

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

**MASTOCITOMA CANINO: ABORDAGEM
HISTOPATOLÓGICA E IMUNOISTOQUÍMICA NA
BUSCA DE BIOMARCADORES PROGNÓSTICOS**

PEDRO PINCZOWSKI

Dissertação apresentada à Faculdade
de Medicina Veterinária e Zootecnia,
Universidade Estadual Paulista “Julio
de Mesquita Filho”, Campus Botucatu,
para obtenção do título de Mestre.

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

Botucatu, SP
Março, 2008

PEDRO PINCZOWSKI

MASTOCITOMA CANINO: ABORDAGEM HISTOPATOLÓGICA E
IMUNOISTOQUÍMICA NA BUSCA DE BIOMARCADORES
PROGNÓSTICOS

Banca examinadora:

Prof. Ass. Dr^a. Renée Laufer Amorim

Prof. Ass. Dr. Luiz Henrique de Araújo Machado

Prof. Ass. Dr. Paulo César Maiorka

Botucatu, 07 de Março de 2008.

Dedico este trabalho:

Aos meus pais por sempre me apoiarem e incentivarem a dar o melhor de mim.

Aos meus primos André e Ana Paula Kipnis por serem uma das principais razões por eu me tornar um Médico Veterinário.

Ao meu Zeide por ser minha primeira grande inspiração na vida, sendo o responsável pelo meu ingresso na área médica.

AGRADECIMENTOS:

A minha orientadora, professora, mãe, amiga Renée Laufer Amorim por sempre me ajudar de uma forma alegre e me acompanhar desde o início.

A todos meus amigos da XXXVII I por muitos anos de aprendizado e amizade.

Aos meus colegas de residência da Unifeob: Rick, Lê, Van, Lu P., entre outros, que proporcionaram um ano tanto fantástico quanto surpreendente.

Aos meus tutores e amigos em São João da Boa Vista: Prof^a. Veridiana, Prof^o. Ênio e Helder.

Aos Professores Luiz Henrique de Araújo Machado, Cláudia Valéria Seullner Brandão, João Carlos Pinheiro Ferreira, Paulo César Maiorka por toda ajuda proporcionada durante estes 2 anos.

Aos Residentes e também amigos da Patologia: Giu, Arita, Didier, Anita e Tici, pelas horas de trabalho sempre com muita descontração.

Aos Residentes da CCPA pela ajuda na coleta do material.

Aos amigos PGs da patologia, pois só sendo PG pra saber como é a vida: Giovana, Celmira, Marcela, Oba, Sandra, Fabito, Caio, Luciano, Galega, Gui, Ana Paula e Camila.

Ao Rafa pelos momentos de ajuda, risadas e brigas! Conviver todos os dias trabalhando junto não é fácil!

Ao meu amigo Leandro por uma ótima convivência.

A Prof^a. Dr^a. Noeme Souza Rocha por sempre estar presente para qualquer tipo de ajuda.

Ao Prof^o. Andrigo Barboza de Nardi, Sabryna Calazans e José Carlos Barbosa pela ajuda no momento final da dissertação.

Ao Maury Raul e Noel. Pessoas como vocês que fazem o “barco” andar.

A Kelly, Joyce, Mariana e Renata por toda ajuda disponibilizada.

A Lu, Ju, Gus, Jana, Bern, Vitória e Acácia por muitas e muitas horas de risadas!

A Fabiana por sempre ser um exemplo na minha vida.

A D.M. por quebrar paradigmas.

Ao Baggins, Dumbo, Kuna, K-bo, Pensa, Tele, Bico por muitos momentos de descontração.

A Eliana por ser uma pessoa especial na minha vida.

Ao Draco e Magnus por serem fiéis e companheiros.

A Atlética da veterinária por dois anos de muito trabalho e diversão

Aos meus mais novos amigos da XLII e XLIII.

Aos funcionários da Pós-Graduação por toda ajuda, facilitando todo o andamento do mestrado.

A Fapesp pela bolsa concedida e apoio financeiro ao projeto.

“A vida é uma bela fantasia que vestimos juntos”

Charles Chaplin

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	viii
ABSTRACT	x
INTRODUÇÃO	1
OBJETIVOS	2
REVISÃO DE LITERATURA	3
O Mastocitoma	3
Diagnóstico	4
Histopatologia e Citologia	5
Prostaglandia E ₂ (PGE ₂)	6
Fator de Crescimento do Endotélio Vascular	8
c-KIT	10
MASTOCITOMA CUTÂNEO CANINO: VARIAÇÃO ENTRE OBSERVADORES NA GRADUAÇÃO HISTOPATOLÓGICA.	12
Resumo	13
Abstract	13
Resumen	14
Introdução	15
Material e Métodos	16
Resultados	16
Discussão e Conclusão	19
Referências	21
EXPRESSÃO DE C-KIT COMO CRITÉRIO DE DIFERENCIAÇÃO DOS MASTOCITOMAS CUTÂNEOS CANINOS	22
Resumo	23
Introdução	24
Material e Métodos	25
Resultados	27
Discussão e Conclusão	32
Referências	36
EXPRESSÃO DE PGE ₂ E VEGF EM MASTOCITOMAS CUTÂNEOS CANINOS	38
Resumo	39
Introdução	40
Material e Métodos	41
Resultados	43
Discussão	51
Conclusões	54
Referências	55
DISCUSSÃO GERAL	57
CONCLUSÕES GERAIS	62
REFERÊNCIAS	63

PINCZOWSKI, P. Mastocitoma canino: abordagem histopatológica e imunohistoquímica na busca de biomarcadores prognósticos. Botucatu, 2008, 68p., Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”.

RESUMO

O mastocitoma ou tumor de mastócitos é a neoplasia cutânea mais comum em cães. O sistema de graduação histopatológico proposto por Patnaik *et al.* (1984), é um importante critério preditivo para o estadiamento da neoplasia e determinação de terapia adjuvante. O grau I representa a neoplasia bem diferenciada, o grau II a moderadamente diferenciada e o grau III a pouco diferenciada ou anaplásica. Alguns autores demonstraram a discrepância entre observadores quando realizadas comparações nas graduações histopatológicas, devendo-se principalmente a subjetividade do sistema atualmente utilizado. A busca de biomarcadores prognósticos pode ser feita utilizando-se anticorpos primários contra as proteínas envolvidas no processo de iniciação, promoção e progressão tumoral, angiogênese, além mediadores inflamatórios. Estudos foram realizados avaliando-se a expressão de c-KIT (indutor de proliferação celular), VEGF (indutor de angiogênese), PGE2 (mediador inflamatório), com a graduação histopatológica. Além de uma avaliação do próprio sistema de graduação. Foi observada uma discrepância ao avaliar 42 casos de mastocitomas, onde em 21,4% dos casos houve concordância entre os quatro observadores envolvidos no estudo. Em 45 mastocitomas avaliados não houve correlação entre a intensidade de expressão de c-KIT com a graduação histopatológica. No entanto o padrão de marcação de c-KIT apresenta correlação com a graduação histopatológica, sendo a membranosa mais frequente no grau I, citoplasmática difusa no grau II e citoplasmática focal no grau III. Ao correlacionar o percentual de células marcadas por campo e a intensidade de coloração do VEGF e PGE2 com a graduação histopatológica de 53 mastocitomas, não houve correlação estatística da expressão de VEGF, visto que todos mastocitomas expressam altas quantidades de VEGF. Quanto ao PGE2 há correlação estatística do percentual de células marcadas quando comparados os graus I e III. Frente

aos resultados apresentados é possível concluir que o mastocitoma cutâneo canino é uma neoplasia potencialmente maligna, independente do grau histopatológico e que critérios como padrão de imunomarcção do c-KIT podem auxiliar na graduação e que o percentual de células marcadas para PGE2 possa servir como biomarcador prognóstico.

PINCZOWSKI, P. Canine mast cell tumor: Histopathologic and imunoistochemic approach in the search for prognostical biomarkers. Botucatu, 2008, 68p., Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”.

ABSTRACT

The mast cell tumor is the most common cutaneous neoplasia in dogs. The histopathologic grading system proposed by Patnaik *et al.* (1984) is an important predictive criteria for stablishing the neoplasia staging and therapy. The grade I represents a well differentiated neoplasia, grade II a moderate differentiated, and grade III a poorly differentiated or anaplastic. Some authors demonstrated a disagreement among pathologists when comparing histopathologic grading, due mainly to the subjective grading system in use. The search for prognostic biomarkers can be made using primary antibodies against proteins involved in the process of tumor initiation, promotion and progression, angiogenesis and inflammatory mediators. Studies were made evaluating c-KIT (cellular proliferation inductor), VEGF (angiogenesis inductor) and PGE2 (inflammatory mediator) expression and its correlation with the histopathologic grading. A evaluation of the grading system itself was also performed. It was found a disagreement when evaluating 42 canine cutaneous mast cell tumors, where 21,4% of the tumors had agreement of all four pathologists. In 45 mast cell tumors evaluated, there was no correlation between the c-KIT expression intensity and the histopathologic grading. However the expression pattern of c-KIT presented a correlation with the histopathologic grading, where the membrane pattern was more frequent in grade I, diffuse cytoplasmatic in grade II and focal cytoplasmatic in grade III. When correlating the percentual of marked cells and the expression intensity of VEGF and PGE2 with the histopathologic grading of 53 mast cell tumors, there was no statistical correlation of VEGF, due to all mast cell tumors express high levels of VEGF. The PGE2 presented correlation between the percentual of marked cells when comparing grades I and III. Due to the results found it is possible to conclude that the canine cutaneous mast cell tumor is a potentially

malignant neoplasia, no matter the histopathologic grading, and that criterias such as c-KIT imunolabelling pattern can aid in grading and the percentual of PGE2 marked cells can be used as prognostic biomarker.

1.Introdução

O mastocitoma é a neoplasia maligna constituída por mastócitos, que corresponde de 11 a 27% de todas as neoplasias cutâneas em cães. O mastocitoma aparece mais freqüentemente em membros pélvicos e torácicos, abdômen, tórax e cabeça. No entanto a neoplasia pode se metastatizar para linfonodos regionais e outros órgãos (ROGERS, 1996).

A compreensão total do diagnóstico, tratamento e comportamento biológico do mastocitoma é de extrema importância, portanto muitos estudos tem sido desenvolvidos que objetivam a obtenção de valores preditivos, que possam auxiliar na escolha do tratamento e na obtenção de um prognóstico acurado (LONDON e SEGUIN, 2003).

De todos os métodos de classificação de mastocitomas e estabelecimento do prognóstico, a graduação histopatológica parece ser a de maior consistência preditiva. O esquema proposto por Patnaik *et al.* (1984), utiliza informações derivadas da análise de diferentes atributos histomorfológicos (tamanho do tumor, celularidade, morfologia celular, índice mitótico e reação estromal). No entanto, o comportamento clínico dos mastocitomas é imprevisível e melhores técnicas prognósticas são necessárias para identificação de pacientes com alto risco de recorrência e óbito (GROSS *et al.*, 2005).

As prostaglandinas são os principais metabólitos do ciclo do ácido aracdônico, responsáveis por inúmeros processos fisiológicos (RANDY *et al.*, 2001) além de estudos mostrarem grandes concentrações de prostaglandinas E₂ produzidas por células neoplásicas (LUPULESCU, 1996; ARA *et al.*, 1996).

Assim como demonstraram Doré *et al.* (2003) a COX-2 tem uma estreita relação com neoplasias, estimulando a proliferação celular, a angiogênese e inibindo a apoptose, havendo uma maior concentração em neoplasias malignas do que em benignas, portanto, a PGE2 por ser metabólito da COX, também deve possuir uma relação com o desenvolvimento neoplásico maligno.

O VEGF também conhecido como fator de permeabilidade vascular é uma potente citocina angiogênica indutora de mitoses, reguladora da permeabilidade celular endotelial (FERRARA, 1996), além de prolongar a sobrevivência de neovascularizações pela indução da expressão de proteínas como o Bcl-2 (RANIERI *et al.*, 2001). Sendo assim, mostra sua intensa relação com a carcinogênese e progressão tumoral.

A proteína KIT (fator de crescimento de mastócitos, Stem cell factor - SCF), codificada pelo proto-oncogene c-KIT estimula a maturação celular, proliferação e ativação de mastócitos (HILL, 2002). A fosforilação da proteína KIT resulta em uma ativação de receptores tirosina quinase em mastócitos e uma subsequente proliferação celular (LONGLEY e METCALFE, 2000).

Três padrões de marcação para o c-KIT foram identificados no mastocitomas, sendo eles membranoso, citoplasmático focal e citoplasmático difuso. Esse padrões foram correlacioandos com a graduação histopatológica mostrando haver uma intensa relação com o prognóstico dos mastocitomas caninos (WEBSTER *et al.* 2007).

2. Objetivos

Visto a ambiguidade na graduação histopatológica e a necessidade da utilização de biomarcadores para a determinação de um prognóstico acurado nos mastocitomas caninos, os objetivos deste estudo foram:

- Avaliar a expressão da PGE2 no mastocitoma cutâneo canino.
- Avaliar a expressão do VEGF no mastocitoma cutâneo canino.
- Correlacionar o escore de imunomarcção da PGE2 com a graduação histopatológica do mastocitoma cutâneo canino.
- Correlacionar o escore de imunomarcção da VEGF com a graduação histopatológica do mastocitoma cutâneo canino.
- Avaliar a expressão de c-KIT no mastocitoma cutâneo canino
- Correlacionar a intensidade e o padrão de marcação do c-KIT (CD117) com a graduação histopatológica no mastocitoma cutâneo canino
- Avaliar se esses anticorpos poderão ser usados como biomarcadores prognósticos no mastocitoma cutâneo canino.

2. Revisão de Literatura

O Mastocitoma

O mastocitoma ou tumor de mastócitos é a neoplasia cutânea mais comum em cães, não havendo predileção por sexo, mas sim por raça, sendo o Buldogue Inglês, Bull Terrier Inglês, Boxer, Boston Terrier, Pug, American Pitt Bull Terrier, Weimaraner, Bullmastiff, Labrador Retriever, Setter Inglês, Beagle e Golden Retriever os mais acometidos (ROGERS, 1996, THAMM e VAIL, 2007).

Nos cães, os mastocitomas ocorrem com maior frequência nos membros pélvicos (24,6%), no abdômen (17,2%), tórax (14,7%), membros torácicos (13,6%) e cabeça (9,8%). Podem aparecer também em vísceras, como baço, fígado e rins. O tumor surge de forma saliente na pele, normalmente como um nódulo, podendo variar de 2 a 5 cm de diâmetro e de 1 a 3 cm de altura (JONES *et al.*, 2000). As formas mais malignas ou mais indiferenciadas crescem rapidamente no início e causam metástases por via linfática e hematogêna.

O mastocitoma pode tornar-se muito infiltrativo, levando a dificuldade de identificação das margens cirúrgicas, por isso a importância de uma ampla excisão cirúrgica, além da associação a algum tipo de terapia conservativa (quimioterapia, radioterapia, etc.) (JONES *et al.*, 2000, THAMM e VAIL, 2007).

Os sinais clínicos do mastocitoma dependem muito da região acometida, da evolução da neoplasia, assim como de suas complicações secundárias. O mastocitoma cutâneo é a forma mais comum, podendo mostrar-se pruriginoso, ulcerativo, edematoso e eritematoso, devido à liberação de histamina pelas células neoplásicas. Além disso, a degranulação dos mastócitos causa disfunções gastroentéricas como vômitos, anorexia, melena e ulcerações. Úlceras duodenais são muito comuns, aparecendo em 80% dos casos. As úlceras gastroentéricas podem romper-se levando a um quadro de peritonite. Mais ocasionalmente, podem ocorrer hipergamaglobulinemia, coagulopatias e glomerulonefrites. Animais com mastocitoma mostram-se imunossuprimidos, ou seja, mais propensos a infecções secundárias. A linfadenomegalia aparece comumente em casos de metástases (THAMM e VAIL, 2007).

Várias classificações histopatológicas foram propostas para identificar o grau de diferenciação do mastocitoma canino, porém nenhum método de classificação é mais amplamente utilizado que o de Patnaik *et al.* (1984), no qual parâmetros morfológicos subjetivos são considerados. O sistema de graduação histopatológico de Patnaik é um importante critério preditivo para o estadiamento da neoplasia e determinação de terapias adjuvantes (FAN e LORIMIER, 2005). O grau I representa a neoplasia bem diferenciada, o grau II a moderadamente diferenciada e o grau III a pouco diferenciada ou anaplásica. Variações intra e interobservadores tem sido o principal problema desta classificação, Northup *et al.* (2005) demonstraram uma diferença significativa entre patologistas na graduação histopatológica do mastocitoma, utilizando o sistema de Patnaik. Apesar da graduação de Patnaik apresentar valor preditivo, quanto ao tempo de sobrevivência nos tumores bem diferenciados e nos indiferenciados, os tumores de grau intermediário (grau II) trazem dificuldades de avaliação (KIUPEL *et al.*, 2004).

Diagnóstico

Para que haja um diagnóstico eficiente é necessário que se faça uma boa anamnese, exame clínico, citologia aspirativa ou biópsia da massa, assim como radiografia ou ultra-sonografia, nos casos de suspeita de neoplasias viscerais. A citologia aspirativa e a biópsia servem para graduação dos mastocitomas, sendo de extrema importância para a escolha terapêutica e determinação do prognóstico. Muitos fatores têm sido usados para prever o comportamento biológico do mastocitoma. Dentre eles a graduação histológica parece ser o fator mais importante no auxílio à determinação do prognóstico. Neoplasias mais diferenciadas tendem a possuir um prognóstico mais favorável e as indiferenciadas um prognóstico reservado (ROGERS, 1996).

Com um exame físico detalhado é possível localizar as massas existentes. Alterações sistêmicas como esplenomegalia e/ou hepatomegalia podem ser sinais de metástase. Ainda, os linfonodos devem ser palpados meticulosamente. O quadro 1 mostra possíveis classificações por estágios clínicos de cães com mastocitoma, de acordo com a classificação da Organização Mundial de Saúde.

Quadro 1 – Possíveis classificações por estágios clínicos de cães com mastocitoma de acordo com a Organização Mundial de Saúde e descrito por Ladue *et al.* (1998).

Estágio Clínico	Descrição
0	Uma lesão confinada a derme sem envolvimento de linfonodos regionais, sendo possível à ressecção cirúrgica. Não há evidência de metástase e raramente se desenvolve doença sistêmica.
I	Uma lesão confinada a derme sem envolvimento de linfonodos regionais
II	Uma lesão confinada a derme com envolvimento de linfonodos regionais.
III	Lesões dérmicas múltiplas ou uma grande neoplasia infiltrativa com ou sem envolvimento de linfonodos regionais. Não há evidencia de metástase a distância ou de sinais de doenças sistêmicas.
IV	Qualquer neoplasia com envolvimento metastático a distância ou recidiva com metástase. Há evidências de sinais sistêmicos.

Histopatologia e Citologia

O diagnóstico dos tumores de mastócitos é relativamente simples, de forma que naqueles bem diferenciados, normalmente não há problema em sua identificação histológica. Os mastocitomas formam normalmente folhetos difusos de cordões densamente compactados de células redondas ou poligonais, contendo um núcleo redondo, posicionado no centro da célula e quantidades moderadas de citoplasma basofílico grosseiramente granular (JONES *et al.*, 2000). Normalmente, os cordões celulares estão separados por feixes de colágeno. Além disso, é possível à visualização de um número variável de eosinófilos, devido à quimiotaxia destes, em resposta aos grânulos dos mastócitos. As células neoplásicas exibem um grau variado de diferenciação celular, baseado na presença e proeminência dos grânulos.

O pleomorfismo e o índice mitótico têm sido úteis para gradação da neoplasia, podendo variar de grau I a grau III. O grau I (bem diferenciado) possui células tumorais uniformes, núcleo redondo, com um núcleo e granulações evidentes, havendo assim um melhor prognóstico. Já no grau III (pouco diferenciado ou indiferenciado), que possui um prognóstico desfavorável, há maior pleomorfismo celular, podendo haver de pouca a nenhuma granulação citoplasmática, núcleos aberrantes, grande relação núcleo/citoplasma, e algumas vezes binucleação, mostrando uma maior indiferenciação celular. O grau II possui características intermediárias aos graus I e III.

Prostaglandina E₂ (PGE₂)

As prostaglandinas desempenham papéis importantes em processos fisiológicos normais, tendo participação em diversos tecidos do organismo com funções distintas como regulador do fluxo renal, mediador de agregação plaquetária, portanto regulando a homeostase, regulador da reprodução, formação e reabsorção óssea. Além do mais as PG também afetam a resposta imune, o que interfere de forma considerável na carcinogênese e progressão dos tumores (MOHAMMED *et al.*, 2001).

Muitos estudos nas últimas duas décadas têm sido de extrema importância para demonstrar o elo entre o desenvolvimento e progressão do câncer e os metabólitos do ácido aracdônico. Um desses metabólitos, a prostaglandina E₂ (PGE₂), merece uma atenção considerável, devido a sua implicação na carcinogênese, progressão neoplásica e metástases (EARNEST *et al.*, 1992; FOLKMAN *et al.*, 1997). A PGE₂ possui também capacidade angiogênica, onde se observa aumento na produção de VEGF pelo estímulo de PGE₂ (ABDEL-MAJID *et al.*, 2004, SPINELLA *et al.*, 2004).

Grandes concentrações de prostaglandinas E₂ são produzidas por células neoplásicas, macrófagos associados a tumores e monócitos do sangue periférico em pessoas com câncer de pulmão, mama, cólon, cabeça e pescoço e experimentalmente em tumores induzidos em animais, mostrando assim sua íntima ligação com o comportamento biológico do câncer (HUBBARD *et al.*, 1988; MARNETT *et al.*, 1992).

A inibição farmacológica de PGEs e COX estão sendo avaliadas com alvos para prevenção do câncer e em seu tratamento em animais com neoplasias ocorridas naturalmente, usados como modelos para humanos (KNAPP *et al.*, 2000).

Mohammed *et al.* (2001) demonstraram que as concentrações de PGE2 eram mais elevadas em tecidos tumorais quando comparados com tecidos normais, principalmente em carcinomas transicionais, prostáticos e de células escamosas em caninos.

Estudos mostraram a correlação da expressão de COX-2 com VEGF, angiogênese e mortalidade. COX-2 catalisa a produção de PGE2 e altos níveis de PGE2 foram encontrados em adenocarcinomas colo-retais, quando em comparação a tecidos adjacentes normais (Chianchi *et al.*, 2001).

Os mecanismos pelas quais a PGE2 estimula o VEGF ainda continuam indefinidos, no entanto Eibl *et al.* (2003) sugerem que o ácido aracdônico é convertido em PGE2 através da ação específica da COX-2, o qual aumenta os níveis de VEGF, de forma autócrina e parácrina, estimulando a migração de células endoteliais. Mostrando que a PGE2 possui um papel importante na expressão de COX-2 em células neoplásicas como mostrado em neoplasias pancreáticas.

A PGE2 como um importante mediador inflamatório, foi o maior indutor da potente isoforma proangiogênica VEGF-A em mastócitos de humanos. A PGE2 induziu VEGF-A em culturas de mastócitos como relatado por Abdel-Majid *et al.*, (2004).

Grande interesse tem sido demonstrado na descoberta de uma possível ligação da COX e de seus metabólitos (PGE2) no desenvolvimento e progressão do câncer. Mesmo que o exato mecanismo pelo qual a PGE2 e outros metabólitos do ácido aracdônico não estejam totalmente elucidados alguns possíveis mecanismos incluem: papel na mutação celular; efeitos diretos e indiretos da PGE2 e outros produtos da COX na proliferação e apoptose em células neoplásicas; PGE2 induz a imunossupressão que dificulta o sistema imune do indivíduo em combater células neoplásicas além do efeito da PGE2 nos mecanismos de metástase (colagenólise, angiogênese, hipercoagulabilidade) e por final, como mediador inflamatório que recruta

fatores de crescimento que contribuem para a progressão neoplásica. (LUPULESCU *et al.*, 1996; ARA *et al.*, 1996).

Fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF)

A angiogênese é um processo pelo qual novos vasos se desenvolvem a partir de vasos sanguíneos já existentes. A angiogênese fisiológica ocorre durante o crescimento fetal e desenvolvimento, mas é rara em adultos exceto em episódios de reparação de feridas e no trato reprodutivo de fêmeas. A angiogênese ocorre regularmente no corpo lúteo e no endométrio como parte do rápido crescimento e regressão desses tecidos durante o ciclo ovulatório. A angiogênese patológica ocorre em processos malignos e inflamatórios crônicos (GARGETT *et al.*, 2001).

O complexo controle angiogênico depende do balanço entre fatores estimulatórios e inibitórios que afetam a proliferação e diferenciação de células endoteliais (HANAHAN e FOLKAMAN, 1996). Um desses fatores é o VEGF, o qual é o mais potente indutor de angiogênese e permeabilidade vascular (LEUNG *et al.*, 1989).

Muitos trabalhos sugerem que a angiogênese é extremamente importante na carcinogênese, crescimento e progressão dos tumores (ALBINI *et al.*, 2001; VERMEULEN *et al.*, 2002; RANIERI *et al.*, 2002). Dentre esses fatores o mais investigado e estudado pela oncologia humana é o VEGF (DE JONG *et al.*, 1998).

O VEGF é uma proteína que estimula a migração e proliferação de células endoteliais vasculares, extremamente importantes para a angiogênese. É produzido por células neoplásicas, macrófagos, plasmócitos e algumas vezes por linfócitos (LUI *et al.*, 1995).

Há evidências que os níveis de expressão do VEGF em tumores primários podem refletir nas características biológicas destes em termos de agressividade e com isso contribuir com informações para o prognóstico (GASPARINI *et al.*, 1998; RANIERI *et al.*, 2001; PARADISO *et al.*, 2001; RANIERI *et al.*, 2003). O VEGF também conhecido como fator de permeabilidade vascular é uma potente citocina angiogênica que induz mitoses, regula a permeabilidade das células endoteliais (FERRARA, 1996) e

prolonga a sobrevivência de neovascularizações pela indução da expressão de proteínas como a Bcl-2 (RANIERI *et al.*, 2001).

Cinco isoformas do VEGF foram identificadas e seqüenciadas VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D e o fator de crescimento da placenta (NICOSIA, 1998). A forma isofórmica solúvel da VEGF é uma glicoproteína induzida por hipóxia e pela mutação oncogênica (BALSARI *et al.*, 1999).

Em trabalhos publicados, os níveis séricos de VEGF em pacientes com vários tipos histológicos de câncer se encontraram muito mais elevados do que em pacientes saudáveis (ACHEN *et al.*, 1998). Estudos preliminares sugeriram o alto nível de VEGF associado ao estágio tumoral, demonstrando pior prognóstico, em pacientes com câncer gastrointestinal (ADAMS *et al.*, 2000).

A expressão de VEGF por tumores sólidos, especialmente tumores mamários foram correlacionados com um prognóstico reservado (SLEDGE & MILLER, 2003).

Ranieri *et al.* (2003) demonstraram uma maior concentração de VEGF em humanos com câncer gastrointestinal do que em saudáveis, e ainda sugeriram que o VEGF possui um papel importante como marcador angiogênico em câncer gastrointestinal.

Em tumores, o aumento da síntese de VEGF é considerado uma das primeiras influências para a angiogênese, contribuindo assim para o desenvolvimento de características malignas como crescimento acelerado e metástases. Um aumento na produção de VEGF foi observado em tumores malignos, especialmente aqueles menos diferenciados (CONNOLLY *et al.*, 1989; DE JONG *et al.*, 1998).

A proliferação de células endoteliais induzida pela VEGF produz metástases por diversos motivos, entre eles: a neovascularização, produção de collagenase e outras enzimas degradativas que facilitam a célula neoplásica em desprender-se da massa e cair na corrente sangüínea além de estimular o crescimento celular neoplásico (MOSCATELLI *et al.*, 1981).

De acordo com Takahashi *et al.* (1995 e 1997) a densidade microvascular é um fator determinante para metástase de tumores como o câncer de cólon em humanos e de sua mortalidade. A expressão de VEGF é o melhor determinante da densidade microvascular sendo portanto intimamente relacionado à metástase e mortalidade.

Restucci *et al.* (2003) demonstraram um aumento da expressão de receptores para VEGF em células endoteliais em tumores malignos. Stitt *et al.* (1998) sugeriram uma função autócrina para VEGF, um meio pelo qual células neoplásicas malignas podem atuar simultaneamente como produtor e alvo de VEGF, contribuindo para o crescimento neoplásico independentemente de fatores angiogênicos de células endoteliais normais. Demonstraram ainda que VEGF e seus receptores em neoplasias malignas, estimulados por hipóxia, possuem um papel na indução de células endoteliais e proliferação de células neoplásicas, contribuindo para o crescimento tumoral. Restucci *et al.* (2000), em contraste, demonstraram que a síntese de outros fatores angiogênicos necessários para maturação de novos vasos pode ser inadequada, resultando na produção de vasos pequenos e esporadicamente mal formados.

Em um estudo conduzido por Sales *et al.* (2001), foi observada expressão de VEGF em inflamação e em áreas de CIN (neoplasia intraepitelial cervical), mas relativamente rara e fraca, no entanto houve uma grande expressão em áreas de carcinoma e em células inflamatórias adjacentes e fibroblastos.

Vários autores reportam que o VEGF, COX-2 e as prostaglandinas, como PGE₂, possuem uma íntima relação, assim como demonstrou Gallo *et al.* (2001) e Cianchi *et al.* (2001) onde a expressão de VEGF e COX-2 tiveram uma correlação positiva com a densidade microvascular, além de uma associação entre VEGF e COX-2 na angiogênese.

Mitsutoshi *et al.*, (2002), demonstraram que VEGF regula positivamente a atividade de RNAm, proteína e níveis de atividade enzimática da COX-2 em células endoteliais humanas. Pai *et al.* (2001) reportaram a indução da expressão gênica de VEGF pela PGE₂ em células endoteliais microvasculares gástricas de ratos. Juntos, esses achados sugerem um possível “feedback” positivo para uma produção local contínua de VEGF e COX-2 dependentes de PGE₂ nas células endoteliais.

A partir dessas informações o estudo do VEGF em mastocitomas é inédito e importante para avaliar a carcinogênese e progressão tumoral baseada na angiogênese.

c-KIT

Foi reportado em várias espécies animais a importância da interação de fatores de crescimento de mastócitos (Stem cell factor - SCF) com receptores específicos da proteína KIT, estimulando a maturação celular, proliferação e ativação de mastócitos (HILL, 2002). A proliferação de mastócitos em humanos foi associada a mutações de proto-oncogenes c-KIT, que codifica a proteína KIT (CD 117), um receptor da tirosina quinase. A fosforilação da proteína KIT resulta em uma ativação de receptores tirosina quinase em mastócitos e uma subsequente proliferação celular (LONGLEY & METCALFE, 2000).

Uma via de estimulação autócrina formada pelo receptor KIT e o seu ligante tem sido implicado no desenvolvimento dos mastocitomas e nas mastocitoses no homem (LONDON *et al.* 1999; WEBSTER *et al.* 2007). A KIT é uma proteína transmembrânica que atua como receptor para o fator de células-tronco, codificada pelo proto-oncogene c-KIT (LONDON *et al.* 1999). Sua expressão é normalmente detectada em células-tronco hematopoiéticas, entre elas os mastócitos. Mutações e padrões de expressão de c-KIT têm sido correlacionados com o prognóstico do mastocitoma (LONDON *et al.* 1999; ZEMKE *et al.* 2002; REGUERA *et al.* 2002; WEBSTER *et al.* 2007).

Zemke *et al.* (2002) sugeriram uma relação entre a graduação histopatológica dos mastocitomas e a presença de mutações no c-KIT. Ao avaliarem diversos mastocitomas caninos viram que não houve mutações em mastocitomas grau I e menos de 10% de mutações em mastocitomas grau II. No entanto 66% dos mastocitomas grau III possuíam alterações genéticas. Com isso, assim como em humanos, mastocitomas caninos foram associados com mutações do proto-oncogene c-KIT, resultando em uma ativação e proliferação dos mastócitos.

Mastocitoma cutâneo canino: variação entre observadores na graduação histopatológica.

Pedro Pinczowski¹, Rafael Torres Neto², Celmira Calderón³, Viciany E. Fabris⁴, Renée Laufer-Amorim⁵

1 – Pós-graduando, Departamento de Clínica Veterinária, Serviço de Patologia Veterinária. FMVZ, Unesp, Botucatu, Distrito de Rubião Jr. s/n 014-38116293, pedropin15@hotmail.com

2 – Pós-graduando, Departamento de Clínica Veterinária, Serviço de Patologia Veterinária. FMVZ, Unesp, Botucatu, Distrito de Rubião Jr. s/n 014-38116293, rphtorres@hotmail.com

3– Pós-graduanda, Departamento de Clínica Veterinária, Serviço de Patologia Veterinária. FMVZ, Unesp, Botucatu, Distrito de Rubião Jr. s/n 014-38116293, celmiracalderon@hotmail.com

4 – Professor Assistente Doutor, Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina, Unesp, Botucatu, Distrito de Rubião Jr. s/n 014-38116238 vfabris@fmb.unesp.br

5 – Professora Assistente Doutora, Departamento de Clínica Veterinária, Serviço de Patologia Veterinária. FMVZ, Unesp, Botucatu, Distrito de Rubião Jr. s/n, 014-38116293, renee@fmvz.unesp.br

Trabalho enviado para revista Clínica Veterinária

Apoio financeiro: Fapesp

Mastocitoma cutâneo canino: variação entre observadores na graduação histopatológica.

Resumo: O mastocitoma ou tumor de mastócitos é a neoplasia cutânea mais comum em cães, não havendo predileção por sexo, mas sim por raça, sendo o Buldogue Inglês, Bull Terrier Inglês, Boxer, Boston Terrier, Pug, American Pitt Bull Terrier, Weimaraner, Bullmastiff, Labrador Retriever, Setter Inglês, Beagle e Golden Retriever os mais acometidos. O sistema de graduação histopatológico é um importante critério preditivo para o estadiamento da neoplasia e determinação de terapia adjuvante. O grau I representa a neoplasia bem diferenciada, o grau II a moderadamente diferenciada e o grau III a pouco diferenciada ou anaplásica. Alguns autores demonstraram a discrepância entre observadores quando realizadas as graduações histopatológicas, devendo-se principalmente a subjetividade do sistema de graduação atualmente utilizado. Frente a isso um estudo com 4 observadores foi realizado em 42 casos de mastocitomas cutâneos caninos. Onde foi demonstrado existir uma discrepância na graduação principalmente quando se trata de mastocitomas grau II.

Palavras chave: classificação, cão, histopatologia, neoplasia

Cutaneous mast cell tumor: Variaton among pathologists in the histopathologic grading

Abstract: The mast cell tumor is the most common cutaneous neoplasia in dogs, where the English Bulldog, English Bull Terrier, Boxer, Boston Terrier, Pug, American Pitt Bull, Weimaraner, Bullmastiff, Labrador Retriever, Setter, Beagle and Golden Retriever are the most affected breeds. The histopathologic grading is an important predictive criteria for neoplasia staging and therapy choice. The grade I represents a well-differentiated neoplasia, grade II moderate differentiated neoplasia and grade III poorly differentiated. Some authors showed a few degree of agreement among pathologists in grading mast cell tumors, mainly for the subjectivity of the graduation system. A study with 4

pathologists was performed in 42 cases of canine mast cell tumors, where it was demonstrated a disagreement among the graduation, mainly in grade II tumors.

Key Words: classification, dog, histopathology, neoplasia

Mastocitoma cutáneo canino: variación entre observadores en el graduación histopatológica

Resumen: Mastocitoma o tumor de mastocitos es la neoplasia más común en canes, sin prelección sexual pero sí social, siendo el Bulldog Inglés, Bull Terrier Inglés, Boxer, Boston Terrier, Pug, American Pitt Bull Terrier, Weimaraner, Bullmastiff, Labrador Retriever, Setter Inglés, Beagle e Golden Retriever los más afectados. El sistema de graduación histopatológica es un importante criterio predictivo para determinar el estado de la neoplasia y su terapia adyuvante. Mastocitoma grado I representa una neoplasia bien diferenciada, el grado II una moderadamente diferenciada y el grado III una poco diferenciada o anaplásica. Algunos autores demostraron la discrepancia entre los observadores cuando se realizan las graduaciones histopatológicas, lo cual se debe principalmente a la subjetividad del sistema de graduación utilizado en la actualidad. Ante este hecho fue realizado un estudio con cuatro observadores en 42 casos de mastocitoma cutáneo canino. Fue demostrado la existencia de una discrepancia en la graduación principalmente cuando se trata de mastocitomas de grado II.

Palabras clave: clasificación, canes, histopatología, neoplasia

Introdução:

O mastocitoma cutâneo é uma neoplasia constituída de mastócitos observado frequentemente nos cães. Apesar de alguns mastocitomas apresentarem comportamento biológico benigno, todos devem ser encarados como potencialmente malignos ^{1,2,3}.

Considerando sua variação histopatológica, alguns sistemas de graduação foram estabelecidos e correlacionados com o tempo de sobrevivência do paciente e o mais utilizado na rotina oncológica divide o mastocitoma em três graus ⁴. O sistema de graduação histopatológico é um importante critério preditivo para o estadiamento da neoplasia e determinação de terapia adjuvante ². O grau I representa a neoplasia bem diferenciada, o grau II a moderadamente diferenciada e o grau III a pouco diferenciada ou anaplásica.

Estudos demonstraram uma diferença significativa entre patologistas na graduação histopatológica do mastocitoma, utilizando o sistema de Patnaik. Dez patologistas graduaram em testes “as cegas”, 60 casos de mastocitomas caninos. Houve uma concordância total em menos de 7% dos casos. Além de 10% destes terem recebido as 3 graduações. Isto demonstra uma falha na graduação histopatológica hoje empregada. Algumas hipóteses foram geradas tentando justificar essa discrepância, como a própria subjetividade da graduação, dificuldade em determinar ou distinguir entre algumas características da classificação ou até mesmo a heterogenicidade na população celular em diferentes áreas de um mesmo mastocitoma ⁵.

Foram realizados dois estudos sobre a discrepância na graduação histopatológica. No qual um deles foram usadas várias referências para a graduação dos mastocitomas e outro usando somente uma classificação ⁴. No trabalho o qual somente uma referência foi usada, houve uma menor discrepância na graduação, no entanto ainda houve uma diferença considerável na graduação, mostrando que uma uniformidade no sistema de graduação histopatológica aumenta o consenso entre os patologistas na classificação dos mastocitomas, mas não resolve as discrepâncias ⁵.

Devido à importância da graduação histopatológica dos mastocitomas e a possível discrepância da graduação entre observadores, objetivou-se fazer um estudo comparativo de graduações de mastocitomas, entre quatro observadores treinados em diagnóstico histopatológico.

Material e Métodos

Foram selecionados retrospectivamente 42 casos de mastocitomas cutâneos caninos diagnosticados no Serviço de Patologia Veterinária da FMVZ-UNESP/Botucatu. As lâminas de cada caso, coradas por hematoxilina e eosina e azul de toluidina, foram revisadas por um dos observadores para confirmar a adequação dos cortes histológicos para a posterior graduação. Os quatro observadores incluídos no estudo seguiram os mesmos critérios pré-estabelecidos para a categorização dos mastocitomas em bem diferenciado (grau I), moderadamente diferenciado (grau II) e pouco diferenciado (grau III), seguindo o modelo proposto mais utilizado atualmente ⁴. Os observadores não tinham informações sobre a história do paciente, tamanho e localização do tumor, bem como a graduação histopatológica anterior.

Resultados

Em 21,4% dos casos (n=9) houve concordância entre todos os observadores, em 33,3% dos casos (n=14) houve concordância entre três observadores e em 45,3% dos casos (n=19) houve concordância entre dois observadores. Destes 45,3% (n=19), os dois outros observadores concordaram em 79% dos casos (n=15) e discordaram entre si em 21% (n=4). Em 7,1% dos casos (n=3) houve três graduações diferentes. Nas demais discordâncias, a graduação variou entre grau I e II ou entre os graus II e III (Figura 1).

Figura 1. Frequência de concordância da graduação histopatológica dos mastocitomas caninos (n=42) entre os observadores.

As figuras 2 e 3 ilustram casos de mastocitomas com diagnósticos discordantes entre os observadores. A primeira figura representa um mastocitoma classificado como grau II por dois observadores e também como grau I pelos outros dois. Tal fato ocorreu provavelmente, pelo fato de haver menor quantidade de grânulos além de uma anisocitose evidente, que evidenciariam um caráter mais maligno da neoplasia, no entanto a ausência de mitoses, binucleações, nucléolos evidentes e numerosos eosinófilos demonstram características benignas do tumor e a categorização no grau I. A figura 3 representa um mastocitoma classificado como grau III e grau II. Tal discordância ocorreu também pela presença de características de malignidade como ausência de granulações e mitoses que caracterizam o potencial maligno da neoplasia, mas a ausência de células multinucleadas demonstraria não se tratar de uma neoplasia muito agressiva para alguns dos observadores.

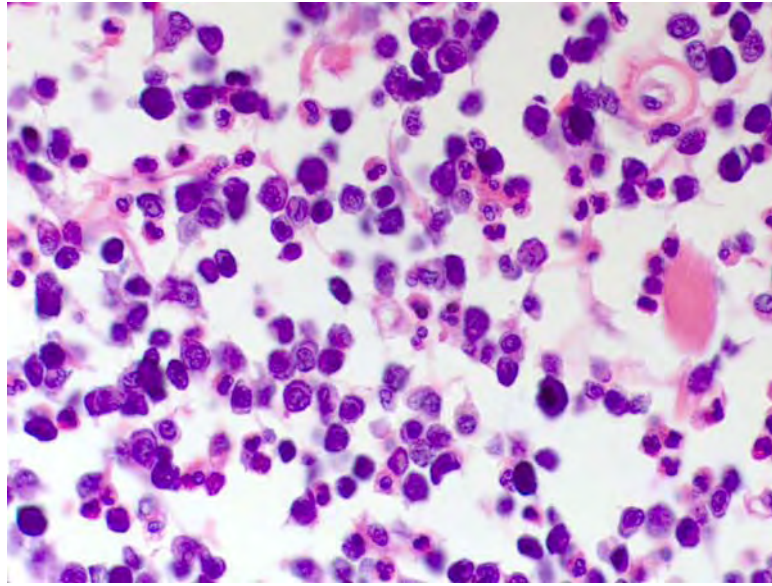


Figura 2. Mastocitoma classificado como grau II por dois observadores e como grau I pelos demais observadores. (HE, Obj 40X).

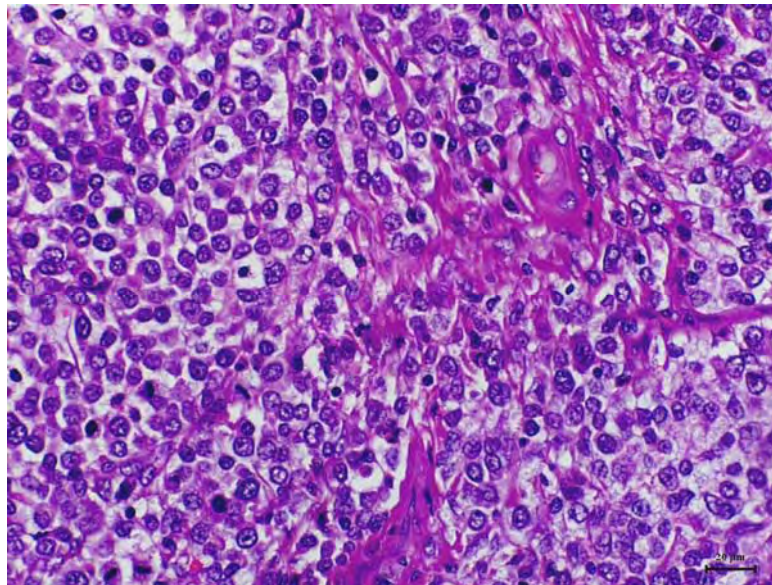


Figura 3. Mastocitoma classificado como grau II por dois observadores e como grau III pelos outros dois observadores. (HE, Obj 40X).

Discussão e conclusão

Apesar de ser o mais aceito entre os patologistas, o sistema de graduação de Patnaik apresenta limitações. Nesta sistematização feita para graduar o mastocitoma há critérios objetivos, como número de multinucleações e figuras de mitose, mas também há características subjetivas que independem da análise de um observador treinado, como por exemplo, quantidade de granulação intracitoplasmática. Outros aspectos pertinentes descrito é a extensão da neoplasia na amostra, com infiltração nas porções mais profundas da derme e subcutâneo ².

Mastocitomas apresentam características que variam amplamente, podendo, um observador categorizar uma neoplasia bem diferenciada em grau I mesmo com algumas figuras de mitose e binucleações, onde a mesma poderia ser classificada como grau II por outro observador, por outro lado, caso o observador não considere a quantidade de granulações intracitoplasmática um caso de mastocitoma grau II pode muito bem ser classificado como grau III. Tal dificuldade também foi demonstrada em um estudo onde houve a necessidade de se estabelecer previamente se tumores localizados no subcutâneo, ou com figuras de mitoses poderiam ser classificados com tumores de baixo grau, caso isso não fosse estabelecido à discrepância na graduação seria ainda maior ⁵.

Em alguns casos de tumores pouco diferenciados foram observados muitos eosinófilos, sendo que sua presença pareceu não possuir correlação com a graduação. Assim como previamente descrito ⁶, nosso trabalho também demonstrou uma discrepância nas graduações com multi-observadores, havendo neoplasias com até três graus (21% dos casos). Os autores deste trabalho sugerem que novos critérios histopatológicos sejam estabelecidos e, sempre que possível, correlacionando-se aspectos morfológicos, imunoistoquímicos com o uso do anticorpo CD117, moleculares e clínicos, para um melhor estadiamento do mastocitoma.

Foram demonstradas também dificuldades em classificar os mastocitomas, mostrando seu alto índice de discordância, principalmente nos graus I e II, onde apenas 63% do grau II e 63,1% dos graus I receberam a mesma classificação. Com isso foi sugerido a classificação dos mastocitomas em baixo e alto grau somente, podendo assim haver uma maior consistência e

um melhor prognóstico do que quando usado o sistema atual de graduação. No entanto uma diminuição no número de graus para o mastocitoma traria uma facilidade na classificação, mas não um prognóstico acurado, que necessita uma investigação completa e minuciosa tanto da morfologia quanto do estado geral do animal ⁷.

Estudos avaliando a graduação histopatológica não são restritos ao mastocitoma, vários estudos sobre a variabilidade das graduações já foram realizados em inúmeros casos de neoplasias em humanos ⁸, demonstrando haver discordância entre os observadores, o que salienta a necessidade de atributos objetivos para graduações histopatológicas.

Com os resultados obtidos neste experimento bem como na literatura consultada, haja vista a diferença de graduação entre observadores, o prognóstico dos mastocitomas caninos é imprevisível, tornando muitas vezes o tratamento ineficiente. Frente a isto novas técnicas de diagnóstico e estadiamento menos subjetivas devem ser desenvolvidas e testadas

Referências:

1-Jones, T.C.; Hunt, R.D.; King, N.W. A pele e seus apêndices. In: Jones, T.C.; Hunt, R.D.; King, N.W. (Eds). **Patologia veterinária**. São Paulo: Manole. p.831-886, 2000.

2-Gross, T.L.; Ihrke, P.J.; Walder, E.J.; Affolter, V.R.. **Skin diseases of the dog and cat: clinical and histopathologic diagnosis**. Oxford: Blackwell, 932p. 2005.

3-Thamm D. H.; Vail, D.M.; Mast cell Tumors , In Withrow S.J.; Vail D.M. **Small Animal Clinical Oncology**, 4 ed. Saunders, p. 402-24, 2007.

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

5- Northup, N.C., Howerth E.W., Harmon, B.G., Brown, C.A., Carmichael, K.P., Garcia, A., Latimer, K.S., Munday J.S., Rakich, P.M., Richey, L.J., Stedman, N.L., Gieger, T.L., 2005. Variation among pathologists in their histologic grading of canine cutaneous mast cell tumors with uniform use of a single grading reference. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation** V 17, p. 5 61-64.

6-Northup, N.C., Harmon, B.G., Gieger, T.L., Brown, C.A., Carmichael, K.P., Garcia, A., Latimer, K.S., Munday, J.S., Rakich, P.M., Richey, L.J., Stedman, N.L., Cheng, A.L. & Howerth, E.W. 2005. Variation among pathologists in histologic grading of canine cutaneous mast cell tumors. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, 17:245-248.

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

8-Al-Synati M.; Chen V.; Salama S.; Shuhaibar H, Treleaven D, Vincic L. Interobserver and intraobserver variability using Fuhrman grading system for renal carcinoma. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**. v 127, p. 593-96, 2003.

EXPRESSÃO DE C-KIT COMO CRITÉRIO DE DIFERENCIAÇÃO DOS MASTOCITOMAS CUTÂNEOS CANINOS

Pedro Pinczowski, Rafael Torres Neto, Celmira Calderón, Renata Benedetti
Cepinho, Mariana Vilela Falaschi, José Carlos Barbosa, René Laufer Amorim

FMVZ, Unesp, Botucatu

Departamento de Clínica Veterinária, Serviço de Patologia Veterinária

Rubião Jr. S/n

CEP 18618-000

Botucatu, SP, Brasil

pedropin15@hotmail.com

Trabalho a ser enviado para a revista *Veterinary and Comparative Oncology*

Apoio financeiro: fapesp

1. Resumo

O mastocitoma ou tumor de mastócitos é a neoplasia cutânea mais comum em cães, não havendo predileção por sexo, mas sim por raça, sendo o Buldogue Inglês, Bull Terrier Inglês, Boxer, Boston Terrier, Pug, American Pitt Bull Terrier, Weimaraner, Bullmastiff, Labrador Retriever, Setter Inglês, Beagle e Golden Retriever os mais acometidos. Foi reportado em várias espécies animais a importância da interação de fatores de crescimento de mastócitos (Stem cell factor - SCF) com receptores específicos da proteína KIT, estimulando a maturação celular, proliferação e ativação de mastócitos (HILL, 2002). A proliferação de mastócitos em humanos foi associada a mutações de proto-oncogenes c-KIT, que codifica a proteína KIT (CD 117), um receptor da tirosina quinase. A fosforilação da proteína KIT resulta em uma ativação de receptores tirosina quinase em mastócitos e uma subsequente proliferação celular. A ligação dos receptores KIT possuem múltiplos efeitos em mastócitos, incluindo proliferação, maturação, migração, degranulação, supressão da apoptose e adesão a fibronectina. Foram selecionados 45 casos de mastocitomas cutâneos caninos e realizadas colorações de HE, AT e imunomarcação por c-KIT. Foram correlacionados o padrão de marcação por c-KIT (membranoso, citoplasmático focal e citoplasmático difuso) e a intensidade de coloração com a graduação histopatológica dos mastocitomas cutâneos caninos. Não houve uma correlação estatística pelo teste de Tukey ($p > 0,05$) entre a intensidade de expressão e a graduação histopatológica e entre a intensidade e o padrão de marcação dos mastocitomas. O padrão de marcação de c-KIT apresentou correlação estatística pelo teste de qui-quadrado ($p < 0,05$) com a graduação histopatológica, sendo a membranosa mais freqüente no grau I, citoplasmática difusa no grau II e citoplasmática focal no grau III. Com isso o padrão de marcação para o c-KIT pode ser usado como um provável biomarcador prognóstico.

Palavras chave: Cão, c-KIT, Mastocitoma, Padrão de marcação

2. Introdução

O mastocitoma ou tumor de mastócitos é a neoplasia cutânea mais comum em cães, não havendo predileção por sexo, mas sim por raça, sendo o Buldogue Inglês, Bull Terrier Inglês, Boxer, Boston Terrier, Pug, American Pitt Bull Terrier, Weimaraner, Bullmastiff, Labrador Retriever, Setter Inglês, Beagle e Golden Retriever os mais acometidos (ROGERS, 1996, THAMM e VAIL, 2007).

Nos cães, os mastocitomas ocorrem com maior frequência nos membros pélvicos (24,6%), torácicos (13,6%), no abdômen (17,2%), tórax (14,7%) e cabeça (9,8%). Podem acometer também órgãos, como baço, fígado e rins. As formas mais malignas ou indiferenciadas crescem rapidamente no início e causam metástases por via linfática e hematogena (GROSS *et al.*, 2005).

O diagnóstico do mastocitoma é realizado com o exame citopatológico da lesão e, após excérese cirúrgica, confirmado pelo exame histopatológico, que além de fornecer a graduação permite avaliar o acometimento das margens cirúrgicas (LONDON E SEGUIN, 2003).

Foi reportado em várias espécies animais a importância da interação de fatores de crescimento de mastócitos (Stem cell factor - SCF) com receptores específicos da proteína KIT, estimulando a maturação celular, proliferação e ativação de mastócitos (HILL, 2002). A proliferação de mastócitos em humanos foi associada a mutações de proto-oncogenes c-KIT, que codifica a proteína KIT (CD 117), um receptor tirosina quinase. A fosforilação da proteína KIT resulta em uma ativação de receptores tirosina quinase em mastócitos e uma subsequente proliferação celular (LONGLEY & METCALFE, 2000).

Zemke *et al.* (2002) sugeriram uma relação entre a graduação histopatológica dos mastocitomas caninos e a presença de mutações no c-KIT. Ao avaliarem diversos mastocitomas caninos, aferiram que não houve mutações em mastocitomas grau I e menos de 10% de mutações em mastocitomas grau II. No entanto 66% dos mastocitomas grau III possuíam alterações genéticas. Com isso, assim como em humanos, mastocitomas caninos foram associados com mutações do proto-oncogene c-KIT, resultando em uma ativação e proliferação dos mastócitos.

A identificação de mutações no gene que codifica a proteína KIT em neoplasias é um ótimo meio diagnóstico para tumores indiferenciados, assim como demonstraram Zemke *et al.* (2001). Em um exame histopatológico identificaram uma neoplasia de células redondas, sem grânulos, levando ao diagnóstico diferencial de linfoma. No entanto o painel imunoistoquímico para linfomas T e B foi negativo. Frente a isso foram realizados testes moleculares para identificação de alterações gênicas no proto-oncogene c-KIT, o qual revelou possuir tais alterações. Com isso foi possível o diagnóstico de um mastocitoma indiferenciado.

Reguera *et al.*, 2000, demonstraram a direta correlação entre a expressão da proteína KIT com graus mais avançados de mastocitoma, portanto, a detecção do KIT é útil tanto no diagnóstico de mastocitomas, principalmente nos indiferenciados, quanto na determinação do prognóstico.

A ligação dos receptores KIT possui múltiplos efeitos em mastócitos, incluindo proliferação, maturação, migração, degranulação, supressão da apoptose e adesão a fibronectina (YEE *et al.*, 1994).

Recentemente foram identificados três padrões para localização da proteína KIT em mastócitos neoplásicos, sendo eles membranosa, citoplasmática focal e citoplasmática difusa. Estes padrões foram correlacionados com o prognóstico, sendo que animais que possuíam os padrões citoplasmáticos possuíam um pior prognóstico que aqueles que possuíam padrões membranosos (WEBSTER *et al.*, 2004).

Esse trabalho tem por objetivo avaliar o padrão e intensidade de imunomarcagem de c-KIT (CD117) em mastocitomas cutâneos caninos e correlacioná-los com a graduação histopatológica proposta por Patnaik *et al.*, (1984).

3. Material e Métodos

Foram selecionados 33 casos de mastocitoma cutâneo canino do arquivo do Serviço de Patologia Veterinária da FMVZ, Unesp, Botucatu e 12 casos novos atendidos no Hospital Veterinário, durante a realização do trabalho, totalizando 45 casos, dos quais anotaram-se dados como: raça, idade e sexo dos animais. Os blocos, devidamente identificados, foram separados e novos cortes histológicos realizados e corados pelo método de hematoxilina e

eosina (HE), azul de toluidina (AT) e pelo método imunoistoquímico com o anticorpo anti-CD117 (c-KIT), com o objetivo de confirmar o diagnóstico de mastocitoma, graduar a lesão e correlacionar o grau histopatológico com a imunoexpressão de c-KIT.

Para a graduação dos tumores foram levados em conta os critérios morfológicos protocolados por Patnaik *et al.* (1984), e adaptados por Gross (2005).

A técnica de imunoistoquímica seguiu o protocolo do Laboratório de Imunoistoquímica do Serviço de Patologia Veterinária da FMVZ – UNESP – Botucatu, que constituiu resumidamente na desparafinização, desidratação, recuperação antigênica com citrato 10mM, pH 6,0 em microondas por 15 minutos em potência máxima, bloqueio da peroxidase endógena com água oxigenada 3% por 20 minutos, incubação por 18h a 4°C com anticorpo primário (anti-CD117, Dako, Cód. A4502) diluído 1:400 em solução diluidora (Dako, cód. S3022) . Como sistema de amplificação utilizou-se o Envision Dual Link (Dako, cód. K4065) por 1 hora à temperatura ambiente, DAB (Dako, cód. K3468) por 5 minutos, e contra-coloração com hematoxilina de Harris.

Como controle negativo da reação, substituiu-se o anticorpo primário por imunoglobulina de coelho (Dako, cód. X0903) na mesma concentração de imunoglobulinas que o anticorpo primário e submetido ao mesmo protocolo.

O padrão de marcação de c-KIT também foi avaliado de acordo com Kiupel *et al.* (2004), sendo eles membranoso, citoplasmático difuso e citoplasmático focal.

A avaliação da expressão de c-KIT foi feita com o auxílio de um programa de análise de imagens Qwin V3 (Leica) em todos os campos no aumento de 200x. Atribuiu-se escores de + a ++++ para intensidade de marcação para o CD 117, sendo + marcação fraca e ++++ intensa.

O teste de Tukey (com 5% de significância) foi utilizado para verificar a relação estatística entre a intensidade de marcação com o padrão de marcação e com o grau histopatológico. Para avaliação da correlação estatística do grau histopatológico com o padrão de marcação utilizou-se o teste do qui-quadrado com grau de significância de 5%, pelo sistema SAS (Statistical Analysis System v 9.1)

4. Resultados

Foram avaliados 45 mastocitomas cutâneos caninos. Destes, a maior porcentagem ocorreu em cães com raça definida (75%), sendo o Boxer a raça mais afetada (31%), machos (62%) e adultos. Selecionaram-se 7 casos de mastocitomas grau I, 26 grau II e 12 grau III.

As figuras 1, 2, 3 e ilustram respectivamente as freqüências do sexo, idade e raças dos animais acometidos com mastocitoma cutâneo canino.

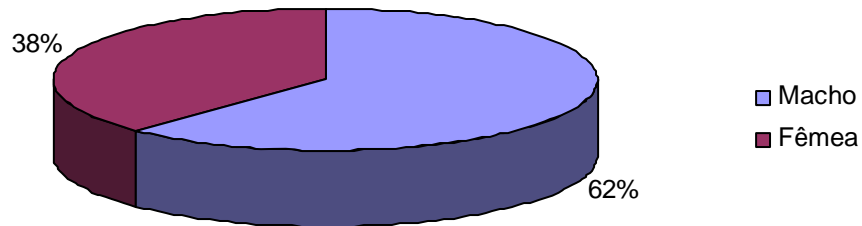


Figura 1. Porcentagem de animais do sexo feminino e masculino acometidos pelo mastocitoma cutâneo canino (n=45).

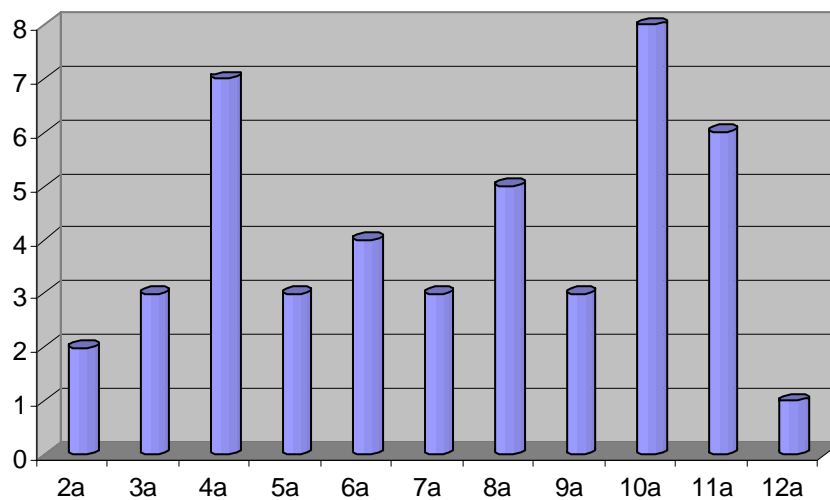


Figura 2. Freqüência de Idade dos animais acometidos pelo mastocitoma (n=45).

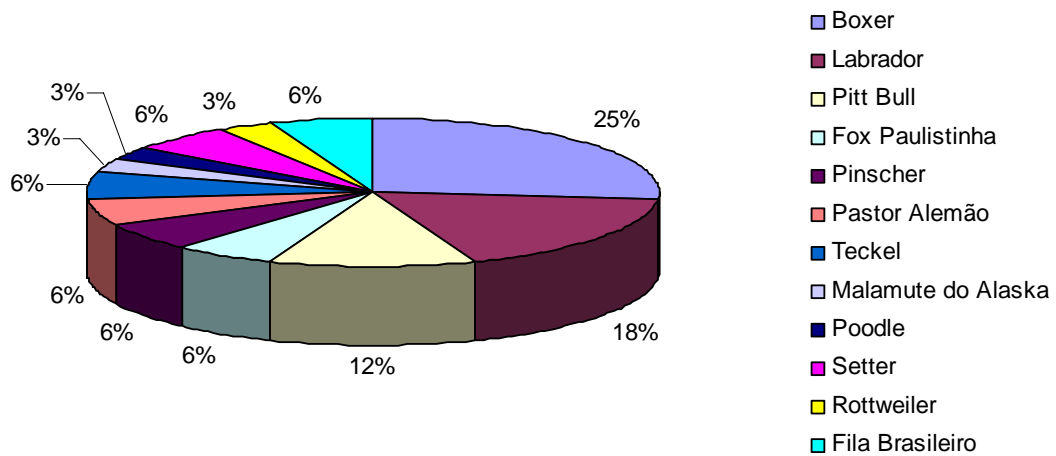


Figura 3. Distribuição das raças de cães (com raça definida) acometidos pelo mastocitoma cutâneo (n=45).

Dos sete mastocitomas grau I, seis deles apresentaram marcação membranosa e um citoplasmático difuso. Dos 24 mastocitomas grau II, cinco apresentaram marcação membranosa, um marcação citoplasmática focal e 18 marcação citoplasmática difusa. No caso dos mastocitomas grau III um apresentou marcação membranosa, cinco apresentaram marcação citoplasmática focal e seis citoplasmática difusa (Tabela 1 e figuras 4 a 8). Houve relação estatística significativa ($p < 0,05$) entre a graduação histopatológica estabelecida e o padrão de marcação.

Tabela 1. Frequência dos padrões de marcação membranosa, citoplasmática focal e citoplasmática difusa do c-KIT nas diferentes graduações histopatológicas dos mastocitomas cutâneos caninos (n=45).

Padrão	Grau I	Grau II	Grau III
Membranosa	86%	23%	8%
Citoplasmática focal	0%	4%	42%
Citoplasmática difusa	14%	73%	50%
Total	n=7	n=26	n=12

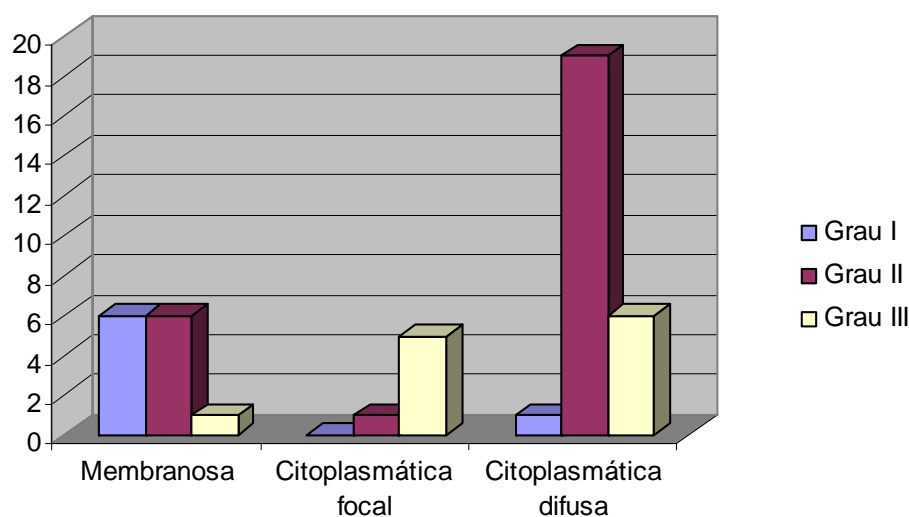


Figura 4. Frequência do padrão de marcação para c-KIT em mastocitomas cutâneos caninos de acordo com a graduação histopatológica.

Nos mastocitomas grau I avaliados, 42,85% apresentaram +++ de intensidade de marcação, 42,85% ++++ e 14,3% +. Nos mastocitomas grau II foi observada uma distribuição homogênea entre as diferentes intensidades de marcação. Nos mastocitomas grau III o maior percentual encontrado foi de +++, com 41,6% (tabela 2). Não houve diferença estatística entre o grau histopatológico e a intensidade de marcação ($p > 0,05$).

Quando avaliou-se a correlação entre a intensidade e o padrão de marcação do c-KIT (CD117) não foi observada diferença estatística significativa utilizando-se o teste de Tukey ($p>0,05$).

Tabela 2. Frequência das intensidades de expressão de c-KIT nas diferentes graduações histopatológica dos mastocitomas cutâneos caninos (n=45).

Intensidade	Grau I	Grau II	Grau III
+	14,30%	30%	16,70%
++	0%	23%	25%
+++	42,85%	27%	41,60%
++++	42,85%	20%	16,70%
Total	n=7	n=26	n=12

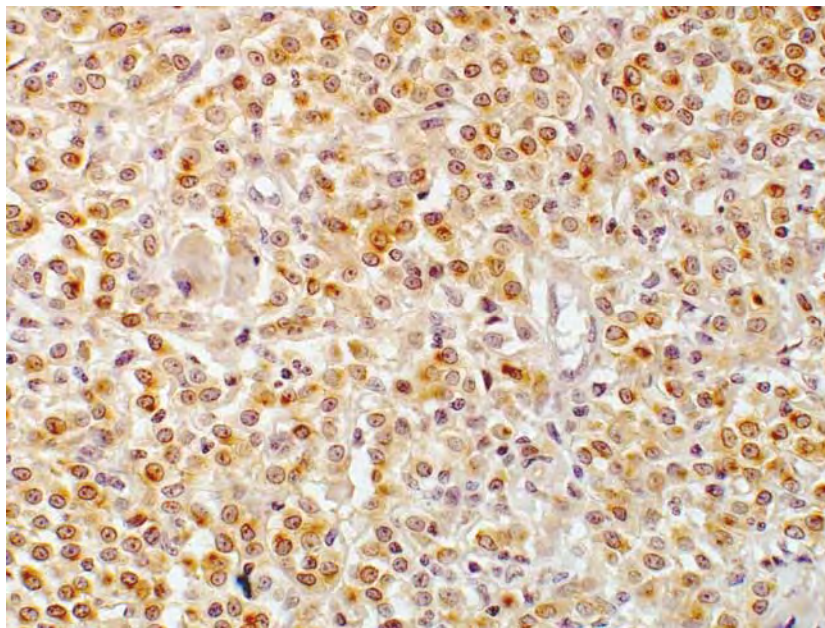


Figura 5. Mastocitoma cutâneo canino grau III. Imunomarcção positiva moderada, com padrão citoplasmático focal, para CD117. (Imunoistoquímica, CD117, Envision, DAB, contra coloração Hematoxilina, Obj 40x).

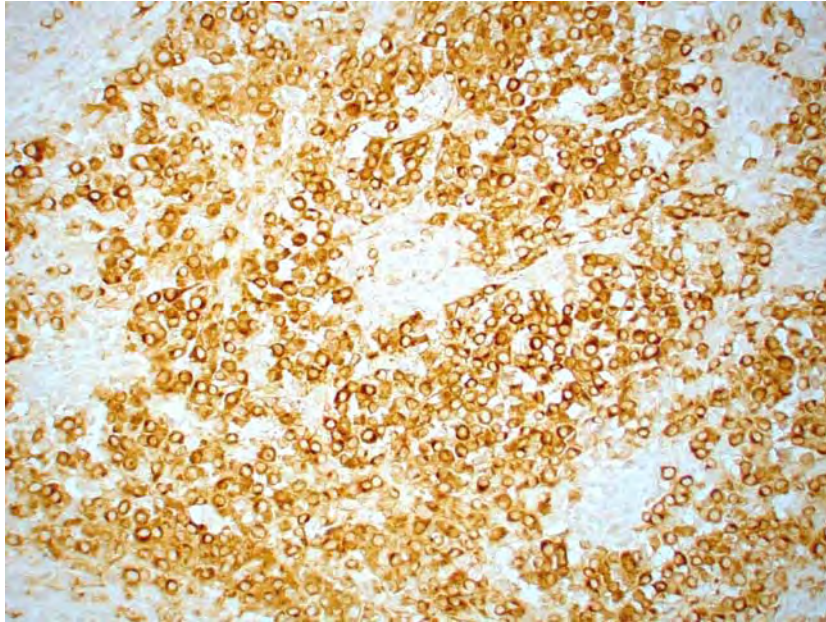


Figura 6. Mastocitoma cutâneo canino grau III. Imunomarcção positiva intensa para CD117, com padrão citoplasmático difuso. (Imunoistoquímica, CD117, Envision, DAB, contra coloração Hematoxilina, Obj 20x).

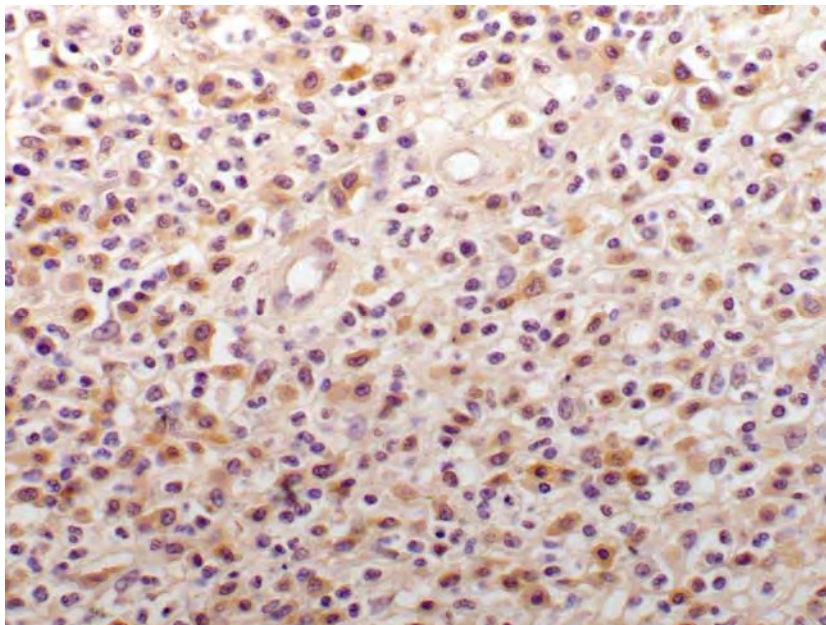


Figura 7. Mastocitoma cutâneo canino grau II. Imunomarcção positiva moderada para CD117, com padrão citoplasmático difuso. (Imunoistoquímica, CD117, Envision, DAB, contra coloração Hematoxilina, Obj 40x).

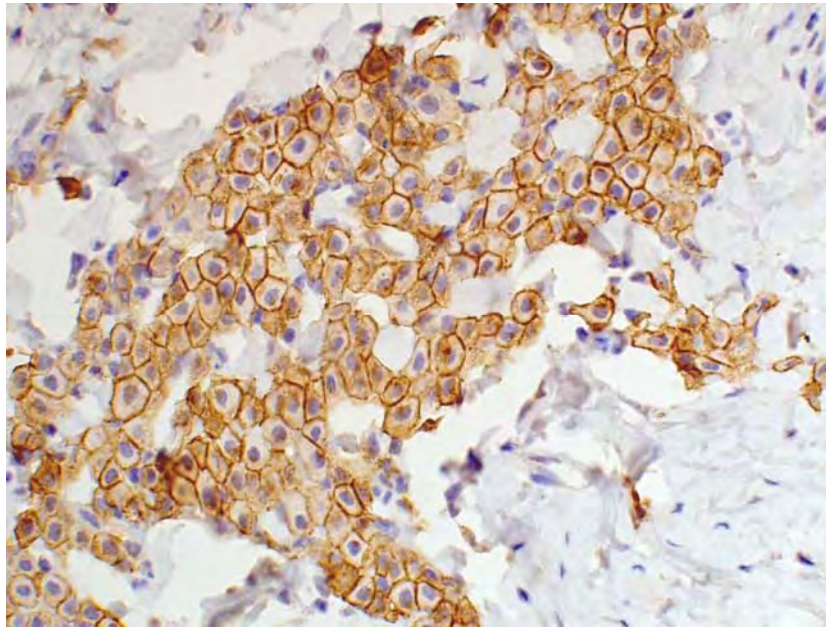


Figura 8. Mastocitoma cutâneo canino grau I. Imunomarcção positiva intensa para CD117, com padrão membranoso. (Imunoistoquímica, CD117, Envision, DAB, contra coloração Hematoxilina, Obj 40x).

5. Discussão e Conclusão

O maior percentual geral de animais acometidos foi SRD (25%), uma vez que estes representam a maior população de cães encaminhados ao Hospital Veterinário da FMVZ, Unesp, Botucatu. No entanto quando se consideram apenas cães com raça definida o Boxer, Pitt Bull e Pinscher também apresentaram uma alta incidência de mastocitomas, assim como demonstra a literatura (ROGERS, 1996; GROSS *et al.* 2005).

Não houve diferença entre o sexo dos animais acometidos por mastocitomas, onde 17 (38%) eram fêmeas e 28 (62%) eram machos. A maioria dos animais (22 cães) acometidos pela neoplasia era adulta, dos 4 aos 8 anos, fatos esses que também estão de acordo com a literatura (ROGERS, 1996; GROSS *et al.* 2005).

A classificação histopatológica dos mastocitomas cutâneos caninos é o critério mais importante na determinação do estágio e escolha da terapia,

sendo a quimioterapia recomendada para cães com mastocitomas de alto grau (grau III) e não para os de baixo grau (grau I) (NORTHRUP *et al.*, 2005).

A coloração de azul de toluidina (AT) nem sempre marca os grânulos de mastócitos e os tumores indiferenciados podem não apresentar granulações citoplasmáticas, por isso é necessária a realização da técnica de imunistoquímica com o anticorpo CD117.

A imunomarcação com CD117 permitiu a confirmação diagnóstica de casos duvidosos nas colorações de HE e AT.

Em estudo realizado por Zemke *et al.* (2002), a intensidade de marcação dos mastocitomas foi maior em graus menos diferenciados da neoplasia, mostrando que estes devem apresentar uma alteração gênica mais significativa para o aumento da produção e consequentemente expressão do onco-gene c-KIT. No entanto, neste trabalho observaram-se resultados discordantes, onde os mastocitomas grau I apresentaram os maiores percentuais de tumores com +++ e ++++ de intensidade de marcação.

Contudo, devem-se considerar as limitações da técnica de imunistoquímica, uma vez que o tempo de fixação da amostra interfere diretamente na intensidade de marcação dos diferentes anticorpos. Neste estudo, como utilizou-se material de arquivo não se pode aferir sobre o tempo de fixação de cada uma das amostras.

Ao avaliar a expressão de c-KIT, está sendo investigado um provável gene alterado, um proto-oncogene que se tornou um onco-gene, com isso já é de se esperar que a produção da proteína KIT esteja intensificada, levando a uma progressão maior da neoplasia e assim levando a um pior prognóstico.

De acordo com Webster *et al.* (2007), mastocitomas mais indiferenciados tendem a apresentar um padrão de marcação citoplasmático, que está relacionado a um menor intervalo livre da doença e menor tempo de sobrevivência. No caso dos mastocitomas diferenciados há um predomínio de marcação membranosa. Tal fato foi corroborado em nosso trabalho, onde foi encontrado um número maior de mastocitomas grau I com marcação membranosa, com um total de 86% (6 casos de 7). Mastocitomas grau II obtiveram um número maior de marcação citoplasmática, totalizando 79% (19 de 24), sendo destes 75% (18 de 24) de marcação citoplasmática difusa. Em mastocitomas grau III também, conforme a literatura, observou-se uma maior

expressão citoplasmática de c-KIT, com um total de 92% de marcação (11 de 12), sendo destes 42% (5 de 12) de marcação focal e 50% (6 de 12) de marcação difusa.

O comportamento biológico dos mastocitomas é muito variável, e a habilidade de se estabelecer um prognóstico preciso para tais tumores é comprometida pelo grande número de neoplasias de graus intermediários. Sendo assim, a avaliação imunoistoquímica, como demonstrado por Kiupel *et al.* (2004) é de fundamental importância para definição de tal prognóstico.

Kiupel *et al.* (2004) propõem o uso do padrão de expressão do c-KIT como uma nova variável para classificação dos mastocitomas, uma vez que observaram a marcação membranosa em mastocitomas com melhor prognóstico clínico (sem recorrência e maior tempo de sobrevida) e marcação citoplasmática associada com aumento de recorrência e menor tempo de sobrevida.

A graduação baseada na coloração de HE com os parâmetros propostos por Patnaik *et al.* (1984) serviram como base até o momento, porém Kiupel *et al.* (2004) e Northrup *et al.* (2005) ressaltaram que há uma ambigüidade no sistema de graduação histológica usado atualmente na classificação dos mastocitomas, o mesmo ocorreu neste estudo, principalmente nos mastocitomas grau II.

A graduação dos mastocitomas caninos tendo como base critérios morfológicos, não é a mais adequada quando se procura o estabelecimento de ferramentas prognósticas, devendo-se levar em consideração a correlação de aspectos morfológicos, moleculares, imunológicos e clínicos.

A realização da técnica de imunoistoquímica com o anticorpo primário anti c-KIT (CD-117) é de fácil execução e não necessita de amostras especialmente preparadas para esta técnica, o que torna viável seu uso rotineiro como auxílio na graduação dos mastocitomas e sua possível correlação com o prognóstico.

De acordo com o tipo de marcação pode-se tentar estabelecer uma classificação mais acurada, pois mastocitomas que apresentaram marcação citoplasmática focal foram classificados predominantemente em grau III, e os que apresentaram marcação membranosa foram predominantemente classificados como grau I, portanto mastocitomas grau II que apresentarem

marcação citoplasmática focal devem apresentar um comportamento biológico mais agressivo quando comparados aqueles com marcação citoplasmática difusa. Da mesma forma os mastocitomas grau II que apresentarem marcação membranosa devem possuir um comportamento biológico menos agressivos, podendo talvez ser inclusos no grau I.

Com isso pode-se subdividir os mastocitomas grau II em três categorias, o mastocitoma grau II com marcação membranosa, menos agressivo, podendo ser incluso no grau I, o mastocitoma com marcação citoplasmática difusa, sendo o de agressividade moderada e os com marcação citoplasmática focal, esses com comportamento biológico mais agressivo e talvez devessem ser classificados como grau III.

A coloração pelo método de HE, onde a morfologia da neoplasia é avaliada, ainda é o melhor método de classificação dos mastocitomas, no entanto a técnica de imunistoquímica, onde o padrão de marcação de c-KIT é demonstrado, serve como uma ferramenta extremamente importante para auxiliar em casos dúbios (que ocorrem frequentemente nos mastocitomas grau II) e estabelecer portanto um prognóstico acurado da neoplasia.

6. Referências

- GROSS, T.L.; IHRKE, P.J.; WALDER, E.J. **Skin diseases of the dog and cat: clinical and histopathologic diagnosis**. Oxford: Blackwell, 2005. p.932.
- KIUPEL, M.; WEBSTER, J.D.; KANEENE, J.B.; MILLER, R.; YUZBASIYAN-GURKAN, V. The use of KIT and tryptase expression patterns as prognostic tools for canine cutaneous mast cell tumors. **Vet. Pathol.** 2004, v.41, p. 371-377.
- LONDON, C. A.; SEGUIN, B. Mast cell tumors in the dog. **Vet. Clin. Small. Anim. Pract.** 2003, v. 33, p473-479.
- LONGLEY, B.J.; METCALFE, D.D. A proposed classification of mastocytosis incorporating molecular genetics. **Hematol. Oncol. Clin. North Am.** 2000, v 14, p 697-701.
- NORTHUP, N.C., HARMON, B.G., GIEGER, T.L., BROWN, C.A., CARMICHAEL, K.P., GARCIA, A., LATIMER, K.S., MUNDAY, J.S., RAKICH, P.M., RICHEY, L.J., STEDMAN, N.L., CHENG, A.L., HOWERTH, E.W. Variation among pathologists in histologic grading of canine cutaneous mast cell tumors. **J. Vet. Diagn. Invest.** 2005, v 17, p.245-248.
- PATNAIK, A.K.; EHLER, W.J.; MACEWEN; E.G. Canine cutaneous mast cell tumor: morphologic grading and survival time in 83 dogs. **Vet. Pathol.** 1984, v.21, p.469-474.
- REGUERA M.J; RABANAL. R.M.; PUIDGEMONT A. Canine mast cell tumors express stem cell factor receptor. **Am J Dermatopathology.** 2000 v 22, p 49-54.
- ROGERS, K.S. Mast cell tumors: Dilemmas of diagnosis and treatment. **Vet Clin North Am Small Anim Pract.** 1996, v.26, p. 87-102.
- THAMM D. H.; VAIL, D.M.; Mast cell Tumors , In Withrow S.J.; Vail D.M. **Small Animal Clinical Oncology**, 4 ed. Saunders, 2007,p. 402-24,.
- WEBSTER, J.D.; YUZBASIYAN-GURKAN, V.; MILLER, R.; KANEENE, J.B.; KIUPEL, M. Cellular proliferation in canine cutaneous mast cell tumors: association with c-KIT and its role in prognostication. **Vet. Pathol.** 2007, v. 44, p. 298-308.

YEE N.S.; PAEK I.; BESMER P. Role of kit-ligand in proliferation and suppression of apoptosis in mast cells: basis for radiosensitivity of white spotting and steel mutant mice. **J Exp Med.** 1994, v 179, p 1777-87.

ZEMKE D.; YAMINI B.; YUZHASIYAN-GURKAN V. Characterization of an undifferentiated malignancy as a mast cell tumor mutation using a mutation analysis in the proto-oncogene c-KIT. **J. Vet. Diagn. Invest.** 2001, V. 13, p 341-45.

ZEMKE, D.; YAMINI, B.; YUZHASIYAN-GURKAN, V. Mutations in the juxtamembrane domain of c-kit are associated with higher grade mast cell tumors in dogs. **Vet. Pathol.** 2002 v. 39, p. 529-535.

**EXPRESSÃO DE PGE2 E VEGF EM MASTOCITOMAS CUTÂNEOS
CANINOS**

P. Pinczowski, R. Torres-Neto, C. Calderón, K.S. Matilde, J.C. Barbosa, R.
Laufer-Amorim.

Serviço de Patologia Veterinária, Departamento de Clínica Veterinária,
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Unesp, Botucatu, SP

Trabalho preparado para ser enviado para o jornal: Veterinary Pathology
Apoio Financeiro: Fapesp

1. Resumo

O mastocitoma ou tumor de mastócitos é a neoplasia cutânea mais comum em cães, não havendo predileção por sexo, mas sim por raça, sendo o Buldogue Inglês, Bull Terrier Inglês, Boxer, Boston Terrier, Pug, American Pitt Bull Terrier, Weimaraner, Bullmastiff, Labrador Retriever, Setter Inglês, Beagle e Golden Retriever os mais acometidos. Muitos estudos nas últimas duas décadas têm sido de extrema importância para demonstrar o elo entre o desenvolvimento e progressão do câncer e os metabólitos do ácido aracdônico. Um desses metabólitos, a prostaglandina E2 (PGE2), merece uma atenção considerável, devido a sua implicação na carcinogênese, progressão neoplásica e metástases. A PGE2 possui também capacidade angiogênica, onde observa-se aumento na produção de VEGF pelo estímulo de PGE2. Muitos trabalhos sugerem que a angiogênese é extremamente importante na carcinogênese, crescimento e progressão dos tumores. Dentre esses fatores o mais investigado e estudado pela oncologia humana é o VEGF. O VEGF é uma proteína que estimula a migração e proliferação de células endoteliais vasculares, extremamente importantes para a angiogênese. É produzido por células neoplásicas, macrófagos, plasmócitos e algumas vezes por linfócitos. Foram selecionados 53 casos de mastocitomas cutâneos caninos e realizadas colorações de HE e AT para confirmação do diagnóstico e graduação histopatológica. Em seguida técnicas imunoistoquímicas foram empregadas de acordo com o protocolo do laboratório de Imunoistoquímica do Serviço de Patologia da FMVZ/Unesp, Botucatu. Foram avaliadas as expressões de PGE2 e VEGF, sendo sua intensidade de expressão e percentual de células contadas correlacionada com a graduação histopatológica. Quando avaliada a intensidade de expressão não houve correlação estatística com a graduação histopatológica tanto com o VEGF quanto o PGE2. Mas quando avaliado o percentual de células somente o PGE2 apresenta uma correlação estatística com a graduação histopatológica, sendo estes valores significativos quando comparados os graus I e III.

Palavras chave: cão, graduação histopatológica, mastocitoma, PGE2, VEGF,

2. Introdução

O mastocitoma é a neoplasia maligna constituída por mastócitos, que corresponde de 11 a 27% de todas as neoplasias cutâneas em cães. O mastocitoma aparece mais frequentemente em membros pélvicos e torácicos, abdômen, tórax e cabeça. No entanto, a neoplasia pode metastatizar para linfonodos regionais e outros órgãos (ROGERS, 1996, THAMM & VAIL, 2007).

As prostaglandinas são metabólitos importantes do ciclo do ácido aracdônico, responsáveis por inúmeros processos fisiológicos além do que, estudos mostram que grandes concentrações de prostaglandinas E2 são produzidas por células neoplásicas, responsáveis por atuar na mutação celular, proliferação, apoptose além de produzir efeitos imunossupressores (LUPULESCU, 1996; ARA *et al.*, 1996).

Como demonstraram Doré *et al.*, (2003) a COX-2 tem uma estreita relação com neoplasias, havendo uma maior concentração em tumores malignos do que em benignos, o que também foi visto por Calderón (2005) onde mastocitomas grau III apresentavam valores superiores de COX-2 quando comparados com mastocitomas grau I. Portanto sendo a PGE2 um metabólito da COX-2, esta deve apresentar também uma estreita relação com o desenvolvimento neoplásico maligno.

O fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), também conhecido como fator de permeabilidade vascular é uma potente citocina angiogênica indutora de mitose, reguladora da permeabilidade endotelial (FERRARA, 1996) além de prolongar a sobrevivência das células endoteliais na neovascularização pela indução da expressão de proteínas inibidoras da apoptose como a Bcl-2 (RANIERI *et al.*, 2001).

Os estudos da expressão de PGE2 e VEGF em mastocitomas cutâneos caninos auxiliarão na compreensão do comportamento biológico dessas neoplasias uma vez que há ligação com a carcinogênese e progressão tumoral.

Objetiva-se, neste trabalho avaliar a imunomarcagem de VEGF e PGE2 nos mastocitomas cutâneos caninos e correlacioná-la com a graduação histopatológica, proposta por Patnaik *et al.* (1984).

3. Material e Métodos

Os casos de mastocitoma cutâneo canino foram selecionados de duas formas: por meio de análise retrospectiva dos livros de registro do Serviço de Patologia Veterinária da FMVZ, Unesp, Botucatu e pela seleção de novos casos enviados ao Serviço. Foram anotados os dados como: raça, idade e sexo dos animais.

Os blocos, devidamente identificados, foram separados e novos cortes histológicos foram realizados e corados pelo método de hematoxilina e eosina (HE), azul de toluidina (AT) e pelo método imunohistoquímico com os anticorpos primários anti-VEGF e anti-PGE2.

Para a graduação dos tumores foram levados em conta os critérios morfológicos propostos por Patnaik *et al.* (1984), e adaptados por Gross *et al.* (2005).

As neoplasias foram graduadas da seguinte forma: grau I, grau II e grau III, Sendo o grau I neoplasias bem diferenciadas, grau II moderadamente diferenciadas e o grau III indiferenciada.

A técnica de imunohistoquímica seguiu o protocolo do Laboratório de Imunohistoquímica do Serviço de Patologia Veterinária da FMVZ – UNESP – Botucatu, que constituiu na desparafinização, desidratação, recuperação antigênica, onde para o anticorpo anti-PGE2, foi utilizada solução de Citrato 10mM, pH 6,0 em forno microondas por 15 minutos (Três ciclos de cinco minutos em potência máxima). Para o anticorpo anti-VEGF a recuperação antigênica foi feita com solução pré-aquecida de Tris-EDTA pH 9,0 em banho-maria a 96 °C, por 30 minutos. Posteriormente foram colocadas em temperatura ambiente por 20 minutos para resfriamento. O bloqueio da peroxidase endógena foi feito com água oxigenada 3% por 20 minutos, e a incubação com anticorpo primário por 18h a 4°C. Os anticorpos foram diluídos na proporção 1:25 para o VEGF (Dako, M7273, Clone VG1) e 1:200 para o PGE2 (Oxford Biomedical Research, Clone PG31), em diluente para anticorpos com propriedades redutoras de fundo (Dako-S3022). Como sistema de amplificação utilizou-se o Envision Dual Link (Dako cód. K4065) por uma hora a temperatura ambiente, DAB (Dako, cód. K3468) por 5 minutos, e contra-coloração com hematoxilina de Harris. Como controle negativo substituiu-se o anticorpo primário por imunoglobulina de coelho (Dako cód. X0903) para as

reações com PGE2 e imunoglobulina de camundongo (Dako cód. N1698) para as reações com VEGF, nas mesmas condições das lâminas com anticorpo primário.

Para determinar a expressão dos anticorpos nos mastocitomas cutâneos caninos, foram avaliados todos os campos de cada corte com o auxílio do programa de imagens Qwin V3 (Leica) em um aumento de 400x. Em cada campo foi mensurado o percentual de células marcadas (Figura 1 e Tabela 1) e a intensidade de coloração (Tabela 2), conforme preconizado por DE NARDI (2007).

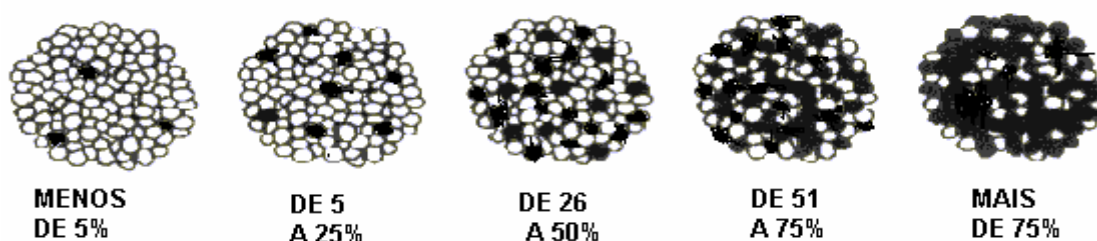


Figura 1. Método de graduação para determinar o percentual de imunomarcagem dos anticorpos VEGF e PGE2 nos mastocitomas cutâneos caninos (De Nardi, 2007).

Tabela 1. Pontuação atribuída ao percentual de células marcadas por campo, em mastocitomas cutâneos caninos.

Percentual de células marcadas	Pontuação
< 5%	0
5 – 25 %	1
26 – 50%	2
51 – 75%	3
> 75%	4

Tabela 2. Pontuação atribuída à intensidade de coloração das células marcadas por campo, em mastocitomas cutâneos caninos.

Intensidade de coloração	Pontuação
Fraca	1
Moderada	2
Forte	3

Ao final, estabeleceu-se um escore de 0 a 12 pontos, obtido a partir do produto da pontuação do percentual de células marcadas pela pontuação da intensidade de coloração.

A análise estatística foi feita pelo sistema SAS, utilizando-se o teste de Tukey, com grau de confiança de 0,05.

4. Resultados

Foram avaliados 53 mastocitomas cutâneos caninos. Destes, a maior porcentagem ocorreu em cães sem raça definida, machos e adultos (figuras 2 a 4).

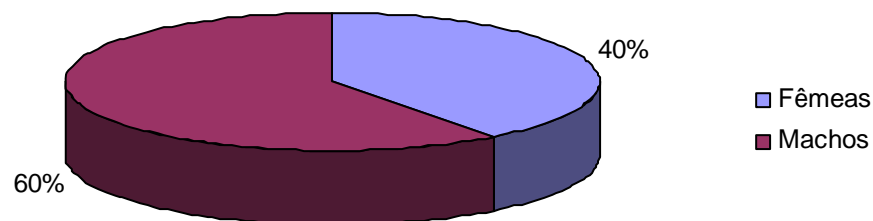


Figura 2. Porcentagem de animais do sexo feminino e masculino acometidos pelo mastocitoma cutâneo canino (n=53).

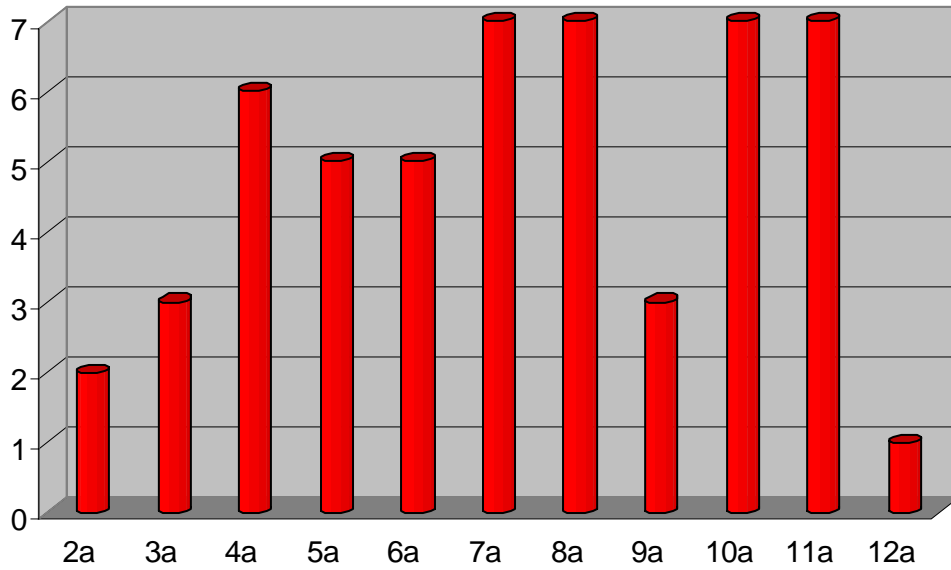


Figura 3. Distribuição de idade dos animais acometidos pelo mastocitoma cutâneo canino (n=53).

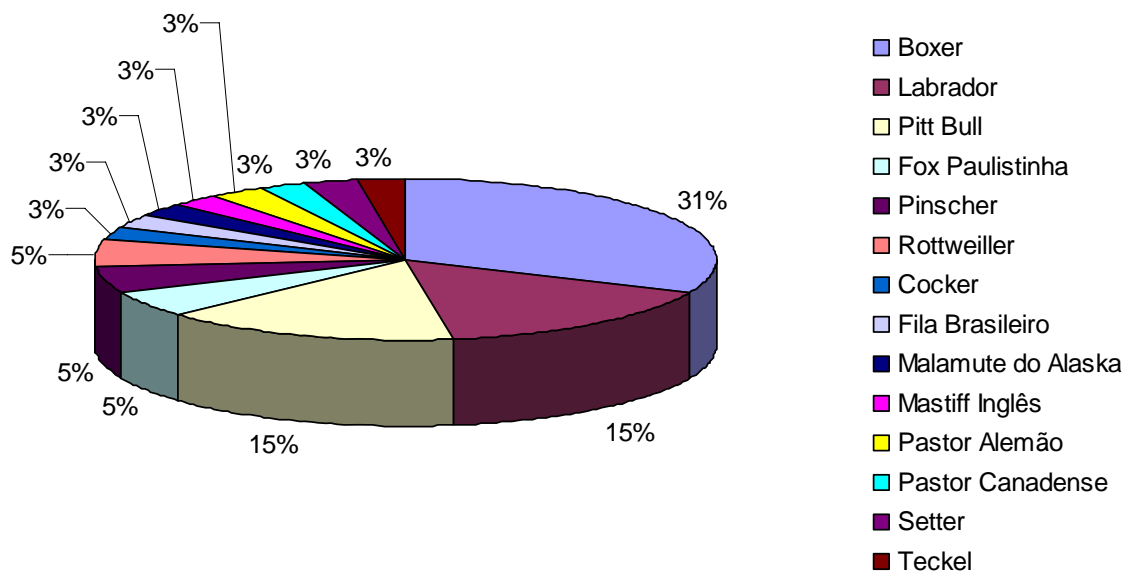


Figura 4. Distribuição das raças de cães (com raça definida) acometidas pelo mastocitoma cutâneo canino (n=53).

A graduação histopatológica dos mastocitomas cutâneos caninos foi feita de acordo com Patnaik *et al.* (1984) e adaptadas por Gross *et al.* (2005). Nove mastocitomas foram grau I, 26 mastocitomas grau II e 18 mastocitomas grau III.

A marcação de PGE2 nos mastócitos neoplásicos foi citoplasmática em todos os casos (Figuras 5,6 e 7)

Não houve diferença estatística na intensidade de coloração de PGE2 entre os graus de mastocitoma cutâneo canino, onde o grau I obteve uma média de 1,78, o grau II 1,56 e o grau III 1,94. Quanto ao percentual de células marcadas houve diferença estatística entre o grau I e grau III, onde o grau I obteve 2,11 e o grau III 3,39. Já o grau II obteve 3,11. (Tabela 3, figura 8)

Tabela 3 . Média dos percentuais de células marcadas (PCM), intensidade de coloração (IC) e escore final de marcação (PCM x IC) de PGE2 nos mastocitomas cutâneos caninos (n=53).

	PCM	IC	Escore
Grau I	2,11 A	1,78 A	4,22 A
Grau II	3,11A.B	1,56 A	4,81 A
Grau III	3,39 B	1,94 A	6,94 A

Médias em uma mesma coluna e seguidas por mesma letra maiúscula não diferem entre si ao nível de 1% de probabilidade pelo teste de tukey.

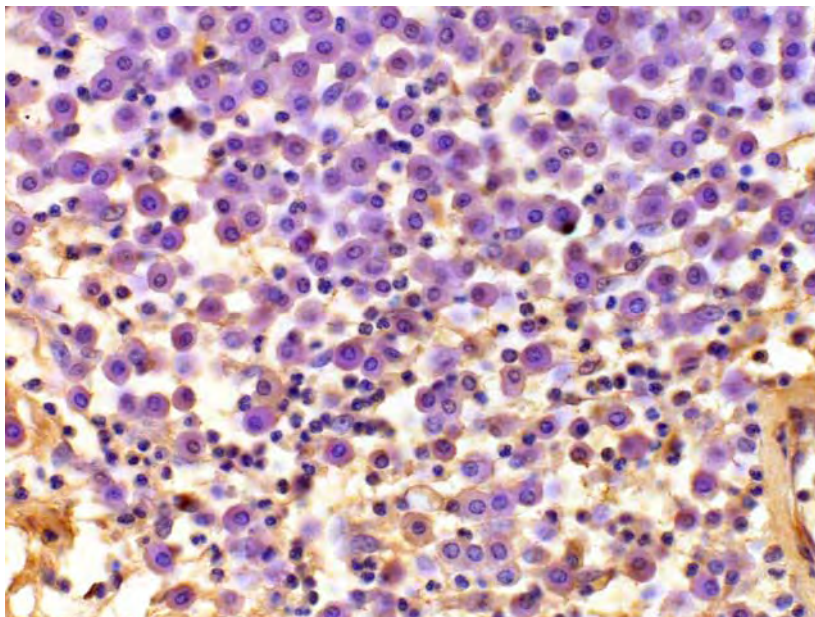


Figura 5. Mastocitoma Grau I. Imunomarcção positiva fraca, com menos de 25% de células marcadas. (Imunoistoquímica, PGE2, Envision, DAB, contra coloração Hematoxilina, Obj 40x).

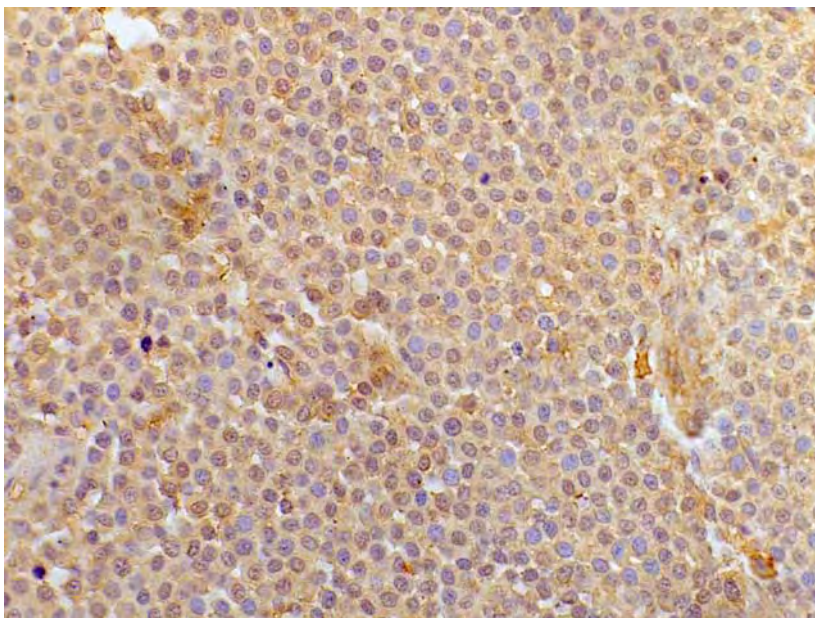


Figura 6. Mastocitoma Grau II. Imunomarcção positiva moderada, com 100% de células marcadas. (Imunoistoquímica, PGE2, Envision, DAB, contra coloração Hematoxilina, Obj 20x).

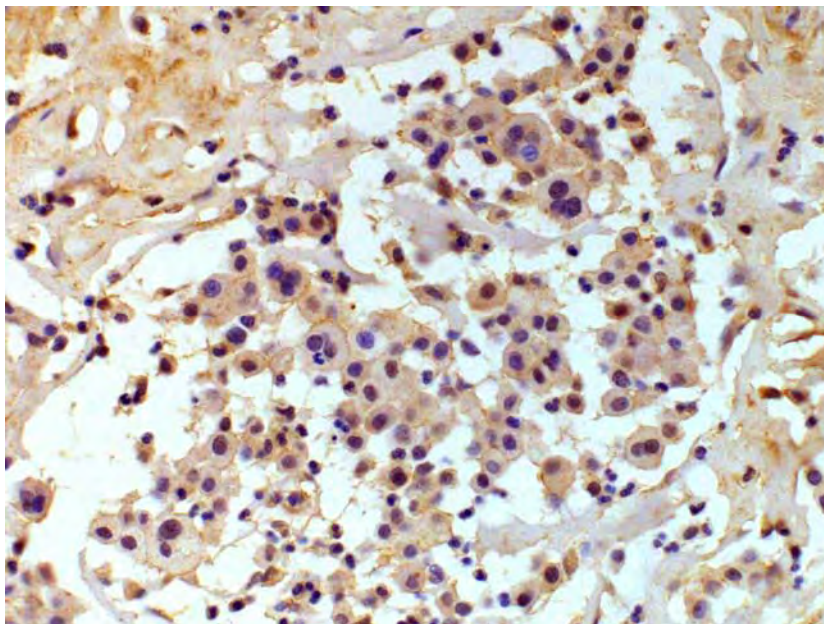


Figura 7. Mastocitoma Grau III. Imunomarcaco positiva moderada , com mais de 75% de células marcadas. (Imunoistoquímica, PGE2, Envision, DAB, contra colorao Hematoxilina, Obj 20x).

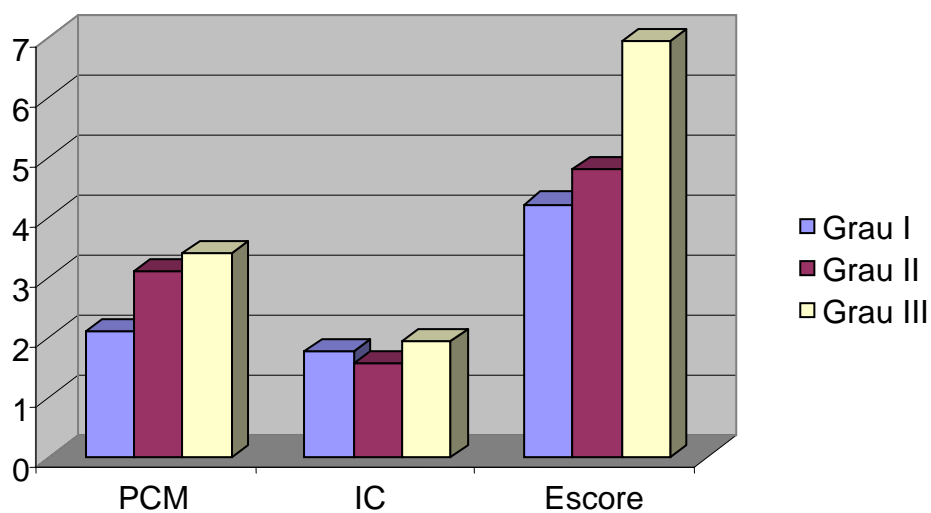


Figura 8. Média dos percentuais de células marcadas (PCM), intensidade de colorao (IC) e escore final (PCM x IC), da marcao imunoistoquímica para PGE2 nos três graus do mastocitoma cutâneo canino (n=53).

A imunomarcção do VEGF foi citoplasmática em todos os mastócitos neoplásicos, ainda havendo marcação em estroma e células endoteliais (Figuras 9 a 11)

O percentual de células marcadas para VEGF foi, no grau I 3,7, no grau II 3,68 e no grau III 4,0. Quanto à intensidade de coloração, o grau I obteve 2,1, o grau II 1,86 e o grau III 1,89. Não houve diferença estatística no percentual de células marcadas nem na intensidade de coloração entre os três graus. O escore final também não variou, onde o grau I obteve 7,8, o grau II 6,89 e o grau III 6,94 (tabela 4 , figura 12).

Tabela 4. Média do percentual de células marcadas (PCM), intensidade de coloração (IC) e escore final de marcação (PCM x IC) de VEGF nos mastocitomas cutâneos caninos (n=53).

	PCM	IC	Escore
Grau I (n=9)	3,7 A	2,1 A	7,8 A
Grau II (n=26)	3,68 A	1,86 A	6,89 A
Grau III (n=18)	4,0 A	1,89 A	6,94 A

Médias em uma mesma coluna e seguidas por mesma letra maiúscula não diferem entre si ao nível de 1% de probabilidade pelo teste de tukey.

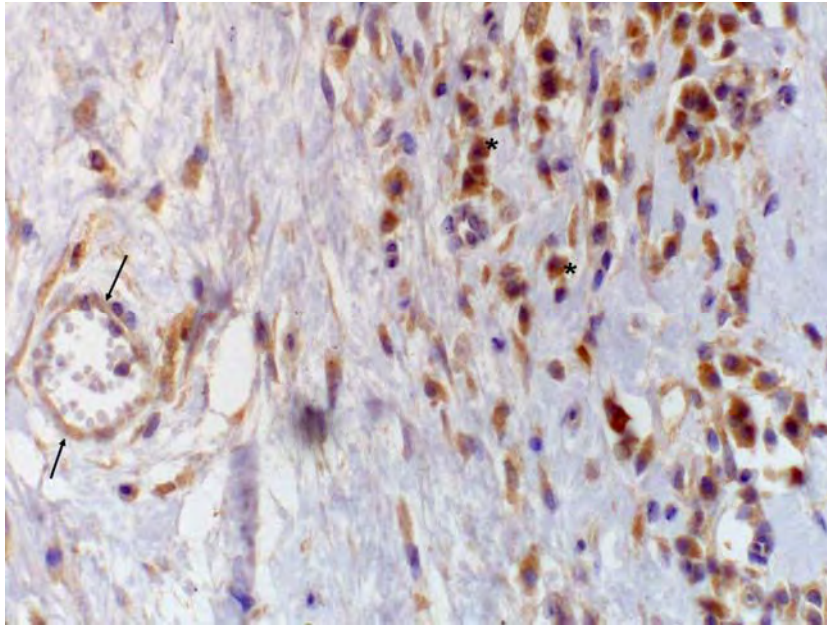


Figura 9. Mastocitoma Grau I. Imunomarcção positiva intensa para VEGF, 100% das células marcadas. Marcação intensa nos mastócitos (*) e no endotélio (seta) (Imunoistoquímica, VEGF, Envision, DAB, contra coloração Hematoxilina, Obj 40x).

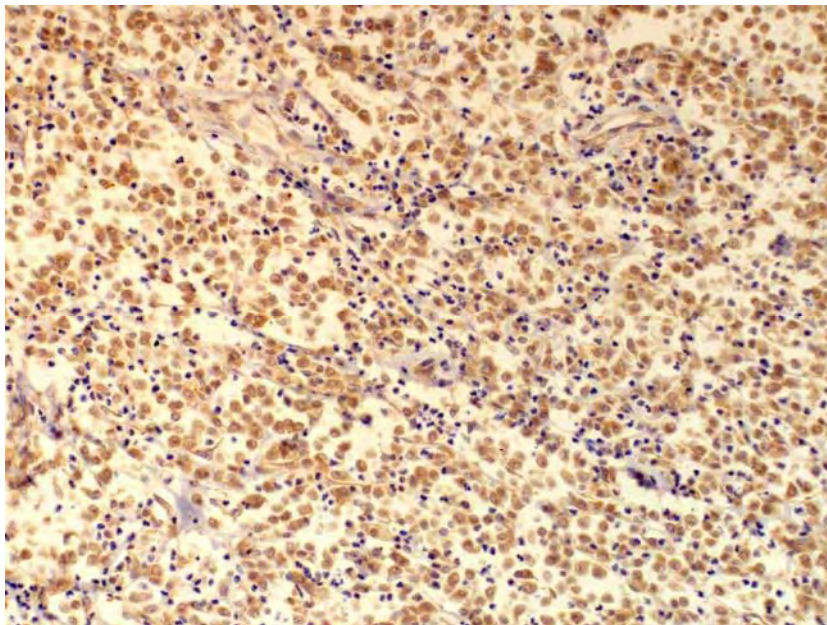


Figura 10. Mastocitoma Grau II. Imunomarcção positiva intensa para VEGF, 100% das células marcadas (Imunoistoquímica, VEGF, Envision, DAB, contra coloração Hematoxilina, Obj 20x).

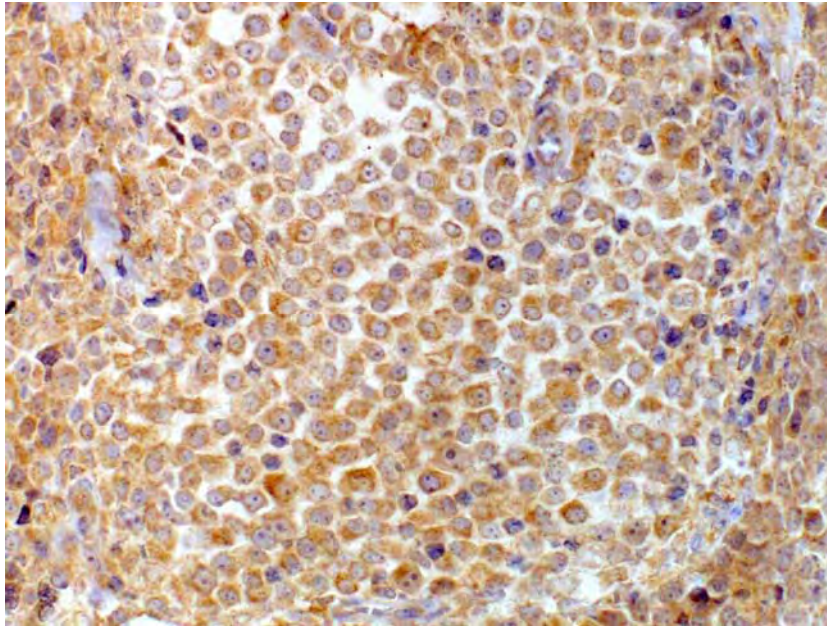


Figura 11. Mastocitoma Grau III. Imunomarcção positiva intensa para VEGF. 100% de mastócitos marcados. (Imunoistoquímica, VEGF, Envision, DAB, contra coloração Hematoxilina, Obj 40x).

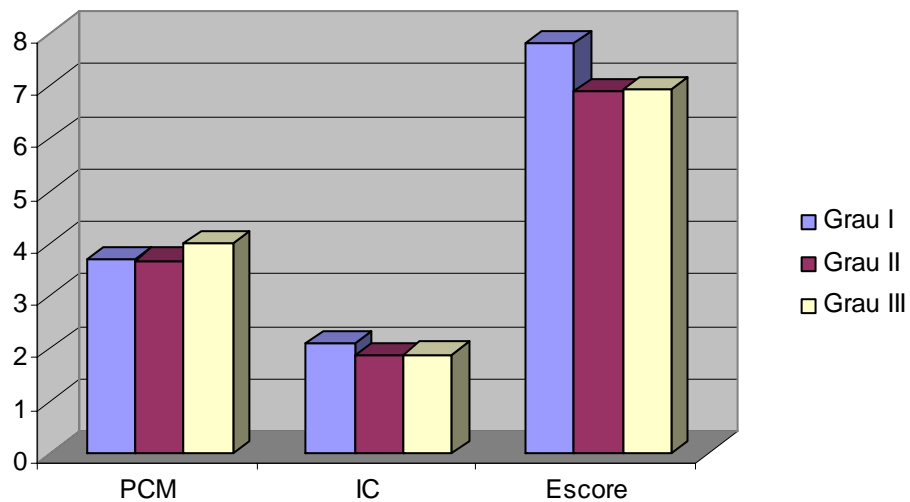


Figura 12 . Média dos percentuais de células marcadas (PCM), intensidade de coloração (IC) e escore final (PCM x IC) da marcação imunoistoquímica para VEGF nos três graus do mastocitoma cutâneo canino (n=53).

5. Discussão

O maior percentual geral de animais acometidos foi SRD (27%), uma vez que estes representam a maior população de cães encaminhados ao Hospital Veterinário da FMVZ, Unesp, Botucatu. Considerando-se apenas animais com raça definida o Boxer, Labrador e Pitt Bull apresentaram uma alta incidência de mastocitomas, assim como demonstra a literatura (ROGERS, 1996; GROSS *et al.* 2005).

Não houve diferença entre o sexo dos animais acometidos por mastocitomas, onde 21 eram fêmeas (40%) e 32 eram machos (60%). A maioria dos animais acometidos pela neoplasia era adulta, dos 4 aos 8 anos, fato esse que também está de acordo com a literatura (ROGERS, 1996; GROSS *et al.* 2005).

Na contagem de PGE2 não houve diferença estatística na intensidade de coloração, onde o grau I obteve uma média de 1,78, o grau II 1,56 e o grau III 1,94. Quanto ao percentual de células marcadas houve diferença entre o grau I e grau III, onde o grau I obteve 2,11 e o grau III 3,39. Já o grau II obteve 3,11.

No entanto no caso do PGE2 a diferença estatística se mostrou significativa no percentual de células marcadas quando comparados os graus I e III, sendo maior no grau III, demonstrando o intenso potencial maligno dessa neoplasia, como era de se esperar, pois os resultados se correlacionam com o de COX2 (Calderón, 2005). Com isso sugere-se que a expressão de PGE2 quando considerado o percentual de células marcadas, é uma ferramenta prognóstica.

O PGE2 possui um importante papel na mutação celular, proliferação e apoptose em células neoplásicas, induz a imunossupressão prejudicando o sistema imune do indivíduo em combater células neoplásicas, além de produzir efeitos nos mecanismos de metástase (colagenólise, angiogênese, hipercoagulabilidade) e por final, como mediador inflamatório que recruta fatores de crescimento que contribuem para a progressão tumoral (LUPULESCU *et al.*, 1996; ARA *et al.*, 1996). Com isso é de se esperar que o aumento da expressão de PGE2 acompanhe o potencial maligno da neoplasia, contribuindo dessa forma a um comportamento biológico mais agressivo e portanto, um prognóstico mais reservado, sendo assim a avaliação da

expressão de PGE2 se torna uma ferramenta útil na elaboração de um prognóstico acurado.

Este fato é corroborado pelos resultados obtidos na correlação estatística significativa, entre os anticorpos primários PGE2 e VEGF, que só foi verificada para os mastocitomas cutâneos caninos grau II.

O fato do PCM para o anticorpo PGE2 não ser estatisticamente diferente entre os graus I e II, e entre os graus II e III se baseia no variável comportamento biológico dessa neoplasia, especialmente nos moderadamente diferenciados. Este grupo (grau II) apresenta tanto tumores mais diferenciados (mais próximos do grau I) como aqueles com mais critérios de malignidade, mas ainda não incluídos no grau III. Talvez os resultados fossem mais significativos se os mastocitomas grau II fossem melhor caracterizados histologicamente ou subdivididas em dois grupos, uma vez que há uma população celular heterogênea, que contém desde células mais diferenciadas até células com um certo grau de anaplasia, mas tais critérios são subjetivos e dependem fundamentalmente do observador.

Os mastocitomas possuem um comportamento biológico muito variável, ainda mais quando considerado os tumores moderadamente diferenciados (grau II) o que foi observado neste trabalho, pela correlação da intensidade de coloração entre os anticorpos primários PGE2 e VEGF, que foi significativa, diferentemente dos outros graus.

De acordo com Calderón (2005), a expressão de COX-2 foi maior em mastocitomas grau III do que nos outros graus, mostrando a estreita relação da COX-2 com mecanismos de progressão tumoral, invasividade e capacidade metastática, ou seja, maior potencial maligno. Com isso já era de se esperar que a PGE2 seguisse o mesmo caminho, sendo este um metabólito da COX-2. Fato este, que ocorreu neste trabalho, onde a expressão de PGE2 mostrou-se maior em mastocitomas grau III quando comparadas com grau I. Portanto, neoplasias mais agressivas expressam uma maior quantidade tanto de COX-2 (Calderón, 2005) quanto PGE2, quando comparadas com neoplasias menos agressivas.

A intensidade de expressão não manteve uma uniformidade quanto à graduação histopatológica, ou seja não houve um aumento ou diminuição progressiva conforme o grau histopatológico. Isso foi demonstrado pela

expressão ser menor nos mastocitomas grau II, seguido pelo grau I e III. A técnica de imunistoquímica avalia a expressão dessas proteínas, sendo esta relacionada à quantidade de proteínas já sintetizadas. Ou seja, essa técnica avalia o produto final, naquele momento determinado da síntese proteica, portanto não fornece subsídios para se avaliar a dinâmica de todo o processo.

Na contagem de VEGF não houve diferença estatística entre os graus, tanto na intensidade de coloração quanto no percentual de células marcadas.

Pesquisas recentes demonstraram a expressão de VEGF e receptores de VEGF em tumores sólidos e hematopoéticos, sendo que essas células neoplásicas normalmente utilizam o VEGF como um fator de crescimento autócrino. No entanto, o mastocitoma não parece utilizar o VEGF de forma autócrina e sim como estímulo à angiogênese (Shinkrauk *et al.* 2003). Neste estudo não foi verificada a presença de receptores para VEGF, porém afirmações como esta devem ser melhor estudada para comprovar o porquê da não estimulação autócrina, uma vez que os mastocitomas possuem tanto o receptor para VEGF como o próprio VEGF de acordo com Shinkrauk *etal.* (2003). Webster *et al.* (2007), demonstraram o ganho de uma função autócrina dos mastócitos neoplásicos quanto à produção e forforilação da proteína transmembrânica KIT, que estimula a proliferação, maturação, migração, degranulação e supressão da apoptose, sendo assim sugere-se que nos mastocitomas, as células neoplásicas ganhem uma função autócrina quanto à produção e expressão do VEGF.

Estudos prévios mostraram que mastócitos normais expressam VEGF, o qual está diretamente envolvido no processo de angiogênese (Szukiewiez *et al.*, 2005). Rebuzzi *et al.* (2007), demonstraram a imunomarcção de VEGF em todos os mastocitomas caninos avaliados, independente da graduação histopatológica, resultado corroborado por esse trabalho, onde 100% dos mastocitomas apresentaram expressão positiva para VEGF. No entanto, não houve variação na intensidade de coloração nem no percentual de células marcadas, resultados estes contraditórios ao de Rebuzzi *et al.* (2007), que concluíram haver diferença na intensidade de coloração e percentual de células marcadas nos mastocitomas avaliados, principalmente nos graus II e III, que apresentaram uma maior marcação para VEGF.

Altos índices de PGE2 estimulam a produção de diversos fatores como FGF α (Fator de crescimento fibroblástico), EGF (Fator de crescimento epidermal), HGF (Fator de crescimento hepatocitário), que estimulam a proliferação celular, bFGF (Fator de crescimento fibroblástico básico), que estimula a angiogênese. Sendo assim, como há uma relação tanto da COX2, quanto da PGE2 com a graduação histopatológica dos mastocitomas caninos, é de se esperar que tais fatores também possuam algum tipo de relação, portanto estudos que utilizem esses biomarcadores podem vir a ajudar quanto ao entendimento do comportamento biológico dos mastocitomas e de um prognóstico mais acurado.

6. Conclusões

- Os mastocitomas expressam VEGF independente da graduação histopatológica.
- Os mastocitomas expressam PGE2 independente da graduação histopatológica.
- A intensidade de coloração e o número de células marcadas para VEGF não está relacionada à graduação histopatológica.
- A intensidade de coloração de PGE2 não está relacionada à graduação histopatológica.
- O percentual de células marcadas por PGE2 está relacionada à graduação histopatológica, quando comparados os graus I e III.
- Os escores (produto do PCM e IC) não se correlacionam com a graduação histopatológica, tanto para PGE2 como para VEGF.
- A imunomarcagem de VEGF não pode ser utilizada como parâmetro de auxílio do grau de diferenciação dos mastocitomas cutâneos caninos, quando se considera o percentual de células marcadas, a intensidade de coloração e o escore final (PCM x IC), portanto não contribui para avaliação do prognóstico.
- A expressão imunohistoquímica de PGE2 pode ser utilizada na diferenciação dos mastocitomas cutâneos caninos graus I e III, devendo-se avaliá-la como possível biomarcador prognóstico.

7. Referências:

Ara G.; Teicher B.A. Cyclooxygenase and lipoxygenase inhibitors in cancer therapy. **Prostaglandins, Leukot Esset Fatty Acids**; v. 54: p3-16, 1996.

Calderón C., **Avaliação da expressão da cicloxigenase 2 e do índice de proliferação celular dos mastocitomas cutâneos caninos pela histopatologia, histoquímica e imunoistoquímica**, Botucatu, 106p. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, 2005.

De Nardi, A. B. **Correlação da ciclooxygenase-2 com Ki-67, p53 e caspase nas neoplasias de mama em cadelas**. 2007. 92p. Tese (Doutorado em Cirurgia Veterinária), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Câmpus de Jaboticabal, 2007.

Dore, M.; Lanthier I.; Sirois J. Cyclooxygenase-2 Epression in canine mammary tumors. **Vet. Pathol.**, v.40, p.207-212, 2003.

Ferrara N. The regulation of angiogenesis by vascular endothelial growth factor. **Forum**, v. 4, p.393-403, 1996.

Gross, T.L.; Ihrke, P.J.; Walder, E.J. *et al.* **Skin diseases of the dog and cat: clinical and histopathologic diagnosis**. Oxford: Blackwell, 2005. p.932.

Lupulescu A. Prostaglandins, their inhibitors and cancer. **Prostaglandins, Leukot Esset Fatty Acids**; v. 54: p83-94, 1996.

Patnaik, A.K.; Ehler, W.J.; Macewen E.G. Canine cutaneous mast cell tumor: morphologic grading and survival time in 83 dogs. **Vet. Pathol.**, v.21, p.469-474, 1984.

Ranieri G.; Gasparini G. Surrogate markers of angiogenesis and metastasis. In: **Metastasis Research Protocols**. Brooks S (ed). Humana Press, Oxford, p99-114, 2001.

Rebuzzi L.; Willman M.; Sonneck K.; Gleixner K.V., *et al.* Detection of vascular endothelila growth factor (VEGF) and VEGF recpetors Flt-1 and KDR in canine mastocytoma cells. **Veterinary immunoigy and immunopathology**. v 115, p 320-33, 2007.

Rogers, K.S. Mast cell tumors: Dilemmas of diagnosis and treatment. **Vet Clin North Am Small Anim Pract**. v.26, p. 87-102, 1996.

Shinkaruk, S., Bayle, M., Lain, G., Deleris, G.,. Vascular endothelial cell growth factor (VEGF), an emerging target for cancer chemotherapy. **Curr. Med. Chem. Anti-Cancer Agents.** v 3, p 95–117, 2003.

Szukiewicz, D., Gujski, M., Maslinska, D., Szewczyk, G., Bachanek, M., Maslinski, S., 2005. Mast cell-derived VEGF and VEGF receptor type 1, 2, and 3 expression in human term trophoblast culture-influence of hypoxia. **Inflamm. Res.** S1, 82–83

Thamm D. H.; Vail, D.M.; Mast cell Tumors , In Withrow S.J.; Vail D.M. **Small Animal Clinical Oncology**, 4 ed. Saunders, p. 402-24, 2007.

Webster, J.D.; Yuzbasiyan-Gurkan, V.; Miller, R.; Kaneene, J.B.; Kiupel, M. Cellular proliferation in canine cutaneous mast cell tumors: association with c-KIT and its role in prognostication. **Vet. Pathol.**, v. 44, p. 298-308, 2007.

Discussão geral

O mastocitoma cutâneo canino é uma das neoplasias cutâneas mais freqüentes desta espécie, representando 10 a 15% de todos os tumores cutâneos (GROSS *et al.*, 2005). Esta neoplasia é formada por mastócitos que podem variar desde células bem diferenciadas até anaplásicas.

A proliferação em nódulo único ou múltiplo ocorre em todas as espécies animais, sendo mais comum nos cães. Quando são observados, microscopicamente, numerosos mastócitos bem diferenciados, deve-se ter cautela no diagnóstico de mastocitoma, e alguns patologistas consideram este crescimento como mastocitose cutânea (GINN *et al.*, 2007).

Esse é um dos primeiros problemas no diagnóstico histopatológico dos mastocitomas: a diferenciação de mastocitose cutânea de um mastocitoma bem diferenciado, ou grau I, que tendo esse diagnóstico, implica em uma neoplasia potencialmente maligna.

Inúmeros trabalhos correlacionarem a evolução clínica com a raça, localização do tumor, taxa de crescimento tumoral, contagem de regiões organizadoras de nucléolos (AgNOR), ploidia do DNA, avaliação de alterações no gene p53, mutações no c-KIT, mas mesmo com o advento destas técnicas moleculares mais avançadas, a classificação histopatológica, por enquanto, é o melhor critério para a determinação do prognóstico.

No entanto, o estabelecimento da graduação histopatológica, mesmo que baseado em critérios pré-estabelecidos, como os propostos por Patnaik *et al.* (1984), é subjetivo, especialmente quando se consideram tumores de diferenciação intermediária.

Tal fato foi bem apontado no primeiro trabalho desta dissertação (Mastocitoma cutâneo canino: variação entre observadores na graduação histopatológica), aonde em 21,4% houve concordância na graduação entre os observadores, que compreendiam mastocitomas muito bem diferenciados (grau I) e aqueles indiferenciados (grau III). O restante dos 42 mastocitomas avaliados (33 casos - 78,6%) teve diagnósticos discordantes, seja por um dos observadores (33,3% de diagnósticos concordantes entre três observadores) ou por dois deles (45,3% de diagnósticos concordantes entre dois observadores), sendo que destes, 7,1% tiveram as três graduações histopatológicas possíveis no mesmo tumor.

Esse grande grupo de mastocitomas com diagnósticos discordantes (78,6%) compreende tumores não tão bem diferenciados, que sem dúvida nenhuma não seriam categorizados no grau I, nem no grau III (anaplásicos e positivos para c-KIT), mas aqueles com alguns critérios de malignidade, que os categorizariam em grau II, porém, por exemplo, com muita granulação citoplasmática e numerosos eosinófilos, sem células gigantes ou figuras de mitose, que para um dos observadores poderia se encaixar no grau I.

O mesmo foi observado por Northup *et al.* (2005) que sugerem ainda que novos critérios histopatológicos sejam adotados e correlacionados a aspectos moleculares e clínicos. Talvez por esta dificuldade, a maioria dos mastocitomas caninos tenha prognóstico imprevisível e deva ser considerado como potencialmente maligno.

Dentro deste contexto, na busca de uma ferramenta mais acurada para a graduação dos mastocitomas caninos, Kiupel *et al.* (2004) e Webster *et al.* (2007) correlacionaram o padrão de marcação de c-KIT com a graduação histopatológica e sugeriram que a imunomarcação membranosa se correlaciona a um bom prognóstico, a citoplasmática difusa a um prognóstico moderado e a citoplasmática focal a um prognóstico ruim.

A avaliação da expressão de c-KIT pode vir a se tornar uma ferramenta fundamental na adequação da graduação histopatológica, isso se deve ao fato de que o mastocitoma apresenta três padrões de marcação para o KIT (membranoso, citoplasmático focal e citoplasmático difuso).

Ao correlacionar o padrão de marcação do c-KIT com a graduação histopatológica fica evidente tal correlação. Neste estudo (segundo trabalho apresentado: Expressão de c-KIT como critério de diferenciação dos mastocitomas cutâneos caninos), 86% dos mastocitomas grau I avaliados possuíam marcação membranosa, e somente 14% apresentavam marcação citoplasmática difusa. 75% dos mastocitoma grau II apresentaram marcação citoplasmática difusa, 21% membranosa e 4% citoplasmática focal, e nos mastocitomas grau III, 50% apresentavam marcação citoplasmática difusa, 42% marcação citoplasmática focal e 8% membranosa. Com tais resultados e com a correlação estatística significativa pelo teste do qui-quadrado ($p < 0,05$) pode-se concluir que conforme o padrão de marcação muda, há um aumento na malignidade da neoplasia na ordem de membranoso, citoplasmático difuso e

citoplasmático focal, bem como talvez existam tumores grau II (com marcação membranosa) que poderiam ser classificados como grau I e que tumores grau I, com marcação citoplasmática poderiam ser considerados grau II na histopatologia e assim por diante.

Outro ponto a ser considerado é o ganho de uma função autócrina dos mastócitos neoplásicos quanto a produção e fosforilação da proteína KIT, que estimula a proliferação celular, migração de células, degranulação e supressão da apoptose dos próprios mastócitos, sendo esses aspectos importantes na progressão tumoral e maior potencial maligno (WEBSTER *et al.*, 2007). Pelos nossos resultados, em que todos os mastocitomas caninos expressaram c-KIT, independente do grau do tumor, devemos considerar todos os mastocitomas com potencial maligno.

Zemke *et al.* (2002) observaram que a mutação no gene c-KIT nos mastocitomas caninos é mais freqüente nos tumores indiferenciados (grau III), explicando o maior potencial maligno deste grupo, bem como Reguera *et al.* (2000) que demonstraram a direta correlação da expressão da proteína KIT com graus mais avançados de mastocitoma. No nosso estudo, independente do grau, todos os mastócitos neoplásicos apresentaram imunomarcação para c-KIT (com padrões de marcação diferentes).

Sem dúvida, pelos resultados apresentados, a imunomarcação do c-KIT (CD117) é uma ferramenta útil no diagnóstico dos mastocitomas indiferenciados, como proposto por Zemke *et al.* (2002) e Reguera *et al.* (2000), além da correlação estatística do padrão de marcação (membranoso, citoplasmático difuso, citoplasmático focal) com o grau de diferenciação do tumor, observada no segundo trabalho apresentado.

A realização da técnica de imunoistoquímica para a verificação do padrão de marcação de c-KIT é viável no uso rotineiro, pois utiliza um anticorpo policlonal, em diluição grande (1:400) e os cortes podem ser obtidos do mesmo bloco de parafina em que o material foi incluído para histopatologia. O tempo de realização do exame não é superior a 48 horas e o custo final é razoável (somando-se R\$3,75 de anticorpo primário por lâmina, mais o kit secundário - R\$3,60 por lâmina, DAB e demais reagentes, totalizando, não mais que R\$15,00 por lâmina).

Além disso, como parte de nosso grupo de pesquisa em mastocitoma canino, a imunomarcacão com c-KIT está sendo feita em preparados citológicos, com resultados promissores.

Para dar continuidade nesta linha, que parece mais promissora na graduação dos mastocitomas, trabalhos que correlacionem o tipo de expressão do c-KIT com aspectos clínicos, sobrevida, recorrência do tumor e tempo livre de doença devem ser feitos.

O uso de marcadores de proliferaçãocelular, apoptose, angiogênese, mediadores inflamatórios, fatores de crescimento, oncogenes, entre outros é fundamental para o entendimento do comportamento biológico das neoplasias. Essas proteínas podem ser pesquisadas por imunistoquímica ou por técnicas como PCR, ELISA, citometria de fluxo, entre outras. Cada uma destas tem suas indicações e limitações. A imunistoquímica permite avaliar a presença ou ausência de determinado antígeno no tecido fixado em formol e incluído em parafina, o que é uma vantagem na rotina dos laboratórios de anatomia patológica. Porém, este método é qualitativo e não quantitativo. As demais técnicas permitem a quantificaçãoda proteína no tecido, porém, normalmente, em amostras frescas ou congeladas.

A busca de biomarcadores para o prognóstico pode ser feita utilizando-se anticorpos primários contra as proteínas envolvidas no processo de iniciação, promoçãoe progressão tumoral. Nosso grupo de pesquisa vem procurando biomarcadores para os mastocitomas caninos que auxiliem na graduaçãodo tumor (como o c-KIT), na possível indicaçãodo uso de drogas anti neoplásicas (como os inibidores seletivos da COX-2, no estudo da expressãode COX-2 em mastocitomas caninos) e entendimento de mecanismos de metástase, inibiçãoda apoptose, estímulo a proliferaçãocelular e angiogênese como a imunomarcacão para PGE2 e VEGF.

O mastocitoma canino apresenta alta produçãode VEGF, o que demonstra sua capacidade em estimular a angiogênese pelos mastócitos neoplásicos. Não é claro se o VEGF age de forma autócrina, estimulando a multiplicaçãodos próprios mastócitos neoplásicos, via receptores para este fator de crescimento (SHINKRAUK *et al.*, 2003) ou se há o estímulo a angiogênese, que de qualquer forma, contribui para o crescimento tumoral,

além de facilitar a metástase, pelos vasos neoformados serem mais permeáveis às células neoplásicas (KUSEWITT e RUSH, 2007).

Tal fato foi demonstrado no terceiro trabalho desta dissertação (Expressão de PGE2 e VEGF em mastocitomas cutâneos caninos) aonde os 53 mastocitomas caninos avaliados apresentaram marcação positiva para VEGF. Ao avaliar o percentual de células marcadas e a intensidade de expressão não houve correlação estatística com a graduação histopatológica dos mastocitomas, demonstrando o potencial de estímulo à angiogênese do mastocitoma, mas independente da sua graduação. No entanto, ressaltamos que a avaliação da intensidade de expressão é extremamente subjetiva, pois esta é uma reação tintorial que está sujeita a diversos fatores, desde aqueles ligados ao processamento do material, como o tempo de fixação, até fatores externos, como ao padrão utilizado pelo pesquisador (na classificação de forte, moderado ou fraco) que pode facilmente ser prejudicado pelo equipamento usado na análise, como o digitalizador de imagens, que possui um programa de visualização que pode ter sua intensidade de coloração alterada pela quantidade de luz usada no microscópio.

Devido a estas variáveis, a avaliação da quantidade de proteína (VEGF) produzida deve ser realizada com técnicas quantitativas como ELISA, Citometria de fluxo, PCR, entre outras.

A produção de substâncias como a COX2 já foi relacionada com a progressão neoplásica (DORÉ *et al.*, 2003), e em mastocitoma canino, Calderón (2005), verificou uma relação estatística da imunomarcação de COX-2 com os tumores grau I e III, porém sem diferença entre os graus I-II e II-III, sendo de se esperar que a PGE2 também possua tal comportamento, sendo este um dos principais metabólitos da COX2.

O mastocitoma canino também produz grande quantidade de PGE2, demonstrado pela marcação de quase 100% dos tumores avaliados. No entanto, assim como a expressão de VEGF, não houve correlação estatística entre a intensidade de expressão de PGE2 com a graduação histopatológica, tal fato é justificado pela limitação da técnica, já explicado para o VEGF.

Ao correlacionar o percentual de células marcadas por PGE2 com a graduação histopatológica há uma correlação estatística significativa quanto se comparam os graus I e III. Com essas informações pode pensar na utilização

do PGE2 como um biomarcador prognóstico, pois sua expressão é baixa em mastocitomas diferenciados e alta nos indiferenciados. Portanto sua avaliação ajuda na elaboração do prognóstico, como foi observado para o COX2 por Calderón (2005). No entanto a ausência de correlações estatísticas positivas nas quais o grau II está envolvido demonstra a complexidade desse grau e que novos critérios devem ser estabelecidos para a acurada classificação dos mastocitomas caninos e conseqüentemente estabelecimento de tratamento adequado e prognóstico.

A oncologia veterinária vem se desenvolvendo rapidamente, pelo aumento da expectativa de vida dos animais de companhia, e a patologia veterinária deve acompanhar este processo, com o desenvolvimento de técnicas avançadas de diagnóstico para fornecer subsídios seguros para o diagnóstico, prognóstico e até mesmo indicação do uso de drogas menos agressivas (como os inibidores seletivos de COX2) ou terapia gênica.

Conclusões gerais

A histopatologia convencional pela coloração por HE ainda é a ferramenta mais útil para determinação do prognóstico dos mastocitomas caninos utilizando-se a graduação histopatológica proposta por Patnaik *et al.* (1984). No entanto com a crescente utilização de biomarcadores, o material rotineiramente corado por HE e avaliado com os critérios pré-estabelecidos traz informações limitadas sobre o comportamento biológico do tumor, uma vez que estes parâmetros são subjetivos e passíveis de avaliações individuais. Portanto, a utilização de biomarcadores de proliferação, angiogênese, mediadores inflamatórios entre outros, são necessários quando se busca prognósticos acurados, visto que independente da graduação histopatológica, os mastocitomas apresentam alta produção de VEGF, PGE2 e c-KIT e devem ser sempre encarados como neoplasias potencialmente malignas.

Referências:

Abdel-Majid R.M.; Marshall J.S. Prostaglandin E2 induces degranulation-independent production of vascular endothelial growth factor by human mast cells. **The Journal of Immunology**. v 172 p 1227-36, 2004.

Achen M.C.; Jeltsch M.; Kurr E. *et al.* Vascular endothelial growth factor D (VEGF D) is a ligand for the tyrosine kinases VEGF receptor 2 (flk1) and VEGF receptor 3 (flt4). **Proc Natl Acad Sci USA** v. 95, p. 548-53, 1998.

Adams J.; Carder P.J.; Downey S.; Vascular endothelial growth factor (VEGF) in breast cancer: comparison: of plasma, serum, and tissue VEGF microvessel density and effects of tamoxifen. **Cancer Research** v. 60, p.2898-905, 2000.

Albini A.; Morini M.; D'agostini F. *et al.*, Inhibition of angiogenesis-driven kaposi's sarcoma tumor growth in nude mice by oral N-acetylcysteine. **Cancer Research**. v. 61, p. 8171-78, 2001.

Ara G.; Teicher B.A. Cyclooxygenase and lipoxigenase inhibitors in cancer therapy. **Prostaglandins, Leukot Esset Fatty Acids**; v. 54: p3-16, 1996.

Balsari A.; Maier J.A.M.; Colnaghi M.I.; Menard S. Correlation between tumor vascularity, vascular endothelial growth factor production by tumor cells, serum vascular endothelial growth factor levels, and serum antigenic activity in patients with breast carcinoma. **Lab Invest**. v. 79, p. 897-902, 1999.

Calderón C., **Avaliação da expressão da cicloxigenase 2 e do índice de proliferação celular dos mastocitomas cutâneos caninos pela histopatologia, histoquímica e imunoistoquímica**, Botucatu, 2005, 106p. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista

Cianchi F.; Cortesini C.; Bechi P. *et al.* Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression correlates with tumor angiogenesis in human colorectal cancer. **Gastroenterology**. v 121, p. 1339-47, 2001.

Connolly D.T.; Heuvelman D.M.; Nelson D.M. *et al.* Tumor vascular permeability factor stimulate endothelial cell growth and angiogenesis. **Journal of Clinical Investigation**. v. 84, p.1470-78, 1989.

De Jong J.S.; Van Diest P.J.; Van der Valk P. Baak J.P. Expression of growth factors, growth inhibiting factors, and their receptors in invasive breast

cancer. II. Correlations with proliferation and angiogenesis. **Journal of Pathology** v. 184, p. 53-57, 1998.

Dore, M.; Lanthier I.; Sirois J. Cyclooxygenase-2 Expression in canine mammary tumors. **Vet. Pathol.**, v.40, p.207-212, 2003.

Earnest D.L.; Hixson L.J.; Alberts D.S. Piroxicam and other cyclooxygenase inhibitors: potential for cancer chemoprevention. **Journal of Cellular Biochemistry**. v. 161, p 156-66, 1992

Eibl G.; Bruemmer D.; Okada Y. *et al.* PGE2 is generated by specific COX2 activity and increases VEGF production in COX2 expressing human pancreatic cancer cells. **Biochem and Biophys Res Comm.** v 306, p 887-897, 2003.

Fan, T. M. & Lorimier, L. P. Treatment options for canine cutaneous mast cell tumors. **Veterinary Medicine**. v. 100 n. 4, p. 272-284, 2005.

Ferrara N. The regulation of angiogenesis by vascular endothelial growth factor. **Forum**, v. 4, p.393-403, 1996.

Folkman J.; Klagsburn M. Angiogenic factors. **Science**, v. 235, p. 442-447, 1997

Gallo O.; Franchi A.; Magnelli L. *et al.* Cyclooxygenase-2 pathways correlates with VEGF expression in head and neck cancer. Implications for tumor angiogenesis and metastasis. **Neoplasia**. v 3, p 53-61, 2001.

Gargett C.E.; Rogers P.A. Human endometrial angiogenesis. **Reproduction**. v 121, p 181-86, 2001.

Gasparini G.; Brooks P.C.; Biganzoli E. *et al.* vascular integrin alpha (v) beta3: a new prognostic indicator in breast cancer. **Clinical Cancer Research**. v, 4, p.2625-34, 1998.

Ginn P.E.; Mansell J.E.K.L; Rakich P.M., Skin and appendages in. Maxie M.G. Jubb, Kennedy, and Palmer's Pathology of Domestic Animals, 5ed, v1, p553-772, Saunders Elsevier, 2007.

Gross T.L.; Ihrke, P.J.; Walder, E.J. *et al.* **Skin diseases of the dog and cat: clinical and histopathologic diagnosis**. Oxford: Blackwell, 2005. p.932.

Hanahan D.; Folkmann J. Patterns and emerging mechanism of the angiogenic switch during tumorigenesis. **Cell**. v. 86, p. 353-64, 1996.

Hill, P.B. Mast cells: a review of their biology and role in cutaneous inflammation, In Thoday K.L.; Foil C.; Bond R., **Advances in Veterinary Dermatology**. Oxford: Blackwell Publishing, V 4, p 161-77, 2002.

Hubbard W.C.; Alley M.C.; McLemore T.L. *et al.* Profiles of prostaglandin biosynthesis in sixteen established cell line derived from human lung, colon, prostate, and ovarian tumors. **Cancer Research**. v. 48, p. 4770-75, 1988.

Jones, T.C.; Hunt, R.D.; King, N.W. A pele e seus apêndices. In: Jones, T.C.; Hunt, R.D.; King, N.W. (Eds). **Patologia veterinária**. São Paulo: Manole. p.831-886, 2000.

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

Knapp D.W.; Glickman N.W.; DeNicola D.B. *et al.* Naturally occurring canine transitional cell carcinoma of the urinary bladder. A relevant model of human invasive bladder cancer. **Urology Oncology**. v. 5, p. 47-59, 2000

Ladue, T. *et al.* Radiation Therapy for incompletely resected canine mast cell tumors. **Veterinary radiology & Ultrasound**., v.39 n.1, p.57-62, 1998

Leung D.W.; Cachianes G.; Kuang W.J. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. **Science**. v 246 p. 1306-9, 1989.

London, c. A.; Seguin, b. Mast cell tumors in the dog. **Vet. Clin. Small. Anim. Pract.** 2003, v. 33, p473-479.

London C.A.; Galli S.J., Yuuki T; Hu, Z.Q., Helfand S.C. Spontaneous canine mast cell tumors express tandem duplication in the proto-oncogene c-KIT. **Exp. Hematol.**, v.27, p.689-697, 1999.

Longley, B.J.; Metcalfe, D.D. A proposed classification os mastocytosis incorporating molecular genetics. **Hematol Oncol Clin North Am**. v 14, p 697-701, 2000.

Lupulescu A. Prostaglandins, their inhibitors and cancer. **Prostaglandins, Leukot Esset Fatty Acids**; v. 54: p83-94, 1996.

Lui B.; Earl H.M.; Baban D. Melanoma cell lines express VEGF receptors KDR and respond to exogenously added VEGF. **Biochem Biophys Res Commun**. v. 217, p 721-27, 1995.

Marnett L.J. Aspirin and the potential role of prostaglandin in colon cancer. **Cancer Research** v. 52, p 5575-89, 1992.

Mitsutoshi T.; Siby S.; Bilgen G. *et al.* Vascular Endothelial growth factor up-regulates Cyclooxygenase-2 expression in human endothelial cells **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**. v 87 (7), p 3504-07, 2002.

Mohammed S.I.; Coffman, K.; Glickman, N.W. *et al.* Prostaglandin E2 concentrations in naturally occurring canine cancer. **Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids**, v. 64, p. 1-4, 2001.

Moscatelli D.; Gross J.; Rifkin D. Angiogenic factors stimulate plasminogen activator and collagenase production by capillary endothelial cell. **Journal of cellular Biology**. v. 91, p120a, 1981.

Nicosia R.F.: What is the role of vascular endothelial growth factor related molecules in tumor angiogenesis? **American Journal of Pathology**. v. 153, p. 11-16, 1998

Northrup N.C.; Harmon B.G.; Gieger T.L. *et al.* Variation among Pathologists in histologic grading of canine cutaneous mast cell tumors. **J Vet Diagn Invest**. v 17, p 245-48, 2005.

Pai R.; Szabol.L.; Soreghan B.A. *et al.* PGE2 stimulates VEGF expresión in endotelial cells via ERNK/JNK1 signaling pathways. **Biochem Biophys Res Commun**. v 286, p 923-28, 2001.

Patnaik, A.K.; Ehler, W.J.; Macewen E.G. Canine cutaneous mast cell tumor: morphologic grading and survival time in 83 dogs. **Vet. Pathol.**, v.21, p.469-474, 1984.

Paradiso A.; Ranieri G.; Silvestris N. *et al* Failure of primary breast cancer neoangiogenesis to predict pattern of distant metastatisation. **Clin Exp Med**, v. 1, p127-32, 2001.

Ranieri G.; Gasparini G. Surrogate markers of angiogenesis and metastasis. In: **Metastasis Research Protocols**. Brooks S (ed). Humana Press, Oxford, p99-114, 2001.

Ranieri G.; Gasparini G. Angiogenesis and angiogenesis inhibitors: a new potential anticancer therapeutic strategy. **Curr Drug Targets Imunne Endocr Metabol Disord**. v. 1, p 241-53, 2001

Ranieri G.; Labriola A.; Achille G. *et al* Microvessel density, mast cell density and thymidine phosphorylase expression in oral squamous cell carcinoma. **Internal Journal of Oncology**. v. 21, p.1317-23, 2002

Ranieri G.; Passantino L.; Patruno R. *et al.*, The dog mast cell tumor as a model to study the relationship between angiogenesis, mast cell density and tumor malignancy. **Oncol Rep**. v. 10, p 1189-93, 2003.

Reguera M.J; Rabanal R.M.; Puidgemon T. A. Canine mast cell tumors express stem cell factor receptor. **Am J Dermatopathology**. v 22, p 49-54, 2000.

Restucci B.; De Vico G.; Maiolino P. Evaluation of angiogenesis in canine mammary tumors by quantitative platelet endothelial cell adhesion molecule immunohistochemistry. **Vet Pathology**. v 37, p 297-301, 2000

Restucci B.; Maiolino P.; Paciello O. Evaluation of angiogenesis in canine seminomas by quantitative immunohistochemistry. v 128 (4) p 252-9, 2003

Rogers, K.S. Mast cell tumors: Dilemmas of diagnosis and treatment. **Vet Clin North Am Small Anim Pract**. v.26, p. 87-102, 1996

Rush L.J.; Kusewitt D.F. Neoplasia and Tumor Biology in McGavin M.D.; Zachary J.F. **Pathologic Basis of Veterinary Disease**, 4ed., Mosby Elsevier p 253-98, 2007.

Sales K.J.; Katz.A.A.; Davis M. *et al*. Cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E2 synthesis are up-regulated in carcinomas of the cervix: a possible autocrine/paracrine regulation of neoplastic cell function via EP2/EP4 receptors. **J Clin Endocrinol Metab**. v 86 (5), p 2243-9, 2001.

Shinkaruk, S., Bayle, M., Lain, G., Deleris, G., 2003. Vascular endothelial cell growth factor (VEGF), an emerging target for cancer chemotherapy. *Curr. Med. Chem. Anti-Cancer Agents* 3, 95–117.

Sledge Jr. G.W.; Miller K.D. Exploiting the hallmarks of cancer: the future conquest of breast cancer. **Eur J Cancer**. v 39, p 1668-75, 2003.

Spinella F.; Rosano L.; Di Castro V. *et al*. Endothelin-1-induced prostaglandin E2-EP2, EP4 signaling regulates vascular endothelial growth factor production and ovarian carcinoma cell invasion. **J Bio Chem**. v 279 (45) p 46700-5, 2004.

Stitt A.W.; Simpson D.A.C.; Boocock C.; Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors is regulated in eyes with intra-ocular tumours. **J Path.** v 186 (3), p 306-12, 1998.

Takahashi Y.; Kitadai Y.; Bucana C.D.; Cleary K.R.; Ellis L.M., Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor, KDR, correlates with vascularity, metastasis, and proliferation of human colon cancer. **Cancer Res.** v 55, p 3964-68, 1995.

Takahashi Y.; Tucker, S.L.; Kitadai Y.; Koura A.N.; Bucana C.D.; Cleary K.R.; Ellis L.M., Vessel counts and expression of vascular endothelial growth factor as prognostic factors in node-negative colon cancer. **Arch. Surg.** v 132, p. 541-46, 1997.

Thamm D. H.; Vail, D.M.; Mast cell Tumors , In Withrow S.J.; Vail D.M. **Small Animal Clinical Oncology**, 4 ed. Saunders, p. 402-24, 2007.

Vermeulen P.B.; Gasparini G.; Fox S.B. *et al.* Second International consensus on the methodology and criteria of evaluation of angiogenesis quantification in solid human tumors. **European Journal of Cancer.** v. 38, p. 1564-79, 2002.

Webster, J.D.; Yuzbasiyan-Gurkan, V.; Miller, R.; Kaneene, J.B.; Kiupel, M. Cellular proliferation in canine cutaneous mast cell tumors: association with c-KIT and its role in prognostication. **Vet. Pathol.**, v. 44, p. 298-308, 2007..

Zemke, D.; Yamini B.; Yuzbasiyan-Gurkan, V. Mutations in the juxtamembrane domain of *c-kit* are associated with higher grade mast cell tumors in dogs. **Vet Pathol.** v 39, p 529-35, 2002.