

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**ALTERAÇÕES NO NÚMERO DE CÓPIAS GENÔMICAS EM
MASTOCITOMAS CUTÂNEOS CANINOS**

Paulo César Jark
Medico Veterinário

2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

ALTERAÇÕES NO NÚMERO DE CÓPIAS GENÔMICAS EM
MASTOCITOMAS CUTÂNEOS CANINOS

Paulo César Jark

Orientador: Profa. Dra. Mirela Tinucci Costa

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária (Clínica Veterinária).

2013

J37a Jark, Paulo César Jark
Alterações no número de cópias genômicas em mastocitomas
cutâneos caninos / Paulo César Jark. -- Jaboticabal, 2013
xv, 51 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2013

Orientadora: Mirela Tinucci Costa

Banca examinadora: Renee Laufer Amorim; Sabrina dos Santos
Costa

Bibliografia

1. CGHarray. 2. Mastocitoma. 3. Cães. 4. Oncologia I. Título. II.
Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:616-006:636.7

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.
e-mail: arnold@cnpso.embrapa.br



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CAMPUS DE JABOTICABAL

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS DE JABOTICABAL

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: ALTERAÇÕES NO NÚMERO DE CÓPIAS GENÔMICAS EM MASTOCITOMAS CUTÂNEOS CANINOS

AUTOR: PAULO CÉSAR JARK

ORIENTADORA: Profa. Dra. MIRELA TINUCCI COSTA

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM MEDICINA VETERINÁRIA, Área: CLÍNICA MÉDICA VETERINÁRIA, pela Comissão Examinadora:


Profa. Dra. MIRELA TINUCCI COSTA

Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal


Profa. Dra. RENÉE LAUFER AMORIM

Departamento de Clínica Veterinária / Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu


Profa. Dra. SABRINA DOS SANTOS COSTA

União Pioneira de Integração Social / Planaltina/GO

Data da realização: 18 de fevereiro de 2013.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

PAULO CÉSAR JARK - nascido no dia 22 de março de 1986, natural de Corupá, estado de Santa Catarina. Iniciou sua graduação, no curso de Medicina Veterinária na Universidade Estadual de Santa Catarina – UDESC, tendo concluído a graduação nesta instituição em dezembro de 2008. Desenvolveu um projeto de iniciação científica, com bolsa PIBIC, sob a orientação da Prof. Dra. Márcia Regina Pfuetzenreiter. Durante a graduação, participou de cursos e realizou estágios relacionados com a área de Clínica Médica de Pequenos Animais. Participou do Sistema de Internato do Hospital Prof. Lauro Ribas Zimmer, da Universidade Estadual de Santa Catarina durante 2007/2008, desenvolvendo atividades na área de clínica, cirurgia e diagnóstico por imagem de pequenos animais. No período de 2009 a 2011 foi residente do Programa de Residência em Clínica Médica de Pequenos Animais da FMVZ/Unesp, Câmpus de Botucatu, sob orientação do Profa. Dra. Michiko Sakate. Neste período, publicou artigos em periódicos e resumos científicos em anais de congressos, e participou da publicação de um capítulo no Livro Casos de Rotina. No ano de 2010, realizou estágio no *Animal Cancer Care Clinic, Michigan State University Center for Comparative Oncology*. Entre maio de 2009 a maio de 2011 fez o curso de Especialização em Oncologia Veterinária do Instituto Bioethicus, na cidade de Botucatu, sob orientação da Profa. Dra. Sabryna Gouveia Calazans, sendo laureado com a melhor nota final do curso. Em março de 2011 foi aprovado no Programa de Pós-Graduação (Mestrado) em Medicina Veterinária, na FCAV Unesp – Campus de Jaboticabal, sob orientação da Profa. Dra. Mirela Tinucci Costa. Palestras e aulas foram ministradas neste período. Durante o Programa de Pós-Graduação realizou também treinamento no setor de Oncologia do Hospital Veterinário Governador Laudo Natel, sob a orientação da Profa. Dra. Mirela Tinucci Costa. Em outubro de 2012 foi aprovado em primeiro lugar no curso de Doutorado pelo mesmo Programa de Pós-Graduação.

DEDICATÓRIA

A minha mãe, a grande responsável por todas as minhas conquistas

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, aos céus por toda a força e peço que continue me acompanhando sempre.

Agradeço a minha família por me ensinar os valores da vida que muitas vezes são mais preciosos que os conhecimentos adquiridos pelos estudos.

Em especial a minha mãe **Adalice Jark** que é a grande responsável por eu chegar até aqui, sempre me motivando, me incentivando nas minhas decisões. Minha mãe que embora não tenha diploma de mestre, é mestre sim, em amor aos filhos e ao próximo, mestre em dedicação a família, mestre em ensinar e dar exemplo com a sua vivência e experiência para que nós filhos nos tornássemos pessoas melhores. Tenho muito orgulho de ser seu filho, você representa muito pra mim.

As minhas irmãs **Ana Paula Jark e Barbara Jark** por todo o companheirismo, amizade ao longo desses anos e por me proporcionarem o prazer de ser chamado de tio, por me darem sobrinhos tão especiais como o **Juninho, Egon** e a **Ana Julia**.

Ao meu pai **Ademar Jark**, que mesmo não estando mais presente entre nós com certeza está torcendo lá de cima para o meu sucesso pessoal e profissional.

Agradeço a minha orientadora **Profa. Mirela Tinucci Costa** primeiramente por ter aceitado me orientar e depois por ser mais que uma orientadora, por ser minha “mãe” em Jaboticabal, sempre disposta a me ajudar, a dividir comigo as angústias desses dois anos quando as coisas pareciam não ter solução.

Agradeço a **Profa. Renee Laufer Amorim** por ter me ajudado desde o início na decisão do tema do meu projeto, pelas palavras de calma na hora em que batia o desespero, por toda a ajuda durante esse período. Com certeza sua ajuda foi fundamental para a realização deste trabalho.

Agradeço a **Profa. Silvia Rogatto** por ter disponibilizado seu laboratório, sua equipe para me ajudar.

Agradeço a Equipe do Laboratório Neogene – Unesp – Botucatu, por toda a ajuda durante o experimento, em especial gostaria de agradecer ao **Márcio de Carvalho, Renata Bueno e Ana Carolina Tomaz Tavares** pela paciência nos ensinamentos e pela amizade que com certeza vai permanecer

Agradeço a equipe do Centro Internacional de Pesquisa do Hospital A.C Camargo, em especial a **Deborah Mundin**, que me ajudou na execução do meu projeto, sempre disposta a me ajudar. Obrigado pelas longas conversas e debates sobre literatura, música, filmes, que com certeza tornaram os dias de experimento mais leves.

Agradeço a FAPESP pela bolsa de pesquisa e pelo financiamento do projeto.

Agradeço aos companheiros de apartamento de São Paulo, por me ajudarem em um dos momentos mais difíceis do projeto em especial ao **Rainer Marco Lopez** e ao **Juan José Munhoz**

Agradeço aos demais professores que fizeram parte da minha vida acadêmica, a **Prof Mere Erika Saito** minha eterna orientadora, meus professores da Residência **Luiz Henrique de Araujo Machado, Michiko Sakate e Maria Lucia Gomes Lourenço** e demais professores que contribuíram para o meu conhecimento.

Agradeço a toda equipa do **SOV**, em especial ao **Prof. Andriago Barboza de Nardi** e aos meus colegas de serviço **Erika Maria Terra; Letícia Abrahao Anai; Livia Maria Semolin, Rosana Lino Salvador; Giovanna Rossi Varallo, Talita Mariana Morata Raposo; Sofia Borin Crivelentti; Rafael Ricardo Huppes; Leandro Crivelentti; Marília Ferreira; Reinaldo Garrido; Thiago Munhoz; Josiane Pazzini** por toda ajuda no acompanhamento dos casos, na coleta das amostras.

Agradeço aos meus amigos de Jaboticabal, que se tornaram minha família e que com certeza a amizade de vocês representa uma conquista maior do que qualquer título acadêmico. Em especial aos que dividiram bons momentos de diversão, conversas, festas, conselhos: **Ana Paula Gering; Ana Paula Tristão; Andressa**

Nogueira; Cristiane Reis; Darcio Filho; Erika Maria Terra; Evandro Zaché; Fábio Nelson Gava; Felipe Barros; Felipe Dias; Felipe Kunz Adans; Fernando Rosa; Gabriel Aquino; Kalina Simplício; Leandro Crivelentti; Letícia Abrahao Anai; Lívia Semolin; Marcelo Augusto Koury; Marcos Vinicius Guiducci; Mariana Rondelli; Michele Lopes Avante; Monica Chaves; Paulo Vinicius Tertuliano Marinho; Pedro Teles; Raquel Chaves; Rosana Lino Salvador; Sofia Borin Crivilentti; Talita Raposo; Thiago Munhoz.

Agradeço a todos os Myzheráveis, em especial ao **Elder; Batuta, Xupim; Yoda; Borná; Jhon; Ceará; Hypopo; Japa; Julian; Dengue; Coisa; Balango; Divino; Cacilds; Zé; Kart; Dilma; Samuel.** Agradeço a todos vocês pela acolhida desde o início em Jaboticabal, pelas risadas, pelos momentos de diversão e alegria.

Por fim, agradeço aos animais pelos exemplos diários de amor, por nos proporcionar a oportunidade de fazer do nosso trabalho algo tão especial, que são nossos estímulos para a busca do conhecimento.

SUMÁRIO

| | Página |
|---|--------|
| COMITE DE ÉTICA | x |
| RESUMO | xi |
| ABSTRACT | xii |
| LISTA DE ABREVIATURAS..... | xiii |
| LISTA DE TABELAS | xiv |
| LISTA DE FIGURAS..... | xv |
| 1. INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA..... | 2 |
| 2.1 Mastocitomas cutâneos caninos..... | 2 |
| 2.2 Hibridização genômica comparativa (aCGH) baseada em microarranjos | 8 |
| 3. OBJETIVOS..... | 11 |
| 4. MATERIAL E METODO..... | 12 |
| 4.1 Seleção dos animais | 12 |
| 4.2 Coleta, armazenamento e processamento de amostras | 13 |
| 4.2.1 Amostras tumorais | 13 |
| 4.2.2 Amostras controle | 14 |
| 4.3 Divisão dos grupos | 14 |
| 4.4 Extração e quantificação de DNA | 15 |
| 4.5 Protocolo de aCGH | 15 |
| 5. RESULTADO..... | 18 |
| 5.1 Animais selecionados | 18 |
| 5.2 Caracterização geral das alterações cromossômicas baseadas em CGHarray em mastocitomas cutâneos caninos | 21 |
| 5.3 Alterações representativas no número de cópias genômicas em mastocitomas cutâneos caninos através de CGHarray | 24 |
| 5.4 Alterações no número de cópias genômicas em mastocitomas cutâneos caninos de acordo com a sobrevida dos cães | 27 |
| 5.5 Genes encontrados em regiões de perdas no número de | |

| | |
|--|----|
| cópias genômicas em mastocitomas cutâneos caninos através da técnica de CGHarray e sua relação com a sobrevida dos cães | 29 |
| 5.6 Genes encontrados em regiões de ganhos no número de cópias genômicas em mastocitomas cutâneos caninos através da técnica de CGHarray e sua relação com a sobrevida dos cães | 29 |
| 5.7 Identificação dos genes alterados e suas participações nas vias no mastocitoma cutâneo canino e sua relação com a sobrevivida dos pacientes | 30 |
| 6. DISCUSSÃO..... | 35 |
| 7. CONCLUSÃO..... | 42 |
| 8. REFERÊNCIA..... | 43 |



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal



CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 003412/13 do trabalho de pesquisa intitulado "**Alterações nos números de cópias genômicas em mastocitomas cutâneos caninos**", sob a responsabilidade da Prof^a Dr^a Mirela Tinucci Costa, de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação (COBEA) foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), "ad-referendum" do Coordenador, de 21 de fevereiro de 2013.

Jaboticabal, 21 de fevereiro de 2013.

Prof. Dr. Andriago Barboza De Nardi
Coordenador - CEUA

ALTERAÇÕES NO NÚMERO DE CÓPIAS GENÔMICAS EM MASTOCITOMAS CUTÂNEOS CANINOS

RESUMO - O mastocitoma é a neoplasia cutânea de maior incidência nos cães e embora existam diversos fatores prognósticos, o comportamento clínico e biológico altamente variável desta neoplasia, faz como que a previsão da evolução e a escolha do melhor tratamento a ser utilizado sejam ainda um desafio. Desta forma, a utilização de técnicas moleculares que avaliam uma grande quantidade de genes envolvidos no processo neoplásico, pode ser uma ferramenta importante na determinação do prognóstico e até mesmo na eleição de genes candidatos a terapia alvo molecular. Uma das formas de se identificar os genes associados ao desenvolvimento ou a progressão tumoral é a investigação das alterações numéricas e estruturais em DNA isolado de células neoplásicas através da técnica de CGHarray (hibridação genômica comparativa baseada em arrays). Este estudo foi delineado com o objetivo de comparar as alterações do número de cópias gênômicas (ganhos/perdas) em mastocitomas cutâneos caninos de animais que sobreviveram um período menor que seis meses ($SV < 6$), com aqueles com sobrevida superior a um ano ($SV > 12$). Para isto foram selecionados 10 cães com mastocitoma cutâneo. A técnica de CGHarray foi utilizada em 4 mastocitomas do grupo $SV > 12$ e em 6 do grupo $SV < 6$. Os DNAs genômicos foram extraídos e os dados de alterações nos números de cópias de DNA foram gerados utilizando-se a plataforma *Canine Genome CGH Microarray 4x180*. A análise dos dados foi realizada utilizando o programa *Nexusversion 5.0*. Os resultados mostraram a média de 55,5 alterações no número de cópias (CNA) nos casos avaliados. Os mastocitomas do grupo $SV > 12$ apresentaram média de CNA de 11,25, enquanto que os tumores do grupo $SV < 6$ apresentaram média de 85,0 CNA. No grupo $SV < 6$ houve 75 genes caracterizados que apresentaram ganho e 16 genes caracterizados que apresentaram perda no número de cópias. No grupo $SV > 12$ foram identificados 24 genes com ganho no número de cópias e nenhum gene deste grupo apresentou perda no número de cópias. Concluindo-se que mastocitomas de pior prognóstico apresentaram maior alteração no número de cópias genômicas, como também regiões de perda nos genes *PTEN*, *FAS* e regiões de ganho nos genes *MAPK3*, *WNT5B*, *FGF*, em comparação a mastocitomas de melhor prognóstico.

Palavras chave: CGHarray; mastocitoma; cães; oncologia;

GENOMIC COPY NUMBER ALTERATION IN CANINE CUTANEOUS MAST CELL TUMORS

ABSTRACT- Mast cell tumours are the most common cutaneous malignant tumours in the dogs. Although there are several prognostic factors, the clinical and biological behavior of this tumor is highly variable, making the choice of the best treatment to be used, a challenge. Thus, the use of molecular techniques to evaluate a large number of genes involved in the neoplastic process, as it can be a valuable tool in determining prognosis and the election of candidate genes to molecular targeted therapy in the future. One way to identify the genes associated with the development or tumor progression is the investigation of numerical and structural changes in DNA isolated from tumor cells using the technique of CGHarray (comparative genomic hybridization). This study was designed in order to compare changes in the number of gene copies (gains / losses) in canine cutaneous mast cell tumors of animals that survived a period less than six months (SV <6) to those with a higher survival, more than one year (SV > 12). For this, 10 animals were selected. The CGH array technique was used in 4 mast cell tumor from group SV > 12 and six animals from group SV <6. Genomic DNA was extracted and the data for changes in copy number of DNA were generated using the platform *Canine Genome CGH Microarray 4x180* (ID-252 552 - Agilent). Data analysis was performed using the *Nexus program version 5.0* (Biodiscovery). We were detected an mean of 55.5 changes in copy number (CNA) in the cases evaluated. The group SV > 12 present an average of 11.25 CNA while the SV <6 group present a mean of 85.0 CNA. In group SV <6 there were 75 genes that had characterized gain and 16 genes that showed copy number loss. The group SV > 12 show 24 genes with copy number gain and there were no loss in this group. The mast cell tumors with a worse prognosis show more changes in genomic copy number compared to mast cell tumors with better prognosis. Regions of loss in the genes PTEN and FAS genes and regions of gain MAPK3, WNT5B, FGF were detected in mast cell tumors of poorer prognosis.

Keywords: CGHarray; mast cell tumor; dogs; oncology;

LISTA DE ABREVIATURAS

aCGH – *comparative genomic hybridization array*

BACs – *bacterial artificial chromosomes*

Cga – campo de grande aumento

CNA – *copy number alteration*

Cy3 – cianina 3

Cy5- cianina 5

FGF – fator de crescimento de fibroblastos

FOXM1- *Fork head box protein M1*

Gbp – pares de bases

GIPC – *GIPC PDZ domain containing family, member 1*

MAPK3 – *mitogen-activated protein kinase 3*

MCT - mastocitoma

MINPP1 - *Multiple inositol polyphosphate phosphatase*

mTOR – *mammalian target of rapamycin*

PIK3 – *phosphatidylinositol 3 kinase*

PTEN – *phosphatase and tensin homolog*

SPN – síndrome paraneoplásica

TLE1 - *transducin-likeenhancerprotein1*

TVT – tumor venéreo transmissível

LISTA DE TABELAS

| | Página |
|---|--------|
| Tabela 1: Estadiamento dos mastocitomas segundo o <i>Canine Mast Cell Disease: Consensus Panel on Diagnosis, Staging, Grading and Therapy of Mast Cell Disease</i> | 13 |
| Tabela 2: Relação dos pacientes e características clínicas do tumor, formas de tratamento e sobrevida dos animais..... | 20 |
| Tabela 3: Representação dos cromossomos e respectivas frequências de alterações e principais genes caracterizados..... | 26 |
| Tabela 4: Alterações no número de cópias nos genes caracterizados segundo o grupo de sobrevida | 28 |

LISTA DE FIGURAS

| | Página |
|---|--------|
| Figura 1: Representação gráfica das alterações encontradas no conjunto de cromossomos dos mastocitomas cutâneos avaliados. As áreas de perda de número de cópias estão marcadas em vermelho e os ganhos em azul | 22 |
| Figura 2: Representação gráfica das alterações nos cromossomos (perdas – vermelho e ganhos – azul) de cada mastocitoma cutâneo avaliado por CGHarray (n=10). <i>Nexusversion 5.0.</i> | 23 |
| Figura 3: Principais funções celulares e moleculares alteradas nos mastocitomas cutâneos caninos e sua intensidade de alteração avaliados através da <i>Ingenuity Pathways Analysis</i> (IPA) (n=10) | 25 |
| Figura 4: Representação gráfica dos genes com ganho (laranja) e perda (verde) do número de cópias, avaliados pela técnica de CGHarray, na via canônica do <i>PTEN</i> . Imagens geradas pelo <i>software Ingenuity Pathways Analysis</i> | 32 |
| Figura 5: Representação gráfica dos genes com ganho (laranja) e perda (verde) do número de cópias, avaliados pela técnica de CGHarray, na via canônica da apoptose. Imagens geradas pelo <i>software IngenuityPathwaysAnalysis</i> | 33 |
| Figura 6: Representação gráfica dos genes com ganho (laranja) e perda (verde) do número de cópias, avaliados pela técnica de CGHarray, na via canônica da <i>FGF</i> . Imagens geradas pelo <i>software Ingenuity Pathways Analysis</i> | 34 |

1. INTRODUÇÃO

O câncer é um processo complexo decorrente de um desequilíbrio entre o crescimento e a divisão celular, resultado do acúmulo de inúmeras mutações genéticas que provocam alteração no ciclo celular normal (FROLOV et al., 2003).

Dentre as diversas neoplasias caninas, o mastocitoma (MCT) desperta particular interesse na oncologia veterinária, por ser a neoplasia cutânea de maior frequência nesta espécie e por possuir particularidade e comportamento biológicos extremamente variáveis dentro de um mesmo grau de diferenciação histopatológica, o que dificulta ou impossibilita a determinação do prognóstico, quando baseado apenas nestas características (KIUPEL et al., 2011).

A caracterização do genoma canino permitiu, nas últimas décadas, a identificação de diversos genes relacionados à carcinogênese em diferentes tipos de neoplasia, através de diferentes metodologias, geralmente estudando um número limitado de genes envolvidos no desenvolvimento neoplásico (BREEN, 2004; OJOPI & DIAS, 2004). Uma das técnicas atualmente disponíveis para a identificação das alterações genéticas em um processo neoplásico é a comparação entre o número de cópias gênicas do genoma normal de uma espécie com a sequência gerada a partir de tumores.

A tecnologia de Hibridização Genômica Comparativa por microarranjo (*Comparative Genomic Hybridization array - aCGH*) é uma ferramenta importante para investigar os processos biológicos através de uma ampla análise de genes de uma célula em particular, de um tecido ou organismo (KROL et al., 2008)

Alguns tumores que apresentem características microscópicas semelhantes e mesmo grau de diferenciação podem apresentar comportamentos biológicos diferentes, tornando o tratamento e o prognóstico um desafio. Desta forma, a classificação tumoral baseada no padrão de alterações gênicas em larga escala, pode ser importante para avaliar o comportamento destas neoplasias (FROLOV et al., 2003; OJOPI & DIAS, 2004.; OKAMOTO, 2005).

A utilização da tecnologia de *microarray* nos MCT caninos pode significar um avanço no estudo desta neoplasia, pois poderá permitir prever o comportamento biológico de forma mais precisa do que apenas pela graduação morfológica atualmente empregada e, desta forma, direcionar a terapia a ser empregada de acordo com a agressividade da neoplasia.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Mastocitomas cutâneos caninos

O MCT canino é uma neoplasia maligna composta por mastócitos, muito frequente em cães, correspondendo a 11% dos tumores malignos cutâneos nessa espécie (VILLAMIL et al., 2011). Estudos brasileiros relataram frequência entre 20,9% (SOUZA et al., 2006) e 22,4% (MEIRELLES et al., 2010), sendo considerada a segunda neoplasia maligna mais frequente do cão (DE NARDI, 2002). Cães das raças Boxer, cães sem raça definida, Labradores e os Teckel são frequentemente acometidos (COSTA-CASAGRANDE et al., 2008; FURLANI et al., 2008).

A etiologia dos MCT é pouco compreendida, e alguns autores relatam a exposição à substâncias irritantes e doenças crônicas de pele como fatores predisponentes (DALECK et al., 2009). Alguns estudos demonstram que a mutação no gene c-KIT contribui em alguns casos para o desenvolvimento da doença, uma vez que este gene codifica o receptor KIT que quando mutado, estimula a proliferação celular descontrolada (ZEMKE et al., 2002; TURIN et al., 2006; WEBSTER et al., 2007).

A apresentação clínica dos MCT é altamente variável, podendo se apresentar como nódulos únicos, macios, não aderidos, circunscritos, não ulcerados até massas grandes, ulceradas, aderidas com invasão do tecido subcutâneo. Múltiplas lesões podem ser encontradas em 11 a 14% dos casos (THAMM & VAIL, 2007; DALECK et al., 2009).

Além da apresentação cutânea, o MCT ocorre na forma subcutânea e visceral (BLACKWOOD et al. 2012). Clinicamente, a diferenciação entre o MCT cutâneo e subcutâneo não é possível, sendo realizada apenas através de exame histopatológico (THOMPSON et al., 2010). O mastocitoma visceral é de ocorrência menos frequente em cães, acometendo principalmente o baço, fígado, intestinos, rins e medula óssea. Os sinais clínicos observados nestes casos estão relacionados ao órgão acometido e normalmente são inespecíficos, como anorexia, linfadenopatia, emese, diarreia, esplenomegalia e hepatomegalia, além disto, pode ser observada efusão peritoneal (TAKAHASHI et al., 2000)

Além dos sinais localizados na pele, é comum a ocorrência de síndromes paraneoplásicas (SPN) em casos de MCT. Os sinais clínicos associados a este

evento decorrem principalmente da de granulação do mastócito, com consequente liberação de histamina, heparina, fator quimiotático para eosinófilo e enzimas proteolíticas (WELLE et al., 2008; BLACKWOOD et al., 2012). Podem variar desde eritema e formação de placa (Sinal de Darier) na pele, devido a manipulação do tumor, até a ocorrência de retardo na cicatrização, ulcerações gastrointestinais e nos casos mais graves, choque anafilático (THAMM & VAIL, 2007; WELLE et al., 2008).

A ulceração gastrointestinal ocorre devido a liberação de histamina que estimula os receptores H2 das células parietais do estômago, levando ao aumento da produção de HCl e o desenvolvimento de ulcerações gastrointestinais. Estas lesões normalmente são múltiplas, acometendo principalmente o estômago e em menor frequência, o duodeno. Nestes casos, é comum o aparecimento de sinais como hematêmese, anorexia, hematoquesia, melena, dor abdominal e risco de peritonite. Segundo WELLE et al. (2008), em 35 a 83% de cães com MCT são observadas úlceras gastrointestinais durante a necropsia.

Outra complicação comum dos pacientes com MCT, que são submetidos à ressecção cirúrgica, é o retardamento da cicatrização e deiscência de pontos, possivelmente relacionados à liberação de enzimas proteolíticas e aminas vasoativas durante a manipulação que levam a supressão de fatores fibroblásticos importantes durante o processo cicatricial (DALECK et al., 2009; BLACKWOOD et al., 2012).

Embora raro, o choque anafilático é um evento possível, principalmente com extensas massas, que foram submetidas à manipulação excessiva durante o procedimento cirúrgico. A liberação de histamina em grande quantidade pelas células neoplásicas pode levar a um colapso circulatório (WELLE et al., 2008).

O diagnóstico do MCT cutâneo pode ser realizado através dos exames citológico e histopatológico. Dentre as características citológicas, o MCT pertence ao grupo das neoplasias de células redondas, caracterizado por ter escassa matriz extracelular, presença de grânulos intracitoplasmáticos basofílicos finos a grosseiros, evidenciados por corantes como o Romanowsky e seus derivados (DeNICOLA, 2009; MACNEILL, 2011). Embora a avaliação citológica dos MCT seja um procedimento simples e altamente útil, esta ferramenta diagnóstica funciona apenas como um exame de triagem, uma vez que não permite uma correta graduação do tumor apenas pela morfologia celular, necessitando de exame histopatológico para esse fim (STREFEZZI et al., 2003; STREFEZZI et al., 2009). Na avaliação convencional, critérios de malignidade, tais como a anisocariose e

anisocitose não apresentaram correlação com o comportamento clínico do tumor (MACNEILL, 2011).

Atualmente, a graduação histopatológica é a ferramenta mais utilizada na tentativa de prever o comportamento biológico do MCT (BOSTOCK, 1973; PATNAIK et al., 1984; KIUPEL et al., 2011).

O sistema de graduação proposto por Patnaik et al. (1984) é o mais utilizado para a classificação do MCT. De acordo com este sistema de classificação, eles podem ser divididos em três grupos: MCT grau I; compostos por fileiras ou agrupamentos de mastócitos neoplásicos monomórficos, bem diferenciados com núcleo arredondado, e granulações pequenas intracitoplasmáticas e apresentam celularidade confinada a derme. Apresenta raras figuras de mitose, ausência de células binucleadas e podem apresentar mínima reação estromal ou necrose; MCT grau II são moderados a acentuadamente celulares, com mastócitos neoplásicos moderadamente pleomórficos, apresentando núcleos arredondados e/ou pleomórficos, granulação intracitoplasmática de tamanho variado com extensão celular a derme profunda, subcutâneo e, ocasionalmente, a planos profundos. Os MCT grau II apresentam até duas figuras de mitose por campo de grande aumento (cga/400x), discretas áreas de edema, necrose e hialinização do colágeno; MCT grau III são compostos por mastócitos neoplásicos com pleomorfismo acentuado, com núcleos vesiculares, arredondados e pleomórficos, contendo um a múltiplos nucléolos proeminentes. As células são arranjadas em densos lençóis que invadem o tecido subcutâneo e muscular. Os MCT grau III apresentam de três a seis figuras de mitose por cga/400x, áreas de hemorragia, edema, necrose e hialinização do colágeno.

Embora o sistema de Patnaik ainda seja considerado o “padrão ouro” para o prognóstico dos MCT, o fato de ser baseado em critérios subjetivos faz com que exista uma grande variação inter-observadores, diminuindo a confiança neste sistema de classificação. Esta subjetividade foi comprovada no trabalho de Northup et al. (2005). Estes pesquisadores avaliaram a concordância entre 10 patologistas na graduação de 60 MCT. Os autores observaram que em apenas 7% dos casos houve concordância de todos os patologistas na graduação, seguindo os critérios propostos por Patnaik e colaboradores. Em 10% dos casos, um mesmo tumor foi classificado entre os patologistas do estudo nos três graus propostos por Patnaik, demonstrando desta forma, a variação inter-observadores neste tipo de classificação.

Com a intenção de tornar a graduação histopatológica mais precisa e menos propensa a variações em sua interpretação, Kiupel et al. (2011) propuseram uma nova graduação para os MCT cutâneos, utilizando critérios mais objetivos. Esta nova classificação histopatológica se baseia em apenas dois graus: baixo e alto grau de malignidade. MCT cutâneos de alto grau de malignidade são caracterizados pela presença de pelo menos uma das seguintes características: (1) pelo menos sete figuras de mitose contadas em 10 campos de grande aumento (cga/400x); iniciando a contagem a partir do campo de maior número de figuras de mitose; (2) pelo menos três células multinucleadas (três ou mais núcleos) em 10 cga/400x; (3) pelo menos três núcleos bizarros (núcleos acentuadamente pleomórficos em 10 cga/400x e (4) cariomegalia (diâmetro nuclear de pelo menos 10% das células neoplásicas) (KIUPEL et al., 2011). Houve 99,3% de concordância entre os patologistas na graduação dos MCT de baixo e alto grau de malignidade (KIUPEL et al., 2011).

A variação entre os graus histopatológicos, os diferentes fatores prognósticos e os diversos protocolos quimioterápicos utilizados no tratamento do MCT fazem com que a escolha do melhor protocolo seja um desafio (COOPER et al., 2009). Para DALECK et al. (2009), a escolha do tratamento MCT fica na dependência do grau de envolvimento tumoral, da possibilidade de ressecção cirúrgica com margens de segurança, do estadiamento clínico da neoplasia e do estado geral do paciente. De forma geral, o tratamento mais comumente utilizado envolve a ressecção cirúrgica seguida ou não de quimioterapia antineoplásica. A quimioterapia antineoplásica deve ser utilizada nos casos de: doença residual, mastocitoma com potencial de metástase/recidiva, para citorredução de massas muito grandes, ou como forma de tratamento paliativo em mastocitomas inoperáveis.

Embora existam inúmeros protocolos quimioterápicos descritos para o tratamento do MCT, os mesmos foram avaliados comparando-se grupos heterogêneos, com diferentes fatores prognósticos clínicos e histopatológicos, dificultando, desta forma, a escolha do melhor protocolo a ser utilizado (COOPER et al. 2009; CAMPS-PALAU et al., 2007).

Além dos tratamentos convencionais, a evolução em genética molecular permitiu o desenvolvimento de novos protocolos de tratamento para muitos tumores. Dentre estas terapias, a utilização de fármacos alvo moleculares, como os inibidores de tirosina quinase tem sido amplamente estudados (ISOTANI et al. 2008; LONDON, 2009; HANH et al. 2010; YAMADA et al. 2011). Os receptores tirosina quinase, além de estarem envolvidos no ciclo celular normal, têm participação

fundamental nos processos neoplásicos. A mutação nos proto-oncogenes que codificam estes receptores, ou a superexpressão desses tem como consequência um descontrole no envio de sinais para proliferação celular que é fundamental para o desenvolvimento neoplásico (LONDON, 2009; JARK et al., 2012). Além disto, estes receptores estão envolvidos na angiogênese (através do receptor de crescimento endotelial, receptor de crescimento derivado de plaquetas), que é importante para a nutrição das células neoplásicas e uma via para a disseminação de metástases (THURSON et al., 2004).

O receptor de tirosina quinase KIT em MCT, representa um dos maiores exemplos da participação destes receptores no desenvolvimento de neoplasias em cães (HANH et. al., 2010). Após a descoberta da participação dos receptores de tirosina quinase no processo de carcinogênese, um grande esforço está sendo direcionado no desenvolvimento de estratégias para inibir estes receptores, tanto nas células cancerígenas como no endotélio vascular, com o intuito de inibir a angiogênese (ARGYLE, 2007).

A maior estratégia desenvolvida em medicina veterinária com o intuito de inibir a ação dos receptores de tirosina quinase foi a utilização dos chamados "*small molecule tyrosine kinase inhibitors*". Estes agem bloqueando a ligação da molécula de ATP ao receptor, por mecanismo de inibição competitiva (reversível ou não) impedindo a fosforilação e envio de sinais para proliferação celular e angiogênese (LONDON, 2009).

A opção pela utilização deste tipo de terapia deve ser avaliada seguindo as indicações clínicas destes fármacos, como a presença de mutação do oncogene c-KIT, avaliada através de testes moleculares juntamente com achados clínicos e histopatológicos, como o diagnóstico de MCT grau II e III não passíveis de ressecção cirúrgica (LONDON, 2009; JARK et al., 2012)

O comportamento clínico e biológico dos MCT nos cães é bastante variável, podendo se apresentar como uma lesão de caráter pouco agressivo a lesões localmente infiltrativas e com alto potencial metastático (O'CONNELL & THOMSON, 2011). Estas características dos MCT os tornam tumores com comportamento biológico imprevisível. Devido a isto, alguns fatores prognósticos podem ser utilizados na tentativa de melhor prever o comportamento desta neoplasia. Estes incluem fatores clínicos como, tamanho do tumor, localização, velocidade de crescimento e presença de metástases, além de características histopatológicas e

imuno-histoquímicas que também auxiliam na caracterização do prognóstico do paciente (KIUPEL et. al., 2004; O'CONNELL & THOMSON, 2011).

Dentre os dados clínicos empregados na atribuição de prognóstico negativo estão: tumores maiores que 3,0 cm, tumores com velocidade de crescimento rápida, presença de ulceração e presença de metástase (HANH et al., 2004). Embora não seja consenso entre os autores, alguns pesquisadores sugerem que a localização tumoral em prepúcio, períneo, região inguinal e coxins também pode ser associada a pior prognóstico (O'CONNELL & THOMSON, 2011).

Correlacionar a graduação histopatológica com a sobrevida dos pacientes portadores de MCT é um ponto importante, tanto na classificação de Patnaik et al. (1984), como na recente classificação proposta por Kiupel et al. (2011). De acordo com o estudo original de Patnaik et al. (1984), 93% dos cães com MCT grau I sobreviveram mais de 1500 dias, comparados com 47% dos cães com grau II e 6% dos cães com grau III. Já para Kiupel et al. (2011), o tempo médio de sobrevida dos cães com MCT de alto grau de malignidade é menor que quatro meses e maior que dois anos para os cães com tumores de baixo grau.

A contagem de figuras de mitoses é descrita como fator prognóstico independente de outras características histopatológicas (ROMANSIK et al., 2007). Porém, os valores de corte relatados para o número de figuras de mitose contadas em 10 cga/400x podem variar entre os autores. A metodologia empregada nos trabalhos de Romansik et al. (2007) utiliza os valores de corte de ≤ 5 e > 5 figuras de mitose.

A imunomarcção para a proteína KIT pode ser considerada um fator prognóstico importante nos casos de MCT. A presença de imunomarcção perimembranosa (padrão KIT 1) não está associada a recorrência da doença, ou diminuição da sobrevida, enquanto que as marcações citoplasmáticas focais ou difusas da proteína KIT (padrão KIT 2 e 3 respectivamente) estão associados ao aumento na taxa de recorrência da doença e diminuição da sobrevida dos pacientes (KIUPEL et. al., 2004).

Outro marcador imuno-histoquímico que pode ser utilizado na avaliação do prognóstico dos MCT em cães é o Ki-67, um marcador de proliferação celular (WEBSTER et. al., 2007). Webster et al. (2007) demonstraram que os pacientes que apresentam valor de Ki-67 acima de 23 por campo apresentaram menor sobrevida e maior taxa de recorrência local e de metástase a distância, em comparação aos cães com Ki-67 inferior a 23 por campo.

Embora existam diversos fatores prognósticos baseados em dados clínicos, histopatológicos e imuno-histoquímicos, o comportamento clínico e biológico altamente variável dos MCT, faz como que a previsão da evolução desta neoplasia e a escolha do melhor tratamento a ser utilizado seja ainda um desafio. Desta forma a utilização de técnicas moleculares que avaliam uma grande quantidade de genes envolvidos no processo neoplásico, pode vir a ser uma ferramenta importante na determinação do prognóstico e até mesmo na eleição de genes candidatos a terapia alvo molecular no futuro.

2.2. Hibridização genômica comparativa baseada em microarrays (aCGH)

O estudo de correlações entre as características histopatológicas e alterações genéticas foi aprimorado a partir da introdução de técnicas moleculares como Hibridização *in situ* fluorescente (FISH), Hibridização Genômica Comparativa, (CGH) e CGH associada à *microarrays* (aCGH) (ISHKANIAN et al., 2010)

A *CGHarray* é uma ferramenta molecular, primeiramente descrita por Kallioniemi et al. (1992), em tumores, comparando o de DNA proveniente de células malignas com as normais. Esta técnica permite uma análise ampla dos ganhos e perdas presentes no genoma.

A técnica de *CGHarray* possibilita a detecção quantitativa, em alta resolução, de alterações no número de cópias de regiões genômicas específicas em diversos tipos de doenças, incluindo o câncer, e as associações com características clínicas e evolução da doença (PINKEL et al., 2005; ISHKANIAN et al., 2010; PARK et al., 2010).

O princípio da técnica de *CGHarray* baseia-se na co-hibridação do DNA extraído da amostra tumoral marcado com um fluoróforo e de um DNA de referência da amostra normal marcado com outro fluoróforo em uma lâmina de vidro especial que contém milhares de sondas ligadas à lâmina (PINKEL et al., 2005; ISHKANIAN et al., 2010; PARK et al., 2010; MULLER et al., 2012). Usando a comparação com o genoma de referência, os dados coletados são atribuídos para cada um dos cromossomos, que, individualizados, são estruturalmente reconstruídos, possibilitando, portanto, a detecção de alterações, podendo, estas, serem ganhos, perdas e/ou ampliações genômicas (PINKEL et al., 2005; ISHKANIAN et al., 2010).

A presença de alterações recorrentes em diversas amostras tumorais pode auxiliar na caracterização molecular do tumor, identificando potenciais processos celulares e genes alterados, alvos terapêuticos e marcadores moleculares úteis ao diagnóstico e prognóstico dos tumores (ALBERTSON et al., 2003; STRATTON et al., 2009; SANTARIUS et al., 2010).

As principais alterações genéticas observadas são mutações em ponto, ampliações gênicas e alterações cromossômicas estruturais e numéricas, incluindo, ganhos, perdas, inversões e recombinações (translocações), sendo que a técnica de CGHarray identifica alterações de ganhos e perdas (MULLER et al., 2012).

Embora seja utilizada com certa frequência no estudo de neoplasias em humanos, na medicina veterinária essa técnica ainda não é amplamente utilizada. O primeiro relato da utilização de CGHarray em cães foi feito por Dunn et al. (2000). Os pesquisadores identificaram várias alterações genômicas em uma cultura de linhagem celular de glioma.

Também foi utilizada em três casos de linfoma multicêntrico canino por Thomas et al. (2003). Os autores demonstraram que é uma tecnologia viável e acessível para o estudo de neoplasias em cães.

A construção de uma plataforma de BACs (bacterial artificial chromosomes) com uma resolução de 2Mb (cinco vezes maior do que o CGH cromossômico) para uso em CGHarray de cães foi descrita por Thomas et al. (2005). A sequência de pares de bases, estabelecida como padrão para os cães, contém $2,4 \times 10^9$ pares de bases (Gbp), que corresponde aproximadamente a 99% do genoma canino. Apesar de o cão ter 39 pares de cromossomos, comparados com 23 pares dos humanos, o genoma da espécie canina contém 0,5 Gbp a menos do que o humano (THOMAS et al., 2005).

Thomas et al. (2007) empregando a mesma técnica na histiocitose canina, relataram alterações nessa neoplasia semelhante a estudos com neoplasias humanas maligna relacionadas a pior prognóstico.

Anos mais tarde, o mesmo grupo de pesquisa avaliou cinco amostras de tumor venéreo transmissível de diferentes regiões geográficas na tentativa de encontrar padrões genéticos distintos entre as amostras conforme a região geográfica que o tumor foi coletado. Os autores observaram um padrão de alteração genética similar entre as amostras testadas, sugerindo uma origem comum. Porém, quando comparadas com outros tipos de neoplasias que geralmente apresentam

baixos níveis de ganho, perdas em heterozigose em extensas regiões cromossômicas, o padrão citogenético do TVT mostrou-se diferente, com altos níveis de ganho de cópia, deleção em homozigose em pequenas porções avaliadas, sem evidência de desbalanço completo de um determinado cromossomo (THOMAS et al., 2009a).

Como em vários processos neoplásicos de humanos, os tumores caninos apresentam alterações cromossômicas recorrentes, que devem ser conhecidas para facilitar o diagnóstico, prognóstico e a escolha da terapia mais adequada. Neste sentido, o CGHarray foi utilizado em neoplasias colo retais caninas na tentativa de comparar com as alterações comumente vistas neste tipo de neoplasia em humanos. Este estudo permitiu a identificação de várias alterações comuns entre as duas espécies, que podem estar relacionadas e serem importantes no desenvolvimento de neoplasias colo retais em ambas as espécies (TANG et al. 2010). Também foi empregado por Angstadt et al. (2011) em osteossarcomas caninos na tentativa de caracterizar assinaturas gênicas importantes relacionadas com o desenvolvimento tumoral nesta espécie, e comparar com resultados encontrados em estudo do osteossarcoma humano. Os autores identificaram anormalidades citogenéticas comuns entre as duas espécies, reforçando o papel do cão como modelo experimental no estudo dos osteossarcomas humanos.

3. OBJETIVOS

- Comparar as alterações do número de cópias gênicas (ganhos/perdas) em MCT cutâneos caninos de animais que sobreviveram um período menor que seis meses após o diagnóstico com aqueles com sobrevida superior a um ano.
- Contribuir para a identificação das principais vias envolvidas no processo carcinogênico em MCT cutâneos caninos e desta forma selecionar diferenciais que possam estar relacionados ao tempo de sobrevida.

4. MATERIAL E MÉTODO

4.1. Seleção dos animais

Foram utilizados dez animais com MCT diagnosticados por exames citológico e histopatológico, atendidos no período de março de 2011 a junho de 2012 no Serviço de Oncologia Veterinária do Hospital Governador Laudo Natel – Unesp – Jaboticabal.

Os animais foram caracterizados quanto a raça, sexo, idade e quanto as características clínicas do tumor, como volume tumoral (medido com auxílio de um paquímetro), localização, forma de apresentação e presença de ulceração e realizada a análise descritiva destes dados.

Os animais foram submetidos à avaliação clínica e laboratorial (hemograma, avaliação renal e hepática). Para estadiamento da doença, foram feitos exames de imagem (ultrassonografia abdominal e radiografia torácica), punção biopsia aspirativa com agulha fina nos linfonodos sentinelas e nos órgãos com alterações nodulares ou aumento de volume generalizado. O estadiamento baseou-se no *Canine Mast Cell Disease: Concensus Panel on Diagnosis, Staging, Grading and Therapy of Mast Cell Disease*. 1º Encontro Mundial de Oncologia Veterinária – ESVONC/VCS, Copenhague, 2008 (Tabela 1).

Tabela 1 – Estadiamento dos mastocitomas segundo o *Canine Mast Cell Disease: Consensus Panel on Diagnosis, Staging, Grading and Therapy of Mast Cell Disease*.

| Estádio | Tumor | Linfonodo regional | Metástase |
|---------|--|--------------------|-----------|
| I | único, <3 cm, bem circunscrito | - | - |
| II | +1 nódulo, < 3cm com distância interlesional > 10 cm, bem circunscrito | - | - |
| III | 1 ou+, > 3 cm com distância interlesional <10 cm, mal circunscrito ou ulcerado | - | - |
| IV | qualquer tipo lesional | + | - |
| V | qualquer tipo lesional | + ou - | + |

O tratamento adotado se pautou nas características histopatológicas do tumor, estadiamento clínico, condições gerais do paciente e aceitação dos proprietários. As principais formas de tratamento utilizado foram: cirurgia; cirurgia seguida de quimioterapia adjuvante a base de vimblastina e prednisona, ou a base de vimblastina, prednisona e lomustina; inibidor de tirosina quinase; quimioterapia paliativa nos casos de doença metastática e controle paliativo da dor. Adicionalmente, alguns pacientes receberam tratamento de suporte, como protetores gástricos e anti-histamínicos.

4.2. Coleta, armazenamento e processamento de amostras.

4.2.1 Amostras tumorais

Amostras de MCT de 10 cães foram coletadas imediatamente após a remoção cirúrgica. Nos animais em que a realização da cirurgia não era possível devido à extensão da doença ou localização tumoral, foi realizado biópsia incisional antes da instituição do tratamento. Nenhum dos animais recebeu tratamento quimioterápico ou terapia com inibidor de tirosina quinase previamente a cirurgia.

De cada tumor foram coletados dois ou mais fragmentos de 1cm³. Uma parte da amostra coletada foi armazenada em criotubo estéril, livre de RNase e DNase, previamente autoclavado. Os criotubos contendo amostras de MCT foram então mantidos em nitrogênio líquido a -196°C e posteriormente, transferidos e armazenados em freezer a -80°C. A outra parte dos fragmentos coletados foi armazenada em formalina 10% para análise histopatológica de acordo com Kiupel et al. (2011).

As amostras de MCT congelados foram cortadas no criostato (LEICA), através de cortes de congelamento sequenciais de 5µm e confeccionadas as lâminas microscópicas. A seguir foram coradas com Hematoxilina e Eosina e posteriormente analisadas em microscópio de luz (LEICA), sendo selecionadas para a técnica de CGHarray as amostras que continham mais de 80% de células neoplásicas, que posteriormente foram submetidas a extração de DNA. Dos animais que apresentavam dois nódulos foi selecionado o de maior grau histopatológico (pior prognóstico) para extração de DNA.

4.2.2 Amostras controle

Foram coletados sangue de 20 cães saudáveis avaliados através de exame físico geral e hemograma, provenientes do canil da FMVZ- Unesp campus de Botucatu. O animais foram submetidos a venopunção jugular com auxilio de agulha 30x7 e o sangue foi armazenado em tubos contendo EDTA como agente anticoagulante. Após a centrifugação do sangue, foi selecionada a papa leucocitária para extração de DNA e com estas amostras foi realizado um *pool* de DNA genômico. A concentração final de DNA após a diluição foi de 500ng de DNA genômico controle.

4.3. Divisão dos grupos

Cães com diagnóstico de MCT foram divididos em dois grupos, de acordo com o tempo de sobrevida (SV) dos pacientes: sobrevida superior a 12 meses (Grupo SV>12) e sobrevida até seis meses (Grupo SV<6). A divisão dos grupos baseou-se nos critérios adaptados propostos por Kiupel et al. (2011). Para esses autores, pacientes com MCT de alto grau apresentam sobrevida de até 4 meses, e aqueles com MCT de baixo grau sobrevida superior a 2 anos. Desta forma, o

propósito da separação dos cães em dois grupos foi selecionar animais com prognósticos distintos. Não foram incluídos animais com sobrevivência entre 6 e 12 meses, pois estes situariam-se em uma faixa de transição, o que dificultaria a caracterização do prognóstico como favorável ou não.

4.4. Extração e quantificação de DNA

A extração e quantificação do DNA foi realizado no Laboratório de Neogene da Faculdade de Medicina da Universidade Estadual Paulista – Julio de Mesquita Filho – Unesp – Botucatu.

As amostras tumorais foram individualmente clivadas com a utilização do equipamento Precellys R (Bio America Inc, Florida, EUA) em tubos com *bids* magnéticos, seguida pela extração de DNA utilizando-se o protocolo de extração comercial Qiagen Dneasy blood and Tissue (Nº 69504) para as amostras tumorais. Para as amostras de leucócitos sanguíneos (controle) empregou-se o Kit comercial GE – Illustra Blood Genomic Prep Mini Spin (Nº 289042-64), ambos de acordo com as instruções dos fabricantes.

Após a extração do DNA, o mesmo foi quantificado através do *Nano Drop* (ND-1000 Spectrophotometer v.3.0.1, Labtrade) no Laboratório Neogene, do Departamento de Urologia, FMB, UNESP, Botucatu. A avaliação da qualidade e integridade do DNA extraído foi realizada através de gel de agarose a 0,8%.

4.5. Protocolo de CGHarray

O protocolo de CGHarray foi realizado no Centro Internacional de Pesquisa (CIPE) do Hospital A. C Camargo – São Paulo.

Após a extração e quantificação das amostras, o DNA tumoral e controle foram diluídos em água MilliQ em uma concentração final de 500ng/μl e em um volume final de 20,2 μl. Após este processo, as mesmas passaram por uma etapa de digestão através da adição de um mix a base de água, Buffer C, BSA Acetilado, ALu I e Rsa I mantidas durante 2 horas a 37 graus e por 20 minutos a 65 graus. Após a etapa de digestão, as amostras foram incorporadas com as cianinas Cy3- e Cy5- dCTPs (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) utilizando reação de marcação por *random primer* (Bioprime DNA Labeling Kit, Invitrogen, Carlsbad, CA). As amostras tumorais receberam marcação com Cy3 e as amostras controles com

Cy5. As etapas de purificação, hibridação e lavagem foram realizadas de acordo com o protocolo de marcação enzimática recomendado pelo fabricante (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA).

A intensidade de marcação e rendimento da reação foi avaliada para todas as amostras utilizando Nano Drop 1000 (Thermo Fisher Scientific Inc.) sendo combinadas as amostras teste e de referência com eficiências de marcação semelhantes. Adicionou-se a cada reação *Human Cot* DNA, 10X *Blocking Agent* e 2X *Hi-RPM Hybridization Solution*. A mistura de hibridação foi desnaturada a 95°C por 3 minutos e incubada a 37°C por 30 minutos em banho seco. Foram adicionados 27µL de CGH *block* às reações marcadas e 100uL da mistura final foi adicionada às lâminas que foram incubadas a 65°C por 24 horas. Os dados de alterações no número de cópias de DNA foram gerados utilizando-se a lâmina *Canine Genome CGH Microarray 4x180K* (252552 - Agilent). Essa plataforma possui aproximadamente 180.000 sondas que mapeiam genes bem caracterizados, particularmente envolvidos em câncer, além de sequências codificadoras e não-codificadoras (<http://www.chem.agilent.com>). Após a hibridização das lâminas ocorreu a lavagem das mesmas em banhos consecutivos nas soluções de *Wash Buffer 1* durante 5 minutos, *Wash Buffer 2* durante 1 minuto, Acetonitrila durante 10 segundos e *Stabilization and drying solution* durante 30 segundos.

A captura das imagens foi realizada no *Microarray Scanner System* (Agilent G2565CA), utilizando-se o *Scan Control Software 8.1*. A extração dos dados foi realizada usando o *Software Feature Extraction v10.7* (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA).

A análise dos dados foi realizada utilizando o programa *Nexus version 5.0* (Biodiscovery - www.biodiscovery.com) e a seleção dos casos ocorreram de acordo com o preenchimento dos critérios de qualidade determinados pelo *software* (valores até 0,3). Foi utilizado o algoritmo *FASST Segmentation*, o qual se baseia no *Hidden Markov Model*, *threshold* de significância de 5,00E-5 e máximo espaçamento entre sondas adjacentes antes de realizar a quebra de um segmento de 1Mb. Foram consideradas cinco sondas consecutivas alteradas para determinação de um segmento como alterado quanto ao número de cópias. Os limiares considerados para ganhos de uma cópia, ganhos de 2 ou mais cópias (alto nível de ganhos), perdas de uma cópia e perdas de duas cópias (deleção homozigota) foram 0,3; 1.14; -0,3 e -1,1, respectivamente. As alterações em X e Y não foram avaliadas.

A seleção de regiões para análises mais detalhadas baseou-se na inclusão de alterações presentes em mais de 20% dos casos (regiões representativas). Foram consideradas regiões caracterizadas aquelas que apresentam genes nomeados e com funções identificadas.

Foram realizadas análises de vias e redes gênicas, doenças relacionadas e função celular ou molecular para as alterações encontradas nos MCT cutâneos com o *software Ingenuity Pathways Analysis (IPA)* (Ingenuity Systems)

5. RESULTADOS

5.1. Animais selecionados

Dos 10 cães com MCT, quatro compuseram o grupo SV>12 e permaneceram vivos até a conclusão deste estudo (sobrevida superior a 1 ano); seis animais compuseram o grupo SV<6, com sobrevivida de até 6 meses, e vieram a óbito em decorrência do MCT. O tempo de sobrevivida médio dos pacientes do grupo SV<6 foi de 3,4 meses (Tabela 2). Entre as raças, o Pitbull foi a mais acometida (4/10), seguido por Labradores (3/10), Boxer, Shar Pei e Fox Paulistinha, representados por um exemplar de cada (1/10). A idade média dos animais foi de 7,9 anos, variando de quatro a 13 anos. A distribuição entre os sexos foi semelhante, com 5 fêmeas e 5 machos (Tabela 2).

A apresentação clínica mais comum do MCT foi a de nódulos únicos (7/10) (Tabela 2), sendo que três animais apresentaram 2 nódulos cada, totalizando 13 nódulos. As localizações mais comuns foram a região de membros/coxins (5/13), lateral de tórax e abdômen (4/13), região inguinal (2/13), lábio (1/13) e vulva (1/13).

Quatro cães apresentavam nódulos ulcerados, sendo todos do grupo SV<6 (Tabela 2). Seis nódulos tinham menos de 3 cm e sete nódulos mais de 3 cm. Naqueles cães que apresentavam mais de um nódulo, ao menos um era maior que 3 cm.

A presença de metástase no momento do diagnóstico foi observada em 4/10 animais (40%), todos pertencentes ao grupo SV<6. Um dos animais apresentava metástase em baço e linfonodos ilíacos, os demais apresentam um foco metastático detectável no baço, linfonodo ilíaco e linfonodo submandibular (Tabela 2).

Em relação ao estadiamento, três MCT estavam em estágio I (todos do grupo SV>12), três em estágio III (2 do grupo SV<6 e um do grupo SV>12), um em estágio IV (grupo SV<6) e três em estágio V (grupo SV<6) (Tabela 2).

Em relação ao grau histopatológico (Kiupel et al., 2011), cinco animais apresentaram mastocitoma de alto grau (todos pertencentes ao grupo SV<6) e cinco de baixo grau (quatro pertencentes ao grupo SV>12 e um ao grupo SV<6) (Tabela 2).

A forma de tratamento utilizada nos pacientes foi baseada na indicação clínica de cada caso e da aceitação por parte dos proprietários (Tabela 2). Após o diagnóstico e demais procedimentos, quatro animais foram submetidos a cirurgia e quimioterapia antineoplásica pós cirúrgica; quatro apenas a cirurgia para remoção do tumor; um

animal recebeu apenas quimioterapia paliativa devido a presença de doença metastática não passível de ressecção. Um paciente recebeu inibidor de tirosina quinase como primeira forma de tratamento, uma vez que o proprietário não tinha como comparecer semanal ou quinzenalmente no Serviço de Oncologia para realizar quimioterapia e a massa não era passível de ressecção cirúrgica. Um dos pacientes, inicialmente tratado com cirurgia e quimioterapia tornou-se refratário ao tratamento e passou a receber inibidor de tirosina quinase como segunda forma de tratamento.

Tabela 2. Relação dos pacientes e características clínicas do tumor, formas de tratamento e sobrevida dos animais.

| Grupo | Raça | Sexo | Idade (Anos) | Apresentação Clínica | Ulceração | Metástase | Estadiamento clínico* | Grau** | Tratamento | Sobrevida |
|-------|-------------|------|--------------|----------------------|-----------|-------------------------|-----------------------|--------|-----------------|-----------|
| SV>12 | Boxer | F | 6 | Único | Não | Ausente | I | Baixo | Cirurgia | Vivo*** |
| SV>12 | Pitbull | F | 10 | Único | Não | Ausente | I | Baixo | Cirurgia | Vivo*** |
| SV>12 | Labrador | M | 7 | Único | Não | Ausente | III | Baixo | Cirurgia + QTP | Vivo*** |
| SV>12 | Pitbull | F | 4 | Único | Não | Ausente | I | Baixo | Cirurgia | Vivo*** |
| SV<6 | Labrador | M | 8 | Único | Não | Ausente | III | Alto | Cirurgia + QTP | 6 meses |
| SV<6 | Labrador | M | 13 | Único | Sim | Baço | V | Baixo | Cirurgia | 3 meses |
| SV<6 | Fox | F | 7 | dois nódulos | Não | Linfonodo submandibular | IV | Alto | Cirurgia + QTP+ | 6 meses |
| | Paulistinha | | | | | | | | ITK | |
| SV<6 | Pitbull | M | 8 | Único | Sim | Ausente | III | Alto | Cirurgia + QTP | 2 meses |
| SV<6 | Pitbull | F | 5 | dois nódulos | Sim | Linfonodo ilíaco | V | Alto | QTP | 2 meses |
| SV<6 | Shar-pei | M | 11 | dois nódulos | Sim | Linfonodo ilíaco e baço | V | Alto | ITK | 1,5 meses |

*Estadiamento segundo: Consensus Panel on Diagnosis, Staging, Grading and Therapy of Mast Cell Disease. 1º Encontro Mundial de Oncologia Veterinária – ESVONCVCS, Copenhagen, 2008

** Grau histopatológico segundo Kiupel et al (2011)

*** vivos após um período de seguimento superior a 12 meses.

QTP – quimioterapia/ ITK – inibidor de tirosina quinase

5.2. Caracterização geral das alterações cromossômicas baseadas em CGHarray em mastocitomas cutâneos caninos.

Foram detectadas 555 alterações no número de cópias gênicas (CNAs) com média de 55,5 por caso. A média de CNAs do grupo SV<6 foi de 85,0, enquanto a média de CNAs no grupo SV>12 foi de 11,25.

Os tumores avaliados apresentaram alterações genômicas que variaram de 4 a 246 CNAs por caso, as quais foram divididas em ganhos (1 cópia adicional), perdas (1 cópia ausente), alto nível de ganhos (2 ou mais cópias adicionais) e perda homozigota (2 cópias ausentes). Foram observados 251 ganhos (45,22%), 293 perdas (52,79%), 3 ganhos em alto nível (0,54%) e 8 perdas homozigotas (1,44%). Os cromossomos com maior número de sequências envolvidas foram os cromossomo 6 (47 CNAs: 30 perdas e 17 ganhos) e o 11 (50 CNAs: 48 perdas, uma perda em homozigose e um ganho). Os cromossomos com menor número de alterações foram os cromossomos 12, 28 e 34, com apenas uma alteração presente em cada um (ganho, ganho e perda, respectivamente).

O cromossomo com maior número de sequências envolvidas em perdas foi o 11, com 48 perdas e o cromossomo com maior número de ganhos foi o cromossomo 14, com 35 ganhos.

A Figura 1 representa as alterações encontradas no conjunto total dos cromossomos dos tumores avaliados e as respectivas perdas (vermelho) e ganhos (azul). A Figura 2 representa, individualmente, os ganhos e perdas de acordo com cada cromossomo e em seu respectivo caso.



Figura 1 - Representação gráfica das alterações encontradas no conjunto de cromossomos dos mastocitomas cutâneos avaliados. As áreas de perda de número de cópias estão marcadas em vermelho e os ganhos em azul

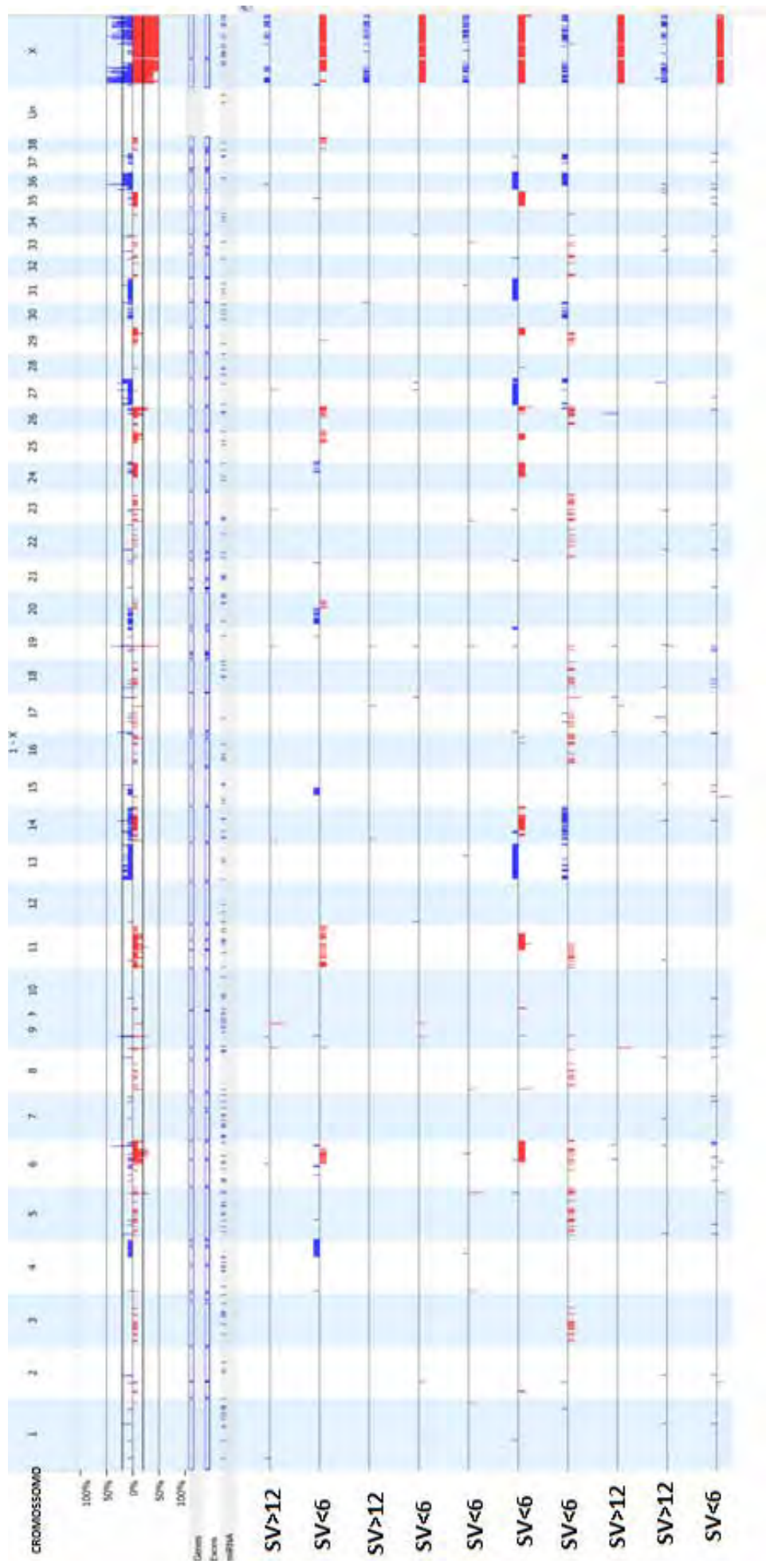


Figura 2 – Representação gráfica das alterações nos cromossomos (perdas- vermelho e ganhos - azul) de cada mastocitoma cutâneo avaliado por CGHarray (n=10). Nexusversion 5.0

5.3. Alterações representativas no número de cópias genômicas em mastocitomas cutâneos caninos através de CGHarray.

Foram avaliadas as alterações presentes em no mínimo 20% dos casos de MCT para serem consideradas representativas, independentes da sobrevivência dos pacientes

Avaliando-se o número total de casos, foram observados 153 genes que apresentaram alteração em mais de 20% das amostras de mastocitomas (112 genes apresentando ganho e 41 genes apresentando perda do número de cópias). Deste total de genes, 91 tiveram a função caracterizada. Os cromossomos que apresentaram alterações no número de cópias representativas foram os cromossomos 1, 2, 5, 6, 8, 9, 16, 18, 19, 26, 27 e 36. O cromossomo 8 foi o que apresentou maior número de alterações no número de cópias representativas (3 alterações – duas perdas e um ganho) porém relacionadas a regiões não caracterizadas.

Os cromossomos que apresentam genes caracterizados e relacionados com o processo de desenvolvimento tumoral estão listados na Tabela 3.

Na análise das funções celulares ou moleculares, avaliadas no MCT, com o auxílio do programa computacional *Ingenuity Pathways Analysis* (IPA), os principais processos celulares relacionados aos genes alterados e que tem correlação com o processo de carcinogênese foram: desenvolvimento celular, crescimento e proliferação celular, morte e sobrevivência celular, movimento celular e morfologia tumoral. (Figura 3)

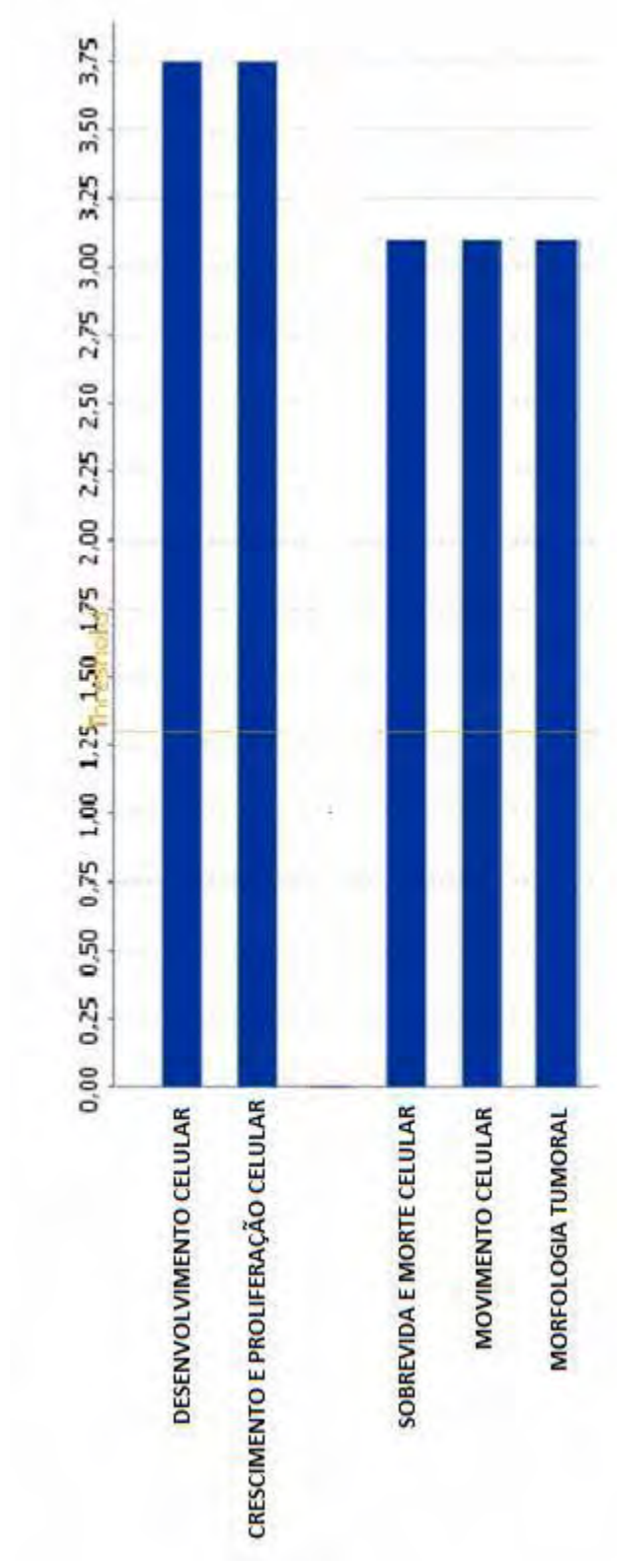


Figura 3 - Principais funções celulares e moleculares alteradas nos mastocitomas cutâneos caninos e sua intensidade de alteração avaliados através do programa computacional *Ingenuity Pathways Analysis* (IPA) (n=10)

Tabela 3. Relação dos cromossomos alterados, tipo de alteração e principais genes caracterizados em mastocitomas cutâneos caninos avaliados através da técnica de CGHarray.

| Cromossomo | Alteração | Frequência % | Valor-p | Genes identificados |
|-------------------|------------------|---------------------|----------------|--|
| 1 | Ganho | 20 | 0,021 | TLE-1 |
| 2 | Ganho | 20 | 0,023 | ARAP3, DIAPH1, FCHSD1, PCDHGA10, PCDHGA6, PCDHGA7, PCDHGA8, PCDHGB3, PCDHGB4, PCDHGB5, PCDHGB6, PCDHGB7, PCDHGC3, RELL2 |
| 6 | Ganho | 30 | 0,034 | DNAJB4, GIPC2 |
| 16 | Ganho | 30 | 0,0 | CBD103, CBD104, SPAG11, SPAG11E |
| 18 | Ganho | 20 | 0,038 | BLVRA, HECW1, STK17A |
| 26 | Perda | 30 | 0,0 | ACTA2, ANKRD22, ATAD1, CH25H, FAS, LIPA, LIPF, LIPJ, LIPK, LIPM, MINPP1, PAPSS2, PTEN, RNLS, STAMBPL1 |
| 27 | Ganho | 20 | 0,0 | ADIPOR2, AKAP3, ANO2, ATP6V1E1, B4GALNT3, BCL2L13, CACNA1C, CACNA2D4, CCDC77, CCND2, DCP1B, DDX11, EFCAB4B, ERC1, FBXL14, FGF23, FGF6, FKBP4, FOXM1, FYTTD1, GALNT8, IL17RA, IQSEC3, ITFG2, KCNA1, KCNA5, KCNA6, KDM5A, LRMT2, MAP3K, MICAL3, NDUFA9, NINJ2, NRIP2, NTF3, PARP11, PEX26, PRMT8, RAD51AP1, RAD52, SLC25A18, SLC6A12, SLC6A13, TEAD4, TSPAN11, TSPAN9, TUBA8, TULP3, USP18, WASH1, WNK1, WNT5B |

5.4 Alterações no número de cópias genômicas nos mastocitomas cutâneos caninos de acordo com a sobrevida dos cães.

No grupo SV<6 houve 75 genes caracterizados que apresentaram ganho e 16 genes caracterizados que apresentaram perda no número de cópias. No grupo SV>12 foram identificados 24 genes com ganho no número de cópias (estes mesmos genes também foram identificados no grupo SV<6) e nenhum gene deste grupo apresentou perda no número de cópias (Tabela 4).

Dos genes atualmente caracterizados, foram selecionados os genes que apresentam relação conhecida com o desenvolvimento tumoral e correlacionado de acordo com o grupo, segundo a sobrevida dos pacientes.

Tabela 4 – Alterações no número de cópias nos genes caracterizados, segundo o grupo de sobrevivência

| | Grupo SV>12 | Grupo SV<6 |
|--|--|--|
| Total de genes alterados | 24 | 91 |
| Total de genes | | |
| caracterizados localizados em regiões de ganho | 24 | 75 |
| Total de genes | | |
| caracterizados localizados em regiões de perda | - | 16 |
| Genes caracterizados em regiões de ganho | <i>TLE-1</i> (25% dos casos) <i>GIPC2</i> (50% dos casos) | <i>TLE-1</i> (16,6% dos casos) <i>GIPC2</i> (33% dos casos) <i>MAPK3</i> (33% dos casos) <i>FOXM1</i> (33% dos casos) <i>FGF23</i> (33% dos casos) <i>FGF 6</i> (33% dos casos) <i>CCND2</i> (33% dos casos) <i>WNTB5</i> (33% dos casos) |
| Genes caracterizados em regiões de perda | - | <i>PTEN</i> (50% dos casos) <i>FAS</i> (50% dos casos) <i>MINPP1</i> (50% casos) |

5.5. Genes encontrados em regiões de perdas no número de cópias genômicas em mastocitomas caninos através da técnica de CGHarray e sua relação com a sobrevida dos cães

Os principais genes encontrados em regiões de perda no número de cópias estão localizados no cromossomo 26. No total foram encontrados 16 genes em regiões de perda, que até este momento já estão caracterizados. Os principais genes dessa região que apresentam correlação com o desenvolvimento neoplásico estão apresentados na Tabela 4 e correlacionados com os pacientes, segundo os grupos SV>12 e SV<6 (Tabela 4).

O gene *PTEN* (*Phosphatase and tensin homolog*) localizado no cromossomo 26 apresentou diminuição no número de cópias em 50% dos casos do grupo SV<6, sendo que um dos casos apresentou perda em homozigose (ambos os alelos). Em relação ao grupo SV>12, nenhum paciente apresentou alteração no número de cópias desse gene (Tabela 4).

A região do gene *MINPP1* apresentou perda no número de cópias em 50% dos pacientes do grupo SV<6, sem alteração no grupo SV>12 (Tabela 4).

O gene *FAS*, também localizado no cromossomo 26, apresentou diminuição no número de cópias (duas perdas e uma perda em homozigose) em 50% dos pacientes do grupo SV<6 e nenhuma alteração nos pacientes do grupo SV>12 (Tabela 4).

5.6. Genes encontrados em regiões de ganhos no número de cópias genômicas em mastocitomas caninos através da técnica de CGHarray e sua relação com a sobrevida dos cães.

Os principais genes encontrados em regiões de ganho de cópia que estiveram presentes em mais de 20% das amostras tumorais testadas estão localizados nos cromossomos 1, 2, 6, 16, 18 e 27.

No cromossomo 27, uma alteração importante encontrada em 33% dos tumores do grupo SV<6 foi o ganho no número de cópias na porção

correspondente ao gene *MAPK3*. Não houve alteração deste gene no grupo SV>12 (Tabela 4).

Além do gene *MAPK3*, outras alterações importantes foram localizadas no cromossomo 27, como ganhos nas porções dos genes *WNT5B*, *FOXM1* e *FGF 6e FGF23*. Todos estes genes apresentaram ganho no número de cópias, presentes 33% dos tumores do grupo SV<6. Não foram observadas alterações nas amostras tumorais do grupo SV>12 (Tabela 4).

A região do gene *CCND2* no cromossomo 27, que codifica a proteína G1/S-specific cyclin-D2 apresentou ganho no número de cópias em 33% dos casos do grupo SV<6, sem alteração no grupo SV>12(Tabela 4).

O único gene alterado, encontrado no cromossomo 1, foi o *TLE-1* que codifica a *transducin-like enhancer protein 1* apresentando ganho de cópias em 25% dos pacientes do grupo SV>12 e em 16,6% dos pacientes do grupo SV<6 (Tabela 4).

A avaliação do cromossomo 2, permitiu a identificação de uma alteração no número de cópias localizadas na porção correspondente ao gene *GIPC2*, pertencente a família do *GIPC*, em 50% das amostras avaliadas. Foram observados ganhos em 50% dos casos do grupo SV>12 e em 33% dos casos do grupo SV<6.

5.7. Identificação dos genes alterados e suas participações nas vias canônicas em mastocitoma cutâneo canino e a relação com a sobrevida dos cães

A análise dos genes, com o auxílio do programa computacional *Ingenuity Pathways Analysis* (IPA), permitiu a identificação de vias canônicas que apresentaram genes alterados no presente estudo e podem ter relação com o desenvolvimento neoplásico. Dentre as diversas vias estudadas, a via do *PTEN*, a via de apoptose e a via do *FGF* podem ser consideradas importantes no processo de carcinogênese (Figuras 4, 5 e 6, respectivamente).

Na via do *PTEN*, dois genes importantes que participam desta via estavam alterados na avaliação dos MCT. O gene *PTEN*, que é um importante supressor de tumor, apresentou perda em 50% dos casos do SV<6 (marcação verde na figura) e o *ERK (MAPK)* (marcação laranja na figura) considerado um

gene importante na migração, crescimento e progressão do ciclo celular, apresentou ganho em 33% dos casos no grupo SV<6.

Outra via importante para o desenvolvimento neoplásico é a via de apoptose. Dentro dessa via, o gene *FAS* é um gene central da via, como pode ser visto na Figura 5. A porção que codifica o gene *FAS* apresentou-se diminuída em 50% os casos do grupo SV<6 e em nenhum caso do grupo SV>12.

Além das vias de apoptose e via do *PTEN*, outra via importante e que se apresentou alterada foi a via do *FGF*. A porção que codifica o gene *FGF* e o *MAPK (ERK)* mostrou-se com ganho no número de cópias em 33% dos casos SV<6

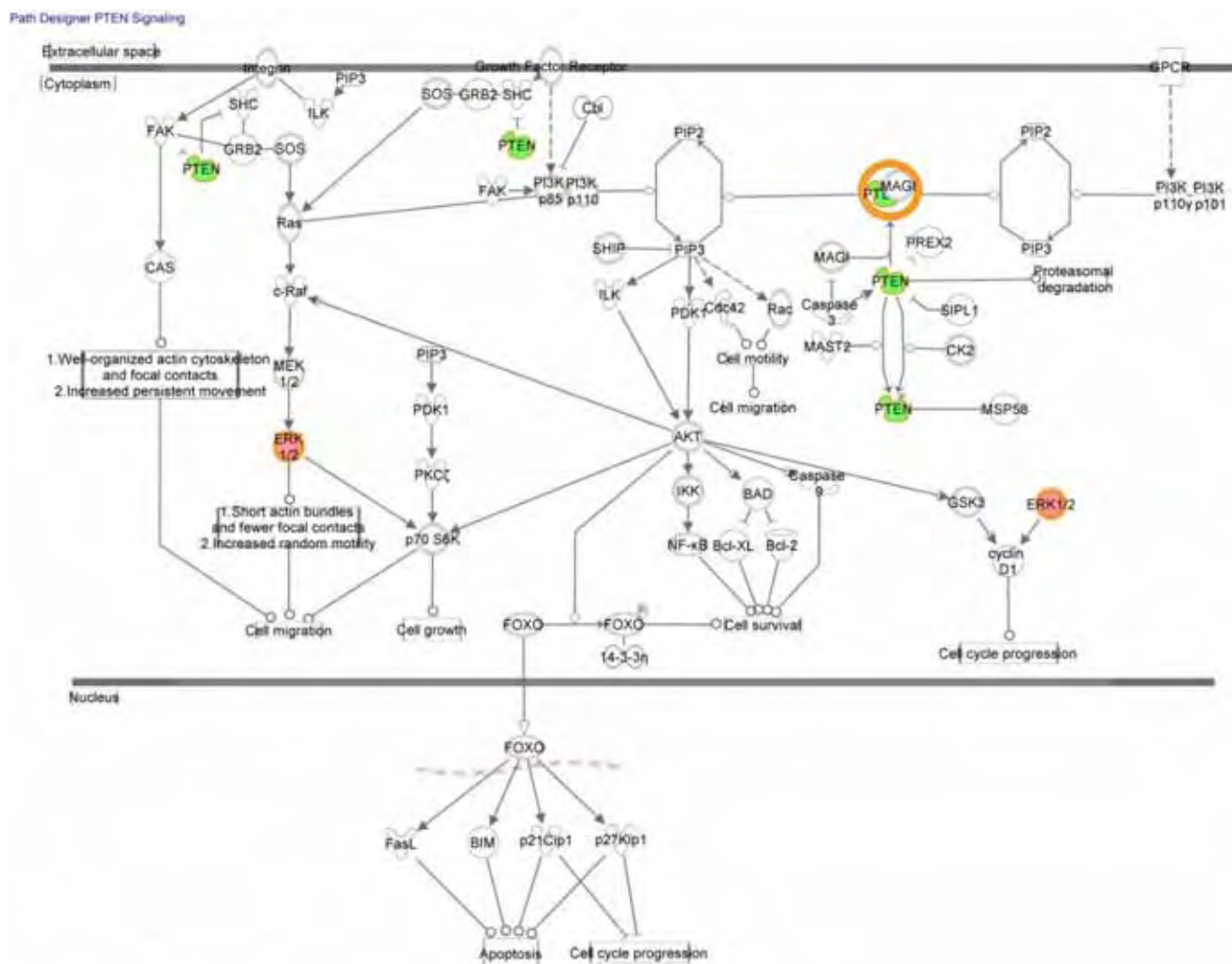
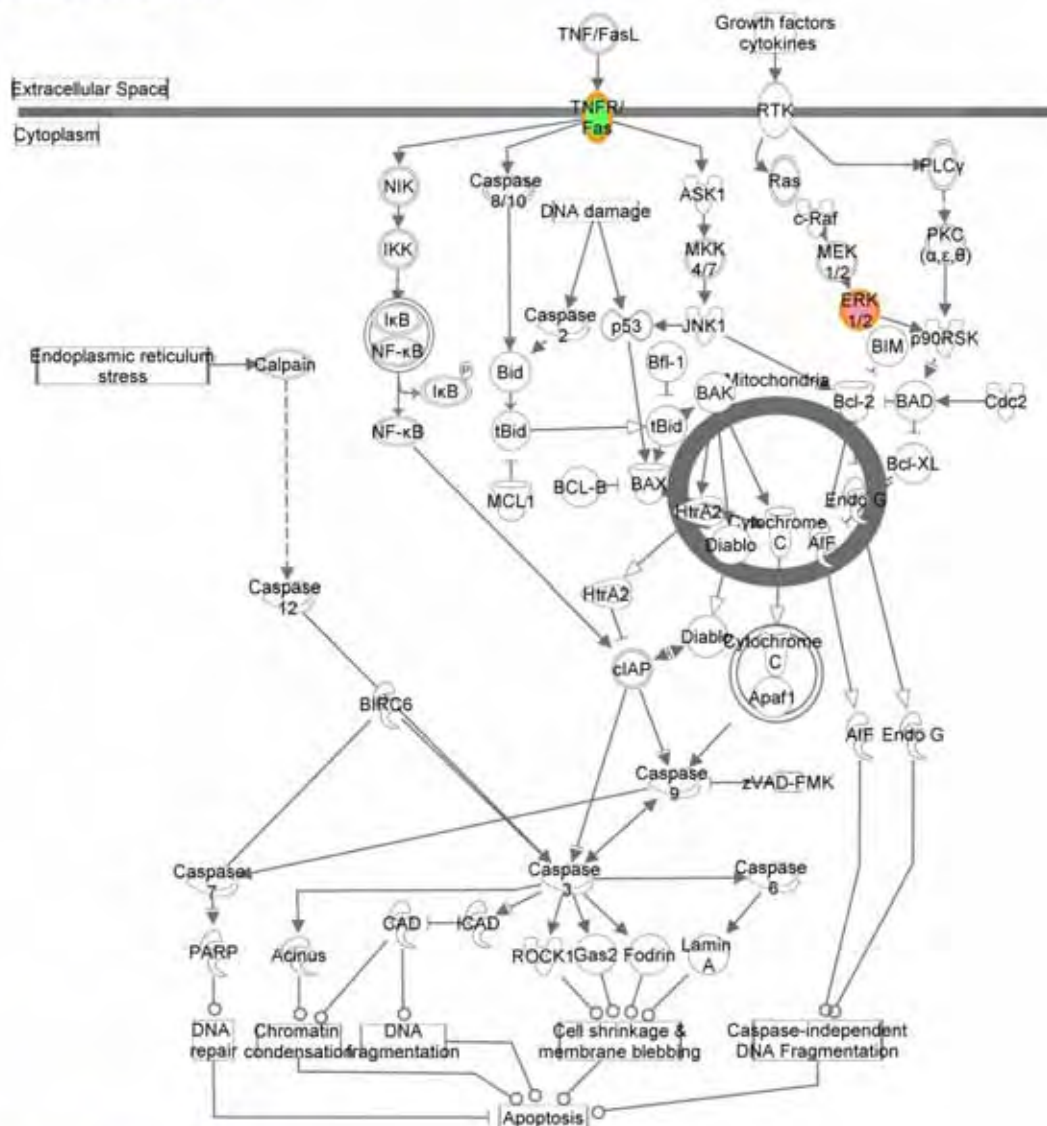


Figura 4. Representação gráfica dos genes com ganho (laranja) e perda (verde) do número de cópias, avaliados pela técnica de CGHarray, na via canônica do *PTEN*. Imagens geradas pelo software *Ingenuity Pathways Analysis*.



© 2000-2012 Ingenuity Systems, Inc. All rights reserved.

Figura 5. Representação gráfica dos genes com ganho (laranja) e perda (verde) do número de cópias, avaliados pela técnica de CGHarray, na via canônica da apoptose. Imagens geradas pelo software *Ingenuity Pathways Analysis*.

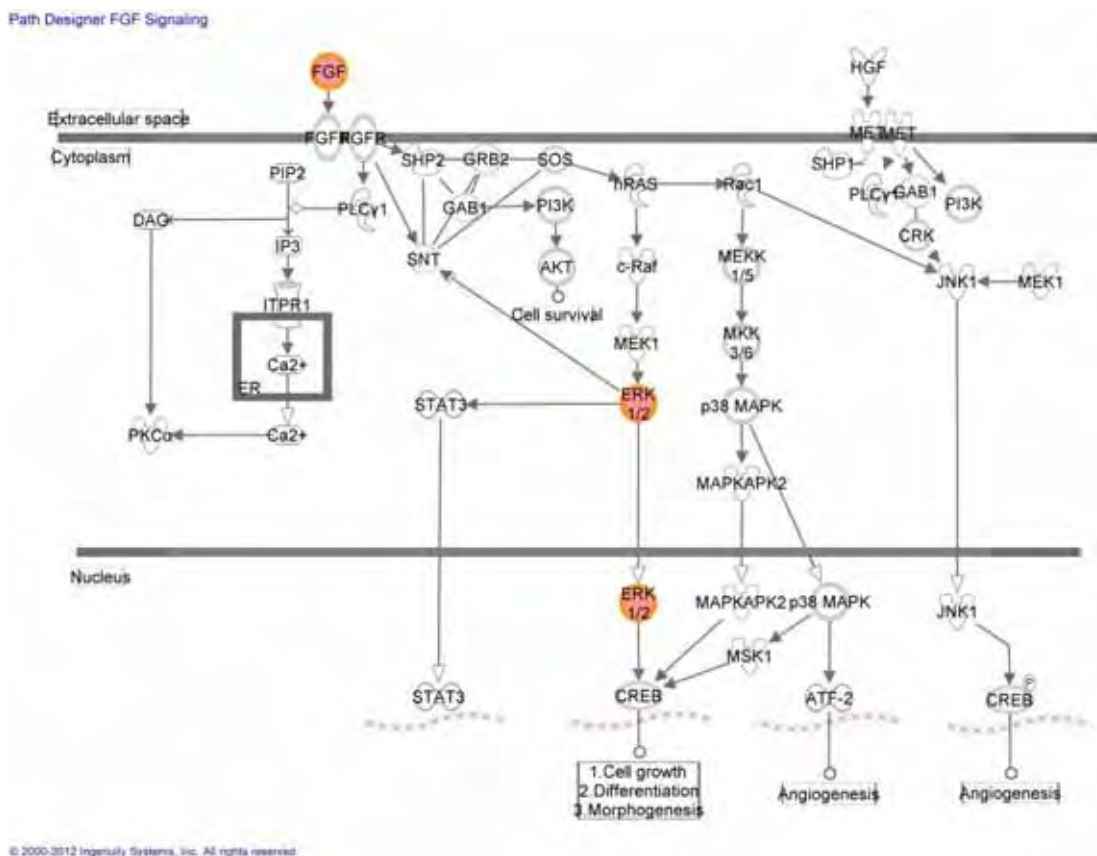


Figura 6. Representação gráfica dos genes com ganho (laranja) e perda (verde) do número de cópias, avaliados pela técnica de CGHarray, na via canônica do *FGF*. Imagens geradas pelo software *Ingenuity Pathways Analysis*.

6. DISCUSSÃO

MCT são tumores de comportamento clínico altamente variável (DE NARDI, 2002), o que lhes confere uma gama de estudos, nos quais se buscam aspectos que possam auxiliar no estabelecimento do prognóstico (KIUPEL et al., 2004; O'CONNELL; THOMSON, 2011). Um deles relaciona o maior tamanho do tumor e a presença de ulceração ao pior prognóstico (HANH et al., 2004), concordando com o visto neste estudo. Todos os cães grupo SV<6 apresentaram ao menos um nódulo maior que 3 cm e quatro deles ainda apresentavam, ao menos, um nódulo ulcerado. Por sua vez, no grupo SV>12 apenas um cão apresentou nódulo maior que 3 cm e não foi observado presença de ulceração neste grupo. Três cães apresentaram mais de um nódulo e estes pertenciam ao grupo SV<6, característica também muitas vezes associada a um prognóstico negativo (KIUPEL et al., 2005), embora não seja consenso entre os autores (MULLINS et al., 2006; MURPHY et al., 2006; O'CONNELL et al., 2011). Quatro cães do grupo SV<6 apresentaram tumores localizados em coxins, prepúcio, região inguinal e lábio, regiões anatômicas associadas a pior prognóstico por alguns pesquisadores (GOUVIER et al., 2003; COUTO, 2006; THAMM et al., 2007), muito embora a utilização deste critério como fator prognóstico permaneça incerta (KIUPEL et al. 2005., O'CONNELL; THOMSON, 2011). 66,6% dos cães do grupo SV<6 apresentaram metástase no momento do diagnóstico, contra nenhum do grupo SV>12, e este é um fator seguramente relacionado a um menor tempo de sobrevivência dos pacientes (THAMM et al. 2007).

A porcentagem de metástase em linfonodo dos cães avaliados pode estar subestimada, uma vez que a realização da punção biópsia aspirativa não é o "padrão ouro" para detecção desse tipo de metástase. Também pode ter dificultado a detecção de metástase em órgão abdominal, no momento do diagnóstico, a punção biópsia aspirativa hepática e esplênica ter sido realizada apenas nos animais que apresentavam nódulos, ou alterações sugestivas no exame ultrassonográfico. Todavia, Book et al. (2011), comentam que a sensibilidade do exame ultrassonográfico na detecção de metástase de MCT em baço e fígado é de 43% e 0%, respectivamente, o que sugere a necessidade de realização de biópsia aspirativa, ou de exame histopatológico

dos órgãos alvos de metástase em todos os casos de MCT, independente dos achados ultrassonográficos.

A classificação histopatológica baseada nos critérios propostos por Patnaik et al. (1984) para os MCT é o principal fator prognóstico, já que se correlaciona com o tempo de sobrevida, mormente haja relatos na literatura que demonstram a dificuldade de classificação por este critério, uma vez que os mesmos são subjetivos (NORTHRUP et al. 2005; PINCZOWSKI et al. 2008). Devido a esta dificuldade encontrada na classificação de Patnaik et al. (1984), a nova classificação em alto e baixo grau de Kiupel et al. (2011), correlacionam os de alto grau a uma sobrevida menor que quatro meses, e próxima a dois anos nos de baixo grau, concordando com os achados deste estudo. Por esta classificação, todos os animais do grupo SV>12, apresentaram MCT de baixo grau, enquanto cinco de seis do grupo SV<6 apresentaram mastocitoma de alto grau. Todavia, um dos cães do grupo SV<6 apresentou MCT de baixo grau, embora tivesse um nódulo maior que 3 cm, ulcerado e presença de metástase em baço no momento do diagnóstico o que pode ter colaborado para evolução desfavorável do quadro. Este animal não recebeu a quimioterapia devido a não aceitação do tratamento por parte de seu proprietário. Este caso ilustra que a avaliação do grau histopatológico, independente da classificação adotada, se a de Patnaik et al. (1984) ou de Kiupel et al. (2011), é um importante fator de prognóstico, porém não deve ser o único critério avaliado e considerado na decisão do tratamento e no estabelecimento do prognóstico dos pacientes.

Alterações no número de cópias genômicas e genes envolvidos em regiões alteradas podem auxiliar no entendimento do comportamento clínico dos MCT e no estabelecimento do prognóstico, como já descrito para outros tumores (THOMAS et al., 2009a; THOMAS et al., 2009b; TANG et al., 2010). Como esperado, cães do grupo SV<6 apresentaram média de CNA de 85, enquanto os do grupo SV>12 de 11,25. Esta alteração nas CNA entre grupos com prognóstico distintos também foi observada em tumores colorretais caninos (TANG et al.2010). Os animais com adenomas apresentaram média de CNA muito inferior ao grupo com adenocarcinoma colorretal, sugerindo uma relação entre o número de CNA e a progressão da doença, o que concorda com o estudo em tela.

Além do estudo do número total de CNA no cariótipo dos animais, também foram avaliados o perfil de perdas e ganhos em cada cromossomo do cariótipo e estes dados foram comparados a outros estudos que utilizaram a técnica de CGHarray. O padrão de alterações no número de cópias genômicas encontradas no estudo Thomas et al (2009a) em 5 linhagens de células de TVT, foi similar ao encontrado no presente estudo, onde foram observadas alterações distribuídas em regiões específicas do cromossomo, sem alterações de perda completa de um cromossomo. Interessante observar que os cromossomos com maior número de alterações não foram os mesmos nos dois estudos. No presente, os cromossomos com maior número de alterações totais (perdas e ganhos) de cópias genômicas foram os cromossomos 6 e 11. E quando avaliado individualmente as perdas e ganhos, os cromossomos com maiores números de alterações foram o 11 (perda) e o 14 (ganho). Thomas et al. (2009a) observaram no estudo do TVT que os cromossomos com maior número de alterações em ganho foram os cromossomos 2, 7, 13, 14, 33, e os cromossomos com maiores perdas no número de cópias foram os cromossomos 2, 3, 12, 21, 22, 23, 32, 34, 37, 38. Apenas o cromossomo 14 apresentou aumento expressivo no ganho de cópias genômicas, similar entre os dois estudos. O mesmo grupo de pesquisa encontrou resultados diferentes quando estudou o perfil de alterações no número de cópias genômicas em osteossarcomas caninos. Os cromossomos com maior ganho no número de cópias genômicas foram os cromossomos 13 e 31 e os com maior número de perda foram os cromossomos 16, 18, 29 e 35 (THOMAS et al., 2009b). Os resultados poderiam ser justificados por tratar-se de neoplasias distintas, relacionados possivelmente a diferentes processos de carcinogênese.

As regiões com alterações no número de cópias genômicas no MCT apresentaram importantes genes relacionados ao desenvolvimento tumoral. Os principais genes encontrados em regiões de perda no número de cópias, presentes em 50% das amostras apenas do grupo SV<6 foram os genes *PTEN*, *FAS*, *MINPP1*.

O gene *PTEN* é um importante supressor de tumor, participa de diferentes processos celulares, incluindo sua função de regular negativamente a ativação do *Akt* inibindo a via de sinalização do *PI3K-Akt* que é importante no processo de crescimento e sobrevivência celular. Através das vias de sinalização, o

PTEN pode inibir a progressão da fase S do ciclo celular; estimular a apoptose pelo bloqueio da ativação da *Akt* levando ao aumento da atividade da *BAD* e da caspase 9; inibir a angiogênese induzida por hipóxia, bloqueando a produção de *VEGF* mediada por *Akt*; inibir a migração celular mediada por *Akt* (TSUGAWA et al. 2002). Entretanto, a diminuição da atividade do gene *PTEN*, que pode ser sugerida pela diminuição no número de cópias genômicas na porção do cromossomo 26, que codifica este gene (encontrada em 50% dos casos do grupo SV<6, sendo uma perda em homozigose) pode acarretar aumento na proliferação e diminuição da morte celular, condições fundamentais para o desenvolvimento tumoral (TSUGAWA et al. 2002; KENIRY & PARSONS, 2008; CARRACEDO et al. 2011).

A participação do *PTEN* no desenvolvimento de diversas neoplasias em cães e gatos já foi investigada (KOENIG et al. 2002; LEVINE et al. 2002; RESSEL et al. 2009). Nas neoplasias mamárias caninas, a perda de expressão da proteína *PTEN* foi correlacionada com invasão linfática, metástase em linfonodo e a distância, recorrência tumoral e menor tempo de sobrevivência. Nos felinos houve correlação entre a perda de expressão de *PTEN* e a invasão linfática (RESSEL et al., 2009). Também, pesquisadores sugeriram que a deleção do gene *PTEN* tem participação efetiva no desenvolvimento do osteossarcoma canino (LEVINE et al., 2002; THOMAS et al., 2009b)

Além do gene *PTEN*, o cromossomo 26 apresentou perda no número de cópias na região do gene *FAS*. Esta alteração foi encontrada em 50% dos casos do grupo SV<6 e não foi detectada no SV>12. O gene *FAS* codifica o receptor de antígeno de apoptose 1, que está presente na superfície da célula e funciona como um receptor de morte, importante no processo de apoptose (HANAHAN & WEINBERG, 2011). A apoptose é um evento que envolve um programa extrínseco e um intrínseco. O programa extrínseco recebe e processa sinais externos de indução de morte celular programada, sendo que nesse processo o complexo *FAS* receptor/*FAS* ligante tem fundamental importância em conduzir a ativação da caspase 8, a qual inicia o processo de apoptose através da ativação de outras caspases (GHOBRIAL et al. 2005). Além do processo extrínseco, existe um circuito intrínseco mediado pela família do *Bcl-2* que possui fatores pró e anti-apoptóticos. Ambos os processos (extrínseco e intrínseco) culminam com a ativação das caspases 8 e 9,

respectivamente, desencadeando a apoptose (GHOBRIAL et al. 2005; HANAHAN & WEINBERG, 2011). Em algumas células a ativação da caspase 8 da via extrínseca pode ser o único requisito necessário para a morte celular, enquanto que em outros processos a caspase 8 interage com a via intrínseca para execução deste processo (GHOBRIAL et al. 2005).

Embora a participação do complexo *FAS* receptor/*FAS* ligante esteja bem elucidado na indução da apoptose, e conseqüentemente na prevenção da evolução do tumor, alguns estudos demonstram que este complexo pode ter participação dúbia no processo neoplásico, uma vez que a expressão do *FAS* ligante pelo tumor pode levar a apoptose de linfócitos, e desta forma prejudicar a resposta imune frente ao tumor (O'CONNEL et al. 1996; ABRAHAMS et al. 2003).

Outro gene localizado no cromossomo 26, que em humanos apresenta localização próxima ao gene *PTEN*, e que a perda em heterozigose, possivelmente, esteja relacionada ao carcinoma de tireoide humano é o gene *MINPP1* (*Multiple inositol polyphosphate phosphatase*). Semelhante ao estudo anteriormente citado, os MCT que apresentaram perda do *PTEN*, também apresentaram perda no *MINPP*, contudo o significado deste achado ainda não foi elucidado (GIMM et al. 2001).

Em relação aos genes localizados em regiões de ganho no número de cópias, o *MAPK3* (*Mitogen-activated protein kinases*), originalmente chamado de *ERK1/2*, estava alterado em 33% dos casos do grupo SV<6. A via de *MAPK/ERK* se inicia com um receptor na superfície celular, que quando ligado a uma molécula de sinalização desencadeia uma série de reações, que culminam com o envio de sinal para o núcleo para promover a divisão celular (SEGER & KREBS, 1995; RUBINFELD & SEGER, 2005). A ativação da via do *MAPK/ERK* é um evento frequente no processo de carcinogênese e está relacionado com a migração celular, regulação da apoptose e angiogênese, processos que são essenciais durante a metástase (REDDY et al. 2003).

Membros da família do *MAPK* também estão envolvidos na regulação negativa do receptor de morte celular *FAS*. Particularmente o *MAPK3/ERK1/2*, conhecido por induzir o crescimento celular e diferenciação, prolongando a sobrevivência da célula (TRAN et al, 2001). Estudos demonstraram que o

ERK1/2 ativado é capaz de suprimir a apoptose de linfócitos T mediados por receptor *FAS* (HOLMSTROM et al. 1998).

Embora na literatura consultada não tenham sido encontrados estudos da participação do *MAPK/ERK* no desenvolvimento tumoral em cães, diversos trabalhos em medicina humana correlacionaram a ativação desse gene a neoplasias (VICENT et al. 2004; SLATTERY et al. 2012), podendo, inclusive, aumentar o risco de desenvolvimento de câncer colorretal (SLATTERY et al., 2012).

Além do *MAPK3*, outro gene importante encontrado em região de ganho em 33% dos MCT do grupo SV<6 foi o *WNT5B*, pertencente a família *WNT*. A via de sinalização *WNT* desempenha um papel-chave na carcinogênese e embriogênese, e moléculas de sinalização *WNT* são alvos potentes para prevenção, diagnóstico e tratamento do câncer (SAITOH & KATOH, 2002).

A ativação da via do *WNT* leva a estabilização da β -catenina, que por sua vez desempenha duas funções aparentemente distintas, uma vez que tem crucial importância na adesão célula-célula porém participa também como um componente de sinalização da via do *WNT*, levando a ativação da transcrição de genes específicos e importantes na gênese de um número de neoplasia em humanos, tais como câncer de cólon, melanoma, carcinoma hepatocelular, carcinoma de ovário, carcinoma de endométrio, carcinoma de próstata, meduloblastoma (MORIN, 1999). Em tumores cutâneos melanocíticos em cães foi identificado que na via do *WNT*/ β -catenina, o acúmulo de β -catenina parece participar do desenvolvimento desta neoplasia (HAN et. al., 2010), e assim como no estudo de Han et al. (2010), o complexo *WNT*/ β -catenina pode ser importante durante a carcinogênese dos MCT.

Outros genes importantes e alterados neste estudo de MCT foram os genes da família dos fatores de crescimento de fibroblastos (*FGF*). O *FGF6* e o *FGF 23* apresentaram ganho em 33% dos mastocitomas do grupo SV<6. Já foi descrito que os fatores de crescimento de fibroblastos (FGFs) controlam uma grande variedade de funções biológicas, dentre elas, a regulação de proliferação, migração e diferenciação celular (TURNER & GROSE, 2010), tornando os genes dessa família alvos terapêuticos importante no tratamento antineoplásico, através da produção de fármacos capazes de inibir a ativação dos receptores de fator de crescimento de fibroblasto, (KNIGHTS & COOK,

2010). Embora ainda não tenha estudos a respeito do uso destas terapias no tratamento de MCT caninos, estes genes poderiam ser alvos de pesquisas futuras para o tratamento desta neoplasia.

Além dos genes já identificados, que sabidamente participam do processo carcinogênico em diversas neoplasias humanas e caninas, outros genes apresentaram-se alterados no estudo do MCT. No futuro, novas pesquisas poderão correlacionar estes genes com o desenvolvimento tumoral.

A avaliação das vias envolvidas no desenvolvimento dos MCT de pior prognóstico, permite a identificação e a correlação entre os genes que podem ser responsáveis por um comportamento mais agressivo, de pior prognóstico, e desta forma, serem estes alvo de estudo para terapia molecular.

7. CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo, de acordo com a metodologia empregada permitiram concluir:

- MCT de animais com menor sobrevida apresentam maior alteração no número de cópias genômicas em comparação a MCT de pacientes com maior sobrevida;
- genes importantes no processo de carcinogênese apresentam regiões com ganho e perda no número de cópias genômicas nos MCT de pacientes com menor sobrevida;
- regiões de perda nos genes *PTEN*, *FAS* e regiões de ganho nos genes *MAPK3*, *WNT5B*, *FGF* foram detectados nos MCT de pacientes com menor sobrevida;
- no grupo SV>12 não foram encontrados genes em regiões de perda no número de cópias genômicas.
- a via do *PTEN*, via da apoptose e a via do *FGF* parecem ser importantes no desenvolvimento dos MCT cutâneos caninos.

8.REFERÊNCIAS*

ABRAHANS, V.M.; KAMSTEEG, M.; MOR, G. the FAS/FAS ligant system and cancer. **Molecular Biotechnology**, v.25, p.19-30, 2003.

ALBERTSON, D.G.; COLLINS, C.; MCCORMICK, F.; GRAY, J.W.; Chromosome aberrations in solid tumors. **Nature Genetics**, v.34, n.4, p.369-376, 2003.

ANSTADT, A.Y.; REIF-MOTSINGER, A.; THOMAS, R.; KISSEBERTH, W.C.; COUTO, C.H.; DUVAL, D.L.; NIELSEN, D.M.; MODIANO, J.F.; BREEN, M. Characterization of canine osteosarcoma by array comparative genomic hybridization and RT-qPCR: signatures of genomic imbalance in canine osteosarcoma parallel the human counterpart. **Genes, chromosomes and cancer**, v.50, p. 859-874, 2011.

ARGYLE, D.J. Molecular/targeted therapy of cancer. WITHROW, S.J., MACEWEN, E.G. **Small Animal Clinical Oncology**.4.ed. Philadelphia: WB Saunders, 2007: 236-74.

BLACKWOOD, L.; MURPHY, S.; BURACCO, P.; DEVOS, J.P.; FORNEL-THIBAUD, P.; HIRSCBERGER, J.; KESSLER, M.; PASTOR, J.; PONCE, F.; SAVARY-BATAILLE, K.; ARGYLE, D.J. European consensus document on mast cell tumours in dogs and cats. **Veterinary and Comparative Oncology**, v.10, n.3, p.1-29, 2012.

BOOK, AP.; FIDEL, J.; WILLS, T.; BRYAN, J., SELTON, R.; MATTOON, J. Correlation of ultrasound findings, liver and spleen cytology, and prognosis in the clinical staging of high metastatic risk canine mast cell tumors. **Veterinary Radiology and Ultrasound**, v.52, n.5, p. 548-54, 2011.

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

BREEN, M. Update on genomics in veterinary oncology. **Topics in Companion Animal Medicine**, v.24, n.3, p.113-121, 2009.

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

CARRACEDO, A.; ALIMONTI, A.; PANDOLFI, P.P. Pten level in tumor suppression: how much is too little. **Cancer Research**, v.71, n.3. p.629-633, 2009.

COOPER, M.; TSAI, X.; BENNET, P. Combination CCNU and vinblastine chemotherapy for caninemast cell tumours: 57 cases. **Veterinary and Comparative Oncology**, v.7, n.3, p.196–206, 2009.

COUTO CG. Tumores de mastócitos em cães e gatos. NELSON RW., COUTO CG. Medicina Interna de Pequenos Animais, 3 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006: 1109-11.

COSTA-CASAGRANDE, T.A.; ELIAS, D.S.; MELO, S.R.; MATERA, J.M. Estudo retrospectivo do mastocitoma canino no serviço de cirurgia de pequenos animais – Hospital veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. **Archives of Veterinary Science**. v.13, n.3, p.176-183, 2008.

DALECK, C.R., ROCHA, N.S., FURLANI, J.M., CESAR, J.R.F. Mastocitoma. DALECK, C.R., DE NARDI, A.B., RODASKI, S. **Oncologia em cães e gatos**. São Paulo: Roca, 2009: 282-92.

DE NARDI, A.B.; RODASKI, S.; SOUSA, R.S.; COSTA, T.A.; MACEDO, T.R.; RODIGHIERI, S.M.; RIOS, A.; PIEKARZ, C.H. Prevalência de neoplasias e modalidades de tratamentos em cães, atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal do Paraná. **Archives of Veterinary Science**. v.7, n.2, p.15-26, 2002.

DENICOLA, D.B. Células redondas. COWELL, R.L., TYLER, R.D., MEINKOTH, J.H., DENICOLA, D.B. **Diagnóstico Citológico e Hematologia de Cães e Gatos**.3 ed. São Paulo: Medvet, 2009: 68-77.

DUMM, K.A.; THOMAS, R.; BINNS, M.M.; BREEN, M. Comparative genomic hybridization (CGH) in dogs – application to the study of a canine glial tumours cell line. **The Veterinary Journal**. v.160, p. 77-82, 2000.

FROLOV, A.E.; GODWIN, A.K.; FAVOROVA, O.O. Differential gene expression analysis by DNA microarray technology and its application in molecular oncology. **Molecular Biology**, v. 37, n.3, p. 486-494, 2003.

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

GIMM, O.; CHI, H.; DAHIA, P.L.; PERREN, A.; HINZE, R.; KOMMINOTH, P.; DRALLE, H.; REYNOLD, P.P.; ENG, C. Somatic mutation and germline variants of MINPP1, a phosphatase gene located in proximity to PTEN on 10q23.3 in follicular thyroid carcinomas., v.86, n.4, p. 1801-1805, 2001.

GOVIER, S.M. Principles of treatment for mast cell tumour. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**, v.18, p.103-106, 2003

- GHOBRAL, I.M.; WITZIG, T.E.; ADJEL, A.A. Targeting apoptosis pathway in cancer therapy. **Cancer Journal of Clinicians**, v.55, p. 178-194, 2005.
- HAHN, K.A.; KING, G.K.; CARRERAS, J.K. Efficacy of radiation therapy for incompletely resected grade-III mast cell tumors in dogs 31 cases (1987–1998). **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 224, p. 79–82, 2004.
- HAN, J.I.; KIM, D.Y.; NA, K.J. Dysregulation of the Wnt/beta-catenin signaling pathway in canine cutaneous melanotic tumor. **Veterinary Pathology**, v.47, n.2, p.285-291, 2010.
- HANAHAHAN, D.; WEINBERG, R.A. Hallmark of cancer. **Cell**, v. 144, p. 646-674, 2011.
- HANH, K.A.; LEGENDRE, A.M.; SHAW, N.G.; PHILLIPS, B.; OGILVIE, G.K.; PRESCOTT, D.M.; ATWATER, S.W.; CARRERAS, J.K.; LANA, S.E.; LADUE, T.; RUSK, A.; KINET, J.P.; DUBREUIL, P.; MOUSSY, A.; HERMINE, O. Evaluation of 12- and 24-month survival rates after treatment with masitinib in dogs with nonresectable mast cell tumors. **American Journal of Veterinary Research**. v.71, p.1354-1361, 2010
- HOLMSTROM, T.H.; CHOW, S.C.; EOL, I.; COFFEY, E.T.; ORRENIES, S.; SISTONEN, L.; ERIKSSON, J.E. **Journal of Immunology**. Suppression of Fas/APO-1-mediated apoptosis by mitogen-activated kinase signaling, v.160, p.2626-2636, 1998.
- ISHKANIAN, A.S.; ZAFARANA, G.; THOMS, J.; BRISTOW, R.G. Array CGH as a potential predictor of radiocurability in intermediate risk prostate cancer. **Acta Oncology**. v. 49, n.7, p.888-894, 2010.
- ISOTANI, M.; ISHIDA, N.; TOMINAGA, M.; TAMURA, K.; YAGIHARA, H.; OCHI, S.; KATO, R.; KOBAYASHI, T.; FUGITA, M.; FUJINO, Y.; SETOGUCHI, K.; 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
- JARK, P.C.; MACHADO, L.H.A.; SAKATE, M.; CALAZANS, S.G.; CAPUA, M.L.B.; TINUCCI-COSTA, M.; DE NARDI, A.B. Inibidores de receptor de tirosina quinase no tratamento de mastocitoma em cães – revisão. **Clinica Veterinária**, v.99, p.50-57, 2012.
- KALLIONIEMI, A.; KALLIONIEMI, O.P.; SUDAR, D.; RUTOVITZ, D.; GRAY, J.W.; WALDMAN F.; PINKEL D. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. **Science, New Series**, v.258, n 5083. p. 818-821, 1992.
- KENIRY, M.; PARSONS, R. The role of PTEN signaling perturbations in cancer and in targeted therapy. **Oncogene**, v.27, p.5477-5485, 2008.

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

KIUPEL, M.; WEBSTER, D.J.; MILLER, R.A.; KANEENE, J.B. Impact of tumor depth, tumor location and multiple synchronous masses on the prognosis of canine cutaneous mast cell tumours. **Journal of Veterinary Medical Association**, v.52, n.6, p.280-286, 2005.

KIUPEL, M.; WEBSTER, J.D.; BAILEY, K.L.; BEST, S.; DELAY, J.; DENTRISAC, C.J.; FITZGERALD, S.D.; GAMBLE, D.; GINN, P.E.; GOLDSCHIMIDT, 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.; NEYEN, I.; O'TOOLE, D., RAMOS-VARA, J.; SCASE, T.J.; SCHUMAN, 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 2-tier histologic gradind system for canine cutaneous mast cell tumors to more accurately predict biological behavior. **Veterinary Pathology**, v.48, n.1, p 147-55, 2011.

KNIGHTS, V.; COOK, S.J. De-regulated FGF receptors as therapeutic targets in cancer. **Pharmacology Therapy**, v. 125, n.1, p. 105-117, 2010.

KOENIG, A.; BIANCO, S.R.; FOSMIRE, S.; WOJCIESZYN, J.; MODIANO, J.F. Expression and significance of p53, Rb, p21/*waf-1*, p16/*ink-4a*, and PTEN tumor suppressor in canine melanoma. **Veterinary Pathology**, v.39, p.458-472, 2002.

KROL, M.; PAWLOWSKI, K.M.; OTREBSKA, D.; MOTYL, T. DNA microarray – future in oncology research and therapy. **Journal of pre-clinical and Clinical research**. v. 2. n.2, p.91-96, 2008.

LEVINE, R.A.; FOREST, T.; SMITH, C. Tumor suppressor *PTEN* is mutated in canine osteosarcoma cell line and tumors. **Veterinary Pathology**, v.39, p.372-378, 2002.

LONDON, C.A. Tyrosine kinase inhibitors in veterinary medicine. **Topic in Companion Animal Medicine**, v. 24, p.106-112, 2009

MACNEILL, A.L. Cytology of canine and feline cutaneous and subcutaneous lesions and lymph nodes. **Topic in Companion Animal Medicine**, v. 26, n.2, p. 67-76, 2011.

MEIRELLES, A.E.W.B.; OLIVEIRA, E.C.; RODRIGUES, B.A.; COSTA, G.R.; SONNE, L.; TESSER, E.S.; DRIEMEIER, D. Prevalência de neoplasmas cutâneos em cães da região metropolitana de Porto Alegre, RS: 1.017 casos (2002-2007). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.30, n.11, p. 968-973, 2010.

MORIN, P.J. Beta catenin signaling and cancer. **Bioessays**, v.21, n.12, p.1021-1030, 1999.

MULLER, M.H.; REIMANN-BERG, N.; BULLERDIEK, J.; ESCOBAR, H.M. Genetic characterization of dogs via chromosomal analysis and array based comparative genomic hybridization (aCGH). **Tierarztl Prax**, v.40, p.55-58, 2012

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

MURPHY, S.; SPARKES, A.H.; BLUNDEN, A.S.; BREARLEY, M.J.; SMITH, K.C. Effects of stage and number of tumours on prognosis of dogs with cutaneous mast cell tumours. **Veterinary Records**, v.158, p. 287-291, 2006.

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. Uniform use of a single grading reference 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.561-64, 2005.

O'CONNEL, J.; O'SULLIVAN, G.C.; COLLINS, J.K.; SHANAHAN, F. The Fas counterattack: Fas-mediated T cell killing by colon cancer cell expressing Fas ligand. **The Journal of Experimental medicine**, v.184, n.3, p.1075-1082, 1996.

O'CONNELL, K.; THOMPSON, M. Evaluation of prognostic indicators in dogs with multiple, simultaneously occurring cutaneous mast cell tumours: 63 cases. **Veterinary Comparative Oncology**, 2011

OJOPI, E.P.B.; NETO-DIAS, E. Genomica e Oncologia. In: MIR, L. **Genomica**. Ed. Atheneu, SP, 2004 p. 363-387.

OKAMOTO, O.K. DNA microarray in cancer diagnosis and prognosis. **Einstein**, v.3, p.31-34, 2005

PARK, H.; KIM, J.I.; JU, Y.S.; GOKCUMEN, O.; MILLS, R.E.; KIM, S. Discovery of common Asian copy number variants using integrated high-resolution array CGH and massively parallel DNA sequencing. **Natural Genetics**, v. 42, n.5, p.400-405, 2010.

PARKER, H.G.; KIM, L.V.; SUTTER, N.B. Genetic structure of the purebred domestic dog. **Science**, v.304, p.1160-1164, 2004

PATNAIK, A.K.; EHLER, W.J.; MACEVEN, E.G. Canine cutaneous mast cell tumor: morphologic grading and survival time em 83 dogs. **Veterinary Pathology**, v.21, p. 469-74, 1984.

PINCZOWSKI, P.; TORRES-NETO, R.; FABRIS, V. E.; LAUFER-AMORIM, R. Mastocitoma canino: abordagem histopatológica e imunoistoquímica na busca de biomarcadores prognósticos. **Clínica Veterinária**, v.77, p.76-80, 2008.

PINKEL D.; ALBERTSON D.G. Array comparative genomic hybridization and its applications in cancer. **Annual Review Genomics and Human Genetics**, v. 6, p.331–54, 2005.

REDDY, K.B.; NABHA, S.M.; ATANASKOVA, N. The role of MAP kinase in tumor progression and invasion. **Cancer and metastasis reviews**, v.22, n.4, p.395-403, 2003.

RESSEL, L.; MILLANTA, F.; CALERI, E.; INNOCENTI, V.M.; POLI, A. Reduced PTEN protein expression and its prognostic implication in canine and feline mammary tumours. **Veterinary Pathology**, v.46, p.860-868, 2009.

ROMANSIK, E.M.; REILLY, C.M.; KASS, P.H.; MOORE, P.F.; LONDON, C.A. Mitotic index is predictive for survival for canine cutaneous mast cell tumors. **Veterinary Pathology**, v. 44, n.3, p 335-341, 2007.

RUBINFELD, H.; SEGER, R. The ERK cascade. **Molecular Biotechnology**, v.32, n.2, p.151-174, 2005.

SAITOH, T.; KATOH, M. Expression and regulation of WNT5A and WNT5B in human cancer: up-regulation of WNT5A by TNF α in MKN45 cells and up-regulation of WNT5B by beta-estradiol in MCF-7 cells. **International Journal of Molecular Medicine**, v.10, n.3. p.345-349, 2002

SANTARIUS, T.; SHIPLEY, J.; BREWER, D.; STRATTON, M.R.; COOPER, C.S. A census of amplified and overexpressed human cancer genes. **Nature Reviews Cancer**, v. 10, p.59–64, 2010.

SEBER, R.; KREBS, E.G. The MAPK signaling cascade. **The FASEB Journal**. v.9, p.726-735, 1995

SLATERRY, M.L.; LUNDGREEN, A.; WOLFF, R.K. MAP kinase genes and colon and rectal cancer. **Carcinogenesis**, v.33, n.12. p. 2398-2408, 2012.

SOUZA, T.M.; FIGHERA, R.A.; IRIGOYEN, L.F.; BARROS, C.S.L. Estudo retrospectivo de 761 tumores cutâneos em cães. **Ciência Rural**, v. 36, n.2, p. 555-560, 2006.

STRATTON, M.R.; CAMPBELL, P.J.; FUTREAL, P.A. The cancer genome. **Nature**. v. 458, p.719–724, 2009.

STREFEZZI, R.F.; XAVIER, J.G.; CATÃO-DIAS, J.L. Morphometry of canine cutaneous mast cell tumors. **Veterinary Pathology**. v.40, p.268–275, 2003

STREFEZZI, R.F.; XAVIER, J.G.; KLEEB, S.R.; CATAO-DIAS, J.L. Nuclear morphometry in cytopathology: a prognostic indicator for canine cutaneous mast cell tumors. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.21, p.821–825, 2009.

TAKAHASHI, T.; KADOSAWA, T.; NAGASE, M.; MATSUNAGA, S.; MOCHIZUKI, M.; NISHIMURA, R.; SASAKI, N. Visceral mast cell tumours in dogs: 10 cases (1982-1997). **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.216, n.2, p.222-226, 2000.

TANG, J.; LE, S.; SUN, L.; YAN, X.; ZHANG, M.; MACLEOD, J.; LEROY B., NORTHRUP, N.; ELLIS, A.; YEATMAN, T.I.; LIANG, Y.; ZWICK, M.E., ZHAO, S. Copy number abnormalities in sporadic canine colorectal cancers. **Genome Research**, v.20, p341-350, 2010.

THAMM, D.H.; TUREK, M.M.; VAIL, D.M. Outcome and prognostic factors following adjuvant prednisone/vimblastine chemotherapy for high-risk canine mast cell tumour:61 cases. **The Journal of Veterinary Medical Science**. v.68, p. 581-587, 2006.

THAMM, D.H.; VAIL, D.M.G. Mast cell tumors. WITHROW, S.J., MACEWEN, E.G. **Small animal Clinical Oncology**, 4. Ed. Philadelphia: WB Saunders, 2007: 402-24.

THOMAS, R.; SMITH, K.C.; OSTRANDER, E.A.; GALIBERT, F., BREEN, M. Chromosome aberration in canine multicentric lymphomas detected with comparative genomic hybridization and a panel of single locus probe. **British Journal of Cancer**. v.89, n.8, p. 1530-1537, 2003.

THOMAS, R.; SCOTT, A.; LANGFORD, C.F. Construction of a 2-Mb resolution BAC microarrays for CGH analysis of canine tumors. **Genomic Research**, v.15, p. 1831-1837, 2005

THOMAS, R.; DUKE, S.E.; BLOOM, S.K.; BREEN, T.E.; YOUNG, A.C.; FEISTE, E.; SEISER, E.L.; TSAI, P.; LANGFORD, C.F.; ELLIS, P.; KARLSSON, E.K.; LINDBLAD-TOH, K.; BREEN, M. A cytogenetically characterized, genome anchored 10 Mb BAC set and CGH array for the domestic dog. **Journal of Heredity**, v.98, n.5, 474-484, 2007.

THOMAS, R.; REBBECK, C.; LEROI, A.M.; BURT, A.; BREEN, M. Extensive conservation of genomic imbalances in canine transmissible venereal tumors (CTVT) detected by microarray-based CGH analysis. **Chromosome research**, v.17, p927-934, 2009a.

THOMAS, R.; TSAI, P.C.; LANGFORD, C.F.; FOSMIRE, S.P.; JUBALA, C.M.; GETZY, D.M.; CUTTER, G. R.; MODIANO, J.F.; BREEN, M. Influence of genetic background on tumor karyotypes: evidences for breed-associated cytogenetic aberrations in canine appendicular osteosarcoma. **Chromosome Research**, v. 17, p. 365-377, 2009b.

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 prognosis indices. **Veterinary Pathology**, v.48, p. 156-168, 2011.

THURSON, G.; GALE, N. W. Vascular endothelial growth factor and other signaling pathways in developmental and pathologic angiogenesis. **Internal Journal Hematology**, v. 80, p 7-20, 2004.

TRAN, S.E.F.; HOLMSTROM, T.H.; AHONE, M.; KAHARI, V.M.; ERIKSSON, J.E. MAPK/ERK Overrides the Apoptotic Signaling from Fas, TNF, and TRAIL Receptors. **Journal of Biological Chemistry**, v.276, n.19, p. 16484-16490, 2001

TSUGAWA, K.; JONES, M.K.; SUGIMACHI, K.; SARFEH, I.J.; TARNAWSKI, A.S. Biologic role of phosphate PTEN in cancer and tissue injury. **Frontiers in Bioscience**, v. 7, p.245-251, 2002

TURIN L., ACOCELLA F., STEFANELLO D., OSELIERO A., FONDRINI D., BRIZZOLA S., RIVA F. Expression of *c-KIT* proto-oncogene in canine mastocytoma: a kinetic study using real-time polymerase chain reaction. **Journal of Veterinary Diagnosis Investigation**, v.18, n.4, p. 343-349, 2006.

TURNER, N.; GROSER, R. Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer. **Nature Reviews Cancer**, v.10, n.2, p.116-129, 2010.

VICENT, S.; LOPEZ-PICAZO, J.M.; TOLEDO, G.; LOZANO, M.D.; TORRE, W.; GARCIA-CORCHON, C.; QUERO, C.; SORIA, J.C.; MARTIN-ALGARRA, S.; MANZANO, R.G.; MONTUENGA, L.M. ERK1/2 is activated in non-small-cell lung cancer and associated with advanced tumours. **British Journal of Cancer**, v.90, p.1047-1052, 2004.

VILLAMIL, J.A.; HENRY, C.J.; BRYAN, J.N.; ELLERSIECK, M.; SCHULTZ, L.; TYLER, J.W. Identification of the most common cutaneous neoplasms in dogs and evaluation of breed and age distribution for selected neoplasms. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 239, n. p 960-965, 2011.

WEBSTER, J.D.; YUZBASIYAN-GURKAN, V.; MILLER, R.; KANEENE, J.B.; KIUPEL, M. Cellular proliferation in canine cutaneous mast cell tumors: associations with c-KIT and its role in prognostication. **Veterinary Pathology**, v. 44, p. 298-308, 2007.

WELLE MM.; BLEY CR.; HOWARD J.; RÜFENACHT S. Canine mast cell tumors: a review of the pathogenesis, clinical features, pathology and treatment. **Veterinary Dermatology**, v. 19, p. 321-29, 2008.

YAMADA, O.; KOBAYASHI, M.; SUGISAKI, O.; ISHII, N.; ITO, K.; KUROKI, S.; SASAKI, Y.; ISOTANI, M.; ONO, K.; WASHIZU, T.; BONKOBARA, M.; Imatinib elicited a favorable response in a dog with a mast cell tumor carrying a c-kit c.1523A>T mutation via suppression of constitutive KIT activation. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.142, p. 101-106, 2011

ZEMKE D.; YAMINI B.; YUZBASIYANGURKAN V. Mutations in the juxtamembrane domain of *c-KIT* are associated with higher grade mast cell tumors in dogs. **Veterinary Pathology**, v. 39, p. 529-35, 2002.