEST, S.J.; COOMBER, B.L.; FOSTER, R.A. Canine subcutaneous mast cell tumor: characterization and prognostic indices. *Veterinary Pathology*, v.48, p.156-168, 2011a.

THOMPSON, J.J.; YAGER, J.A.; BEST, S.J.; PEARL, D.L.; COOMBER, B.L.; TORRES, R.N.; KIUPEL, M.; FOSTER, R.A. Canine subcutaneous mast cell tumors: proliferation markers and c-kit evaluation as prognostic indices. *Veterinary Pathology*, v.48, p.169-181, 2011b.

TOKOZ, D.; ZSEBO, K.M.; SMITH, K.A. Support of human hematopoiesis in long-term bone marrow cultures by murine stromal cells selectively expressing the membrane bound and secreted forms of the human homolog of the steel gene product, stem cell factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.89, p.7350-7356, 1992.

TURREL, J.M.; KITCHELL, B.E.; MILLER, L.M.; THEON, A. Prognostic factors for radiation treatment of mast cell tumor in 85 dogs. *Journal of American Veterinary Medical Association*, v.193, p.936-940, 1988.

ULICH, T.R.; DELCASTILLO.; J.; YI, E.S.; YIN, S.M.; MCNIECE, I.; YUNG, Y.P.; ZSEBO, K.M. Hematologic effects of stem cell factor in vivo and in vitro in rodents. *Blood*, v.78, p.645-650, 1991.

VILLAMIL, J.A.; HENRY, C.J.; BRYAN, J.N.; ELLERSIECK, M.; SHULTZ, L.; TYLER, J.W.; HAHN, A.W. Identification of the most common cutaneous

neoplasms in dogs and evaluation of the breed and age distributions for selected neoplasms. *Journal of American Veterinary Medical Association*, v.239, n.7, p.960-965, 2011.

VEZINA, C.; KUDELSK, A.; SEHGAL, S.N. Rapamycin (Ay-22,989), A New Antifungal Antibiotic II. Taxonomy Of The Producing Streptomycete And Isolation Of The Active Principle. *The Journal of Antibiotics*, n.10, v. 28, p.721-726.

WATANABE, R.; WEI, L.; HUANG, J. mTOR Signaling, Function, Novel Inhibitors, and Therapeutic Targets. *The Journal Of Nuclear Medicine*, n.4, v.52, 497-500, 2011.

WEBSTER, J.D.; KIUPEL, M.; KANEENE, J.B.; MILLER, R.; YUZHASIYAN-GURKAN, V. The use of KIT and tryptase expression patterns as prognostic tools for canine cutaneous mast cell tumors. *Veterinary Pathology*. v. 41, p. 371-377, 2004.

WEBSTER, J.D.; YUZHASIYAN-GURKAN, V.; KANEENE, J.B.; MILLER, R.; RESAU, J.H.; KIUPEL, M. The role of c-KIT in tumorigenesis: evaluation in canine cutaneous mast cell tumors. *Neoplasia*, v.8, p.104-111, 2006.

WEBSTER, J.D.; YUZHASIYAN-GURKAN, V.; THAMM, D.H.; HAMILTON, E.; KIUPEL, M. Evaluation of prognostic markers for canine mast cell tumors treated with vinblastine and prednisone. *BMC Veterinary. Research*, v.4, p.32, 2008.

WEBSTER, J.D.; DENNIS, M.M.; DERVISIS, N.; HELLER, J.; BACON, N.J.; BERGMAN, P.J.; BIENZLE, D.; CASSALI, G.; CASTAGNARO, M.; CULLEN, J.; ESPLIN, D.G.; PEÑA, L.; GOLDSCHMIDT, M.H.; HAHN, K.A.; HENRY, C.J.; HELLMÉN, E.; KAMSTOCK, D.; KIRPENSTEIJN, J.; KITTCHELL, B.E.; LAUFER AMORIM, R.; LENZ, S.D.; LIPSCOMB, T.P.; MCENTEE, M.; MCGILL, L.D.; MCMANUS, P.M.; MOORE, A.S.; MOORE, P.F.; MOROFF, S.D.;

NAKAYAM, H.; NORTHRUP, N.C.; SARLI, G.; SCASE, T.; SORENMO, K.; SCHULMAN, F.Y.; SHOIEB, A.M.; SMEDLEY, R.C.; SPANGLER, W.L.; TESKE, E.; THAMM, D.H.; VALLI, V.E.; VERNAU, W.; VON, EULER, H.; WITHROW, S.J.; WEISBRODE, S.E.; YAGER, J. KIUPEL, M. Recommended Guidelines for the Conduct and Evaluation of Prognostic Studies in Veterinary Oncology. *Veterinary Pathology*, v.48, p.7-18, 2011.

WEISS, M.; YETZ-ALDAPE, J.; CROSIER, P.S.; NATHAN, D.G.; SIEFF, C.A. Committed hematopoietic progenitors of human bone marrow are restricted to the CD38⁺34⁺ fraction whereas c-kit expression is greatest in CD38⁻34⁺ cells. *Blood*, v.78, (supl.1), p.161a, 1991.

WEISSE, C.; SHOFER, F.S.; SORENMO, K. Recurrence rates and sites for grade II canine cutaneous mast cell tumors following complete surgical excision. *Journal of American Animal Hospital Association*, v.38, p.71-73, 2002.

WHITE, C.R.; HOHENHAUS, A.E.; KELSEY, J.; PROCTER-GRAY, E. Cutaneous mast cell tumors: association with spay/neuter status, breed, body size, and phylogenetic cluster. *Journal of American Animal Hospital Association*, v.47, p.210-216, 2011.

XIANG, X.; ZHAO, J.; XU, G.; LI, Y.; ZHANG, W. mTOR and the differentiation of mesenchymal stem cells. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, v.43, p.501-510, 2011.

YARDEN; Y.; KUANG, W-J.; YANG-FENG, T.; COUSSENS, L.; MUNEMITSU, S.; DULL, T.J., CHEN, E.; SCHLESSINGER, J.; FRANCKE, U.; ULLRICH, A. Human proto-oncogene c-kit: a new cell surface receptor tyrosine kinase for an unidentified ligand. *EMBO Journal*, v. 6, p.3341-3351, 1987.

ZINZALLA, V.; STRACKA, D.; OPPLIGER, W.; HALL, M.N. Activation of mTORC2 by Association with the Ribosome. *Cell*, v.144, p.757–768, 2011.

ZSEBO, K.M.; WYPYCH, J.; MCNIECE, J.K.; JU, H.S.; SMITH, K.A.; KARKARE, S.B.; SACHDEV, R.K.; YUSCHENKOFF, V.N.; BIRKETT, N.C.; WILLAMS, L.R.; SATYAGAL, V.N.; TUNG, W.; BOSSELMAN, R.A.; MENDIAZ, E.A.; LANGLEY, K.E. Identification, purification, and biological characterization of hematopoietic stem cell factor from buffalo rat liver conditioned médium. *Cell*, v.63, p.195-201, 1990a.

ZSEBO, K.M.; WILLIAMS, D.A.; GEISSLER, E.N.; BROUDY, V.C.; MARTIN, F.H.; ATKINS, H.L.; HSU, R.Y.; BIRKETT, N.C.; OKINO, K.H.; MURDOCK, D.C.; JACOBSEN, F.W.; ANGLE, K.E.; SMITH, K.A.; TAKEISHI, T.; CATTANACH, B.M.; GALLI, S.J.; SUGGS, S.V. Stem cell factor (SCF) is encoded at the Sl locus of the mouse and is the ligand for the c-kit tyrosine kinase receptor. *Cell*, v. 63, p.213-224, 1990b.

ANEXOS

TABELA 2. Distribuição das variáveis associadas às classificações patológicas segundo as proteínas analisadas no MTC cutâneo canino.

Variáveis	MTC canino (n)													
	Grau Histológico Patnaik et al. (1984)				Grau Histológico Kiupel et al. (2011)				IM		KI-67		Padrão de marcação c-KIT	
	1	2	3	p	Alto	Baixo	p	≤5	>5	p	≥7	>7	Membranoso	Citoplasmático
SCF escore														
4	11	90	32	>0,05	34	99	0,0001	118	15	>0,05	90	43	40	93
SCF intensidade														
Fraco	4	41	8		9	42		46	5		36	15	18	33
Moderado	7	38	9	>0,05	12	44	0,0071	53	3	0,0071	42	14	15	41
Forte	0	11	15		13	13		19	7		12	14	7	19
IGF-1 escore														
0	1	3	3		3	4		6	1		3	4	4	3
1	2	10	8		9	11		12	8		9	11	7	13
2	0	5	2	>0,05	2	5	>0,05	6	1	0,0021	5	2	1	6
3	2	17	3		4	18		21	1		15	7	13	9
4	5	49	15		15	54		65	4		51	18	12	57
IGF-1 intensidade														
Sem marcação	1	3	3		3	4		6	1		3	4	4	3
Fraco	4	42	15		14	47		51	10		41	20	23	38
Moderado	5	27	11	>0,05	13	30	0,0060	41	2	0,0057	28	15	5	38
Forte	0	12	2		3	11		12	2		11	3	5	9
m-TOR escore														
0	0	3	0		0	3		3	0		2	1	2	1
1	0	3	8		5	6		7	4		2	9	1	10
2	0	1	1	0,0314	0	2	0,0191	1	1	0,5013	2	0	1	1
3	2	13	2		5	12		14	3		11	6	3	14
4	10	63	21		24	70		87	7		67	27	31	63
m-TOR intensidade														
Sem marcação	0	3	0		0	3		3	0		2	1	2	1
Fraco	2	19	8		6	23		23	6	0,0130	18	11	13	16
Moderado	5	36	10	>0,05	13	38	0,0059	46	5	0,0092	36	15	12	39
Forte	5	25	14		15	29		40	4		28	16	11	33

(n): número de casos , IM: índice mitótico ≤5 e >5: pontos de corte para o IM em número de células, 7 e >7: pontos de corte para KI-67 em número de células

TABELA 3: Distribuição das variáveis epidemiológicas segundo as proteínas analisadas no MTC canino.

Variáveis		MTC canino (n)																					
		Idade					Sexo			Porte				Localização									
Jovem	Meia idade	Idoso	p	F	M	p	Pequeno	Médio	Grande	Gigante	p	Cabeça	Tronco	Membros	Períneo	Esacro	Vulva	Cauda	p				
SCF																							
escore		4	19	63	7	7	<0,0001	60	56	>0,05	13	7	98	7	>0,05	7	34	22	2	10	1	2	>0,05
SCF intensidade																							
Moderado	Fraco	9	25	3	22	24		4	4	38	4		4	15	10	0	3	0	0				
		5	26	4	<0,0001	25	22	>0,05	7	1	40	2	>0,05	3	13	8	2	50	2	0	0	<0,0001	
	Forte	5	12	0	13	10		2	2	20	1		0	7	4	0	2	1	0	0			
IGF-1 escore																							
IGF-1 intensidade	0	2	4	0	3	4		0	2	4	1		0	4	1	0	0	0	0				
	1	2	13	0	10	8		3	1	16	0		1	8	4	0	2	0	0				
	2	0	4	1	4	2	>0,05	1	0	6	0	>0,05	0	2	2	0	1	0	0		>0,05		
	3	2	13	2	8	12		4	0	16	1		3	4	5	1	2	0	0				
	4	11	28	3	32	28		5	2	53	5		3	14	10	1	5	1	1				
IGF-1 intensidade																							
Sem marcação		2	4	0	3	4		0	2	4	1		0	4	1	0	0	0	0				
	Fraco	9	32	4	27	27	>0,05	9	2	43	6	0,0334	4	20	10	2	2	1	0			>0,05	
	Moderado	5	21	2	22	17		4	1	34	0		3	7	9	0	5	0	1				
m-TOR escore																							
m-TOR intensidade	0	1	1	0	1	1		0	0	2	1		1	0	0	0	0	0	0				
	1	1	4	2	4	5		2	1	8	0		0	6	0	0	0	0	0				
	2	0	1	0	0	1	>0,05	0	0	2	0	>0,05	0	0	1	0	0	0	0		>0,05		
	3	1	8	1	8	6		0	0	15	2		1	5	4	0	0	0	1				
	4	14	50	3	45	42		11	4	70	4		5	22	17	2	10	1	1				
m-TOR intensidade																							
Sem marcação		1	1	0	1	1		0	0	2	1		1	0	0	0	0	0	0				
	Fraco	4	15	1	11	14		3	3	19	3		0	12	6	0	0	0	0				
	Moderado	5	27	4	>0,05	26	>0,05	6	1	39	2	>0,05	4	15	11	0	2	1	0		>0,05		
Forte																							
		7	21	1	20	20		4	1	37	1		2	6	5	2	8	0	2				

(n): número de casos

