

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**MASTOCITOMA CUTÂNEO CANINO: ASPECTOS CLÍNICO,
CITOPATOLÓGICO, MORFOMÉTRICO E IMUNOCITOQUÍMICO**

RAFAEL TORRES NETO

Botucatu – SP

2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**MASTOCITOMA CUTÂNEO CANINO: ASPECTOS CLÍNICO,
CITOPATOLÓGICO, MORFOMÉTRICO E IMUNOCITOQUÍMICO**

RAFAEL TORRES NETO

Tese apresentada junto ao Programa de
Pós-Graduação em Medicina Veterinária
para obtenção do título de Doutor.

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

Nome do Autor: Rafael Torres Neto

Título: Mastocitoma Cutâneo Canino: aspectos clínico, citopatológico, morfométrico e imunocitoquímico dos mastocitomas cutâneos caninos

COMISSÃO EXAMINADORA

Profª. Ass. Drª Renée Laufer Amorim
Presidente e Orientadora
Departamento de Clínica Veterinária
FMVZ – UNESP – Botucatu

Profª. Adj. Drª Noeme Sousa Rocha
Membro
Departamento de Clínica Veterinária
FMVZ – UNESP - Botucatu

Profª. Ass. Dr Julio Lopes Sequeira
Membro
Departamento de Clínica Veterinária
FMVZ – UNESP - Botucatu

Prof. Adj. Dr Carlos Roberto Daleck
Membro
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária
FCAV – UNESP - Jaboticabal

Prof. Adj. Dr Lissandro Gonçalves Conceição
Membro
Departamento de Veterinária
UFV – Minas Gerais

Data da Defesa: 14 de agosto de 2008.

AGRADECIMENTOS

À **Renée Laufer Amorim**... Certa vez, lendo uma lista de características de um bom orientador observei que a Renée se encaixava em todos os itens! *...competente, autoconfiante, inspiradora, apoiadora, motivadora, generosa com o tempo despendido ao aluno e sempre com muita energia, observadora atenta das aspirações do aluno, tolerante, empática, estimuladora do conhecimento por meio de questionamentos, avaliadora construtiva, construtora de parcerias, promotora do crescimento profissional do aluno, acessível, amigável e honesta.*

Sim... Ela é tudo isso.

Que nossos laços acadêmicos e a amizade sejam duradouros, Muito Obrigado Rénee.

À professora **Noeme Sousa Rocha** pelo apoio, incentivo, ensinamentos de citopatologia e pela amizade.

Ao professor **Júlio Lopes Sequeira**, funcionários **Maury Raul** e **Noel de Almeida Mello**, **pós-graduandos** e **residentes** do Serviço de Patologia Veterinária pela colaboração durante a elaboração deste trabalho.

Aos **docentes** e **residentes** da Cirurgia de Pequenos Animais, por permitirem a coleta de material dos cães atendidos no ambulatório.

As amigas **Mere** e **Luciana**. Eu pedi a elas moradia por um mês, acabei ficando três anos, foi uma ótima convivência.

Aos professores **Sônia**, **Marcone**, **Viciany** e **Lissandro** pelos ensinamentos em dermatologia veterinária clínica e patológica.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP**, pela concessão de bolsa e auxílio pesquisa.

Ao amor da minha família

SUMÁRIO

	<i>PÁGINAS</i>
LISTA DE ABREVIATURAS	1
RESUMO	2
ABSTRACT	3
1. INTRODUÇÃO	4
2. REVISÃO DE LITERATURA	6
3. MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1 Delineamento Experimental	18
3.2 Avaliação Clínica	19
3.3 Processamento das Amostras Citológicas	19
3.4 Exame Imunocitoquímico	20
3.5 Graduação Citopatológica	23
3.5.1 Características Citomorfológicas	23
3.5.2 Contagem de figuras de mitose, binucleação e multinucleação	24
3.6 Morfometria	25
3.7 Análise Estatística	28
4. RESULTADOS	29
4.1 Avaliação Clínica	29
4.1.2 Sexo, Idade e Raça	29
4.1.3 Tempo de Evolução Até o Diagnóstico	31
4.1.4 Localização Anatômica	31
4.1.5 Característica Lesional	32
4.2 Graduação Citopatológica	37
4.3 Morfometria	46

4.4 Imunocitoquímica	49
4.4.1 CD117	50
4.4.2 Índices proliferativo (Ki-67) e apoptótico (caspase-3)	51
4.5 Correlação entre a imunomarcção do Ki-67, caspase-3, número de figuras de mitose, binucleação e multinucleação	53
5. DISCUSSÃO	55
6. CONCLUSÕES	71
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72
8. ANEXO	80

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

+		marcação positiva
CD	cluster of differentiation	antígenos de diferenciação
CD117		marcador de receptor tirosina quinase
SCF	stem cell factor	fator de crescimento de célula tronco
r.p.m		rotações por minuto
µm		micrômetro
CAAF	citologia aspirativa por agulha fina	
cga	campo de grande aumento	
ITD	internal tandem duplication	duplicação em tandem
TED		tempo de evolução até o diagnóstico
cm	centímetro	

TORRES NETO, R. Título: Mastocitoma Cutâneo Canino: aspectos clínico, citopatológico, imunocitoquímico e morfométrico. Botucatu, 2008. 88p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

Foram analisadas 55 amostras citopatológicas de 41 cães, 23 fêmeas e 18 machos, com mastocitoma cutâneo, obtidas pela punção aspirativa por agulha fina. A média de idade dos animais na ocasião do diagnóstico foi de 8,5 anos. Os cães mais acometidos foram os da raça boxer (39%), seguidos pelos mestiços sem raça definida (24,39%). Clinicamente, os aspectos lesionais observados foram o nodular (58,69%), tumoral (17,39%), em placa (13,04%) e papular (10,86%). Em 11 casos os mastocitomas acometeram mais de uma região anatômica, somando-se 25 massas tumorais de mastocitomas múltiplos. As regiões anatômicas mais acometidas, incluindo os mastocitomas únicos (73,18%) e múltiplos (26,82%), foram o tronco (41,81%), membros (29,09%), região escrotal (10,90%) e inguinal (7,27%). Das amostras citopatológicas, uma foi de mastocitoma bem diferenciado (grau I) (2%), 46 (84%) de mastocitomas moderadamente diferenciados (grau II) e oito (14%) de mastocitomas pouco diferenciados (grau III). Pela análise morfométrica a área citoplasmática variou de 95,61 μm^2 a 267,35 μm^2 nos tumores grau II e de 87,13 μm^2 a 221,36 μm^2 nos tumores grau III. A média da área citoplasmática do grau III (137,83 μm^2) foi menor em relação ao grau II (185,84 μm^2), sem apresentar diferença estatística ($p>0,05$). O perímetro citoplasmático também não apresentou diferença estatística entre os graus II e III, variando entre 80,07 μm e 110,99 μm no grau II e 73,96 μm e 102,36 μm no grau III. A área nuclear variou de 53,64 μm^2 a 110,52 μm^2 nos mastocitomas grau II e de 52,39 μm^2 a 94,82 μm^2 nos tumores grau III. A média da área nuclear do grau III (78,41 μm^2) foi maior em relação ao grau II (70,57 μm^2), porém sem diferença estatística ($p>0,05$). O perímetro nuclear também não apresentou diferença estatística entre os graus II e III, variando entre 27,86 μm e 40,11 μm no grau II e 27,20 μm e 37,23 μm no grau III. Os mastocitomas grau II obtiveram uma média na relação núcleo-citoplasma de 0,28 e os mastocitomas grau III média de 0,38. Nos esfregaços corados por Giemsa, contou-se o número de figuras de mitose, células binucleadas e multinucleadas em campo de grande aumento, sendo que a média do número de figuras de mitose foi maior nos mastocitomas grau III (14) do que nos mastocitomas grau II (0,14), havendo diferença estatística ($p<0,0005$). Foi observada diferença estatística na média do número de binucleações entre os graus II (3,08) e III (17,37). Multinucleação não apresentou diferença estatística entre os graus II e III. A imunomarcagem para o CD117 foi positiva em todos os casos avaliados, conferindo positividade para expressão do *c-kit*. A imunomarcagem positiva para o anticorpo Ki-67 (MIB-1) foi maior nos mastocitomas grau III (33,89%) do que nos mastocitomas grau II (9,36%), havendo diferença estatística ($p=0,0082$). Não houve diferença na imunomarcagem da caspase-3 entre os graus II e III. Nos mastocitomas grau II houve correlação positiva entre a imunomarcagem do Ki-67 e o número de figuras de mitose, avaliadas pelo exame citopatológico ($p<0,001$), bem como com o número de células bi e multinucleadas ($p<0,01$). Frente ao exposto, o número de figuras de mitose, o índice de proliferação celular, avaliado pelo Ki-67, a relação núcleo-citoplasma e o número de células binucleadas podem ser utilizados como auxílio na graduação dos mastocitomas em amostras citopatológicas.

Palavras-chave: cão; mastocitoma cutâneo; índice proliferativo; morfometria, imunocitoquímica.

TORRES NETO, R. Título: Canine mast cell tumor: clinical, cytopathological, immunocytochemical and morphometrical analysis . Botucatu, 2008. 88p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

Fifty five cytopathological samples obtained by fine needle aspirates from dogs (23 females and 18 males) with cutaneous mast cell tumors (MCT) were analyzed. Dogs' mean age in the occasion of the diagnosis was of 8,5 years old. Breeds more frequently observed were boxers (39%), followed by for mongrels (24,39%). Cutaneous clinical aspects observed were: nodules (58,69%), tumors (17,39%), plaques (13,04%) and papules (10,86%). In 11 cases (26,82%) lesions appeared in more than one anatomical area and were called as multiple MCT. The most common localization were trunk (41,81%), limbs (29,09%), scrotum (10,90%) and inguinal area (7,27%). The cytopathological grades were: one well differentiated (grade I) (2%), 46 (84%) moderately differentiated (grade II) and eight (14%) poorly differentiated (grade III). Cytoplasmatic area in grade II MCTs ranged from 95,61 μm^2 to 267,35 μm^2 , and in grade III MCTs ranged from 87,13 μm^2 to 221,36 μm^2 . Grade III mean cytoplasmatic area (137,83 μm^2) was smaller than grade II (185,84 μm^2), without statistical difference ($p > 0,05$). The cytoplasmatic perimeter was not statistical different between grade II (80,07 μm -110,99 μm) and III (73,96 μm -102,36 μm). The nuclear area ranged from 53,64 μm^2 to 110,52 μm^2 in grade II MCTs and 52,39 μm^2 to 94,82 μm^2 in grade III MCTs. The mean nuclear area of the grade III MCTs (78,41 μm^2) was larger than grade II MCT (70,57 μm^2), without statistical difference ($p > 0,05$). The nuclear perimeter was not different between grade II (27,86 μm and 40,11) and grade III (27,20 μm and 37,23 μm). The nucleus to cytoplasmatic ratio in grade II was 0,28 and 0,38 in grade III, with statistical difference in both parameters. Mitotic figures, binucleation and multinucleation were also counted. Mitotic index and binucleation in Giemsa's stain was higher in grade III than grade II ($p < 0,0005$). The immunolabelling of cytological samples for CD117 was positive in all the cases, being possible to identify the expression of *c-kit*. The positive immunolabelling for Ki-67 (MIB-1) was higher in grade III MCTs (33,89%) than grade II (9,36%) ($p = 0,0082$). There was no statistical difference between grade II and grade III MCTs caspase-3 immunolabelling. There was a positive correlation between MIB-1 positive index and the number of mitotic figures ($p < 0,001$), as well in the number of binucleated and multinucleated cells in grade II MCTs ($p < 0,01$). On the basis of the results, the number of mitotic figures, binucleated cells, proliferation index (MIB-1) and nucleus to cytoplasmatic ratio can be used to help the grading of mast cells tumors on cytological samples.

Key Words: dog; cutaneous mast cell tumor; cytology; proliferation; morphometry; immunocytology

1. INTRODUÇÃO

O mastocitoma cutâneo canino é uma neoplasia maligna observada na clínica de animais de companhia, de grande importância devido a sua alta frequência. O comportamento clínico é variado, com o paciente ficando livre do câncer com a remoção cirúrgica ou vir a óbito por doença metastática.

De todos os métodos que podem fornecer auxílio no prognóstico do paciente com mastocitoma, a graduação histopatológica parece ser a de maior consistência preditiva.

No mastocitoma cutâneo o diagnóstico pode ser estabelecido pela citopatologia. O Serviço de Patologia Veterinária da FMVZ, UNESP, Botucatu, diagnosticou nos últimos cinco anos 183 casos (4,45%) de mastocitomas por este método.

Baseando-se nas vantagens do exame citopatológico e na ausência de estudos que auxiliem na classificação acurada dos mastocitomas cutâneos caninos, o presente estudo teve como objetivos:

- Graduar os mastocitomas cutâneos caninos, utilizando a citopatologia, adaptando as classificações propostas por Bostock (1973) e Patnaik et al. (1984) para o exame histopatológico e por Raskin e Meyer (2001) para o exame citopatológico.
- Avaliar a quantidade de figuras mitose, células binucleadas e multinucleadas nos mastocitomas cutâneos nos esfregaços citopatológicos e correlacioná-las com a graduação citopatológica.
- Utilizar a técnica de citomorfometria para avaliar os mastócitos neoplásicos, considerando os parâmetros: área citoplasmática e nuclear,

relação núcleo-citoplasma, perímetro citoplasmático e nuclear e fator de circunferência citoplasmático e nuclear e correlacioná-los com a graduação citopatológica.

- Avaliar a expressão do *c-kit* nos mastócitos neoplásicos, utilizando o anticorpo CD117 por imunocitoquímica.
- Avaliar o índice de proliferação dos mastocitomas cutâneos caninos, pela expressão do Ki-67 (MIB-1) por imunocitoquímica e correlacioná-lo com a graduação citopatológica.
- Avaliar o índice apoptótico dos mastocitomas cutâneos caninos pela expressão de caspase-3 por imunocitoquímica e correlacioná-lo com a graduação citopatológica.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Mastocitoma Cutâneo Canino

O mastocitoma canino é uma neoplasia maligna constituída por mastócitos, que corresponde de 7 a 21% dos tumores malignos da pele do cão (PATNAIK et al., 1984; BOSTOCK et al., 1986; GOLDSCHMIDT e SHOFER, 1992). É o tumor cutâneo mais comum nos cães, seguido pelo adenoma perianal, adenoma sebáceo e histiocitoma (BOSTOCK et al., 1986; GOLDSCHMIDT e SHOFER, 1992; THAMM e VAIL, 2007). Dentre as neoplasias malignas, depois do linfoma, é o segundo mais frequente nos cães (LONDON e SEGUIN, 2003; THAMM e VAIL, 2007). Na região sul do Brasil, Bellei et al. (2006) descreveram que o mastocitoma cutâneo é a neoplasia mais frequente entre os cães, seguido pelo tumor venéreo transmissível, enquanto De Nardi et al. (2002) reportaram que o mastocitoma é o segundo mais frequente, sendo os tumores mamários os de maior ocorrência no estado do Paraná.

O mastocitoma cutâneo ocorre mais freqüentemente em animais com média de idade de nove anos. Não havendo predileção sexual, porém, com forte evidência de predisposição racial, sugerindo contribuição genética para o desenvolvimento do mastocitoma (THAMM e VAIL, 2007).

Cães da raça Boxer, bem como em outras descendentes do Bulldog, tais como Boston Terrier e Bulldog Inglês são descritas como predispostas ao mastocitoma (BOSTOCK 1973; PATNAIK et al., 1984; GOLDSCHMIDT e SHOFER, 1992). Dentre as outras raças freqüentemente acometidas estão o Labrador e Golden Retriever, Cocker Spaniel, Beagle, Schnauzer e Shar-Pei

(LONDON e SEGUIN, 2003; THAMM e VAIL, 2007). Em estudo retrospectivo, realizado no estado de São Paulo, Furlani et al. (2008) descreveram a elevada frequência em cães mestiços e Teckel.

Apesar da ocorrência maior no Boxer, estes cães, juntamente com os Pugs, são referidos na literatura por apresentarem tumores bem diferenciados, indicando com isso um prognóstico favorável para estes animais (BOSTOCK 1973; BOSTOCK et al., 1986; McNIEL et al., 2006).

O mastocitoma canino já foi descrito como primário na cavidade oral, conjuntiva, glândula salivar, nasofaringe, laringe, ureter, medula espinhal e trato gastrintestinal (PATNAIK et al., 1982; CROWE et al., 1986; IWATA et al., 2000; MOORE et al., 2002; STEFFEY et al., 2004). O mastocitoma visceral envolvendo o baço, fígado e linfonodos, geralmente referido como mastocitose, pode resultar da disseminação metastática de casos cutâneos, porém, também ocorre independentemente (TAKAHASHI et al., 2000; SOUZA et al., 2001). Leucemia primária de mastócitos é rara (DAVIES et al., 1981).

A pele é o local de maior ocorrência do mastocitoma (LONDON e SEGUIN, 2008; THAMM e VAIL, 2007). Na pele os mastocitomas localizam-se na derme (PATNAIK et al., 1984; BOSTOCK, 1973) ou tecido subcutâneo (NEWMAN et al., 2007) e são frequentemente observados no tronco, região perineal, inguinal e membros (BOSTOCK, 1973; GOLDSCHMIDT e SHOFER, 1992, FURLANI et al., 2008). Massas tumorais na cabeça, pescoço e genitália são menos freqüentes (LONDON e SEGUIN, 2003; KIUPEL et al., 2005; THAMM e VAIL, 2007). Newman et al. (2007) descreveram que os mastocitomas com localização subcutânea apresentam comportamento biológico menos agressivo em relação aos de abrangência dérmica.

O acometimento de localizações anatômicas labial, inguinal, prepucial, escrotal, de leito ungueal e de regiões mucocutâneas são associadas a maior agressividade do tumor (TURREL et al., 1988; GIEGER et al., 2003; KIUPEL et al., 2005).

No entanto, alguns autores (BOSTOCK, 1973, WEISSE et al., 2002; CAHALENE et al., 2004; SFILIGOI et al., 2005) demonstraram não haver correlação entre a localização dos mastocitomas e um prognóstico desfavorável ao paciente.

A caracterização macroscópica da lesão cutânea dos mastocitomas é bem variada (THAMM e VAIL, 2007). Os aspectos lesionais variam de pápulas, placas, nódulos a extensos tumores, com consistência firme a amolecida (LONDON e SEGUIN, 2003). Estas lesões são bem a mal circunscritas e podem apresentar superfície eritematosa, alopecica, ulcerada ou recobertas por pele aparentemente normal. Alguns mastocitomas apresentam-se como elevações edematosas urticariformes, denominadas de sinal de Darier (LONDON e SEGUIN, 2003; THAMM e VAIL, 2007).

A lesão cutânea na maioria dos casos é única, porém o acometimento de múltiplas regiões ocorre em torno de 11% a 14% (KIUPEL et al., 2005; MURPHY et al., 2006; MULLINS et al., 2006). Alguns autores divergem ao afirmarem que cães com mastocitomas múltiplos apresentam prognóstico desfavorável (KIUPEL et al., 2005; MURPHY et al., 2006; MULLINS et al., 2006).

O mastocitoma cutâneo pode apresentar recidivas locais após tratamento e, as metástases ocorrem por disseminação hematogena ou linfática atingindo linfonodos regionais, baço, fígado e medula óssea, sendo

raro a metástase pulmonar (GIEGER et al., 2003; MURPHY et al., 2006, MULLINS et al., 2006, ENDICOTT et al., 2007).

Outros sinais clínicos refletem a extensão do envolvimento sistêmico e a presença ou ausência de síndrome paraneoplásica atribuída a degranulação dos mastócitos e a liberação, principalmente, de histamina e heparina. Os animais podem apresentar anorexia, êmese ou hematêmese, diarréia, melena e neuropatia (LONDON e SEGUIN, 2003, THAMM e VAIL, 2007; RODIGHERI et al., 2008).

A etiologia do mastocitoma é desconhecida (THAMM e VAIL, 2007). Relatou-se a transmissão de mastócitos neoplásicos em cães utilizando experimentalmente transferência celular, o que poderia ser indicativo da existência de um agente viral, no entanto, não foi identificado nenhum agente infeccioso que sustente a hipótese de transmissão horizontal (BOWLES et al., 1972).

Fragilidade cromossômica (STONE et al., 1991), alterações no gene supressor tumoral *p-53* e nas vias que regulam o ciclo celular foram relatadas como possíveis causas para o desenvolvimento dos mastocitomas (MAYR et al., 1999; GINN et al., 2000; JAFFE et al., 2000; WU et al., 2004).

Recentemente foi descrito que há mutações no ponto do gene *c-kit*, que codifica o domínio justamembrana do receptor tirosina quinase em mastócitos neoplásicos (LONDON et al., 1999; REGUERA et al., 2000). A principal mutação encontrada foi à duplicação em tandem que causa fosforilação constitutiva do receptor, sem que ocorra a necessidade da ligação com o SCF. Isso explicaria o crescimento descontrolado dos tumores e a associação das duplicações em tandem com a malignidade desta neoplasia (LONDON et al.,

1999; REGUERA et al., 2000; ZEMKE et al., 2002; DOWNING et al., 2002; WEBSTER et al., 2007).

O diagnóstico do mastocitoma pode ser feito pelos exames citopatológico, utilizando a punção aspirativa por agulha fina (CAAF) e histopatológico da massa tumoral (LONDON e SEGUIN, 2003, THAMM e VAIL, 2007).

A CAAF é um método simples e confiável para o diagnóstico do mastocitoma, no entanto, a histopatologia é necessária para graduar o tumor e determinar, nos casos de exérese cirúrgicas, se as margens de tecido normal estão livres de células neoplásicas (PATNAIK et al., 1984; SEGUIN et al., 2001; WEISSE et al., 2002).

Sobre o exame citológico nos casos de mastocitoma canino, pouco há na literatura, em relação a sua graduação e, principalmente, análises morfométricas das células neoplásicas (RASKIN e MEYER, 2001; STREFEZZI et al., 2003).

Ao exame citológico, a graduação do mastocitoma cutâneo canino varia de acordo com a quantidade de grânulos citoplasmáticos e atipia nuclear (RASKIN e MEYER, 2001). Considera-se tumores grau I (bem diferenciado) aqueles com mastócitos que apresentam numerosos grânulos metacromáticos distintos com pequeno núcleo arredondado e uniforme. No grau II (moderadamente diferenciado) os mastócitos apresentam menor quantidade de grânulos e o tamanho e forma do núcleo pode variar. No caso do grau III (pouco diferenciado) os mastócitos apresentam poucos ou nenhum grânulo citoplasmático e os núcleos apresentam variações de tamanho e forma, além da presença de figuras de mitose. Células binucleadas e multinucleadas podem

estar presentes nos graus II e III. Os eosinófilos, frequentemente, acompanham os mastócitos neoplásicos. No fundo das preparações citológicas, geralmente, observa-se cordões de fibras colágenas (RASKIN e MEYER, 2001).

Considerando as variações histopatológicas e sua correlação com o comportamento biológico dos mastocitomas, Patnaik et al. (1984) criaram um sistema de graduação e propuseram sua adoção. Os critérios utilizados para diferenciar os graus de malignidade do tumor incluem: pleomorfismo celular, número de figuras de mitose, intensidade dos grânulos intracitoplasmáticos, definição das bordas citoplasmáticas além da forma e tamanho dos núcleos e nucléolos.

Sendo assim, segundo os critérios propostos por Patnaik et al. (1984), nos mastocitomas bem diferenciados (grau I), predominam células uniformes, redondas ou ovais, com citoplasma abundante e intensa granulação, núcleo arredondado ou oval com padrão de cromatina homogêneo e basofílico, nucléolo inconspícuo e ausência de figuras de mitose. Nos mastocitomas moderadamente diferenciados (grau II), há discreta anisocitose e anisocariose, o citoplasma apresenta menor quantidade de grânulos, os núcleos apresentam um padrão de cromatina vesicular com nucléolos conspícuos, por vezes há presença de binucleação e as figuras de mitose variam de zero a dois por campo de grande aumento (cga). Nos mastocitomas pouco diferenciados (grau III), há intensa anisocitose e pleomorfismo nuclear, células gigantes com núcleos bizarros e múltiplos, nucléolos proeminentes, a granulação intracitoplasmática é discreta ou ausente e as figuras de mitose variam de três a seis por cga (PATNAIK et al. 1984).

No estudo realizado por Patnaik e colaboradores (1984), 93% dos pacientes com mastocitoma grau I excisados cirurgicamente, sobreviveram aproximadamente quatro anos, enquanto 47% dos pacientes com tumores grau II e 6% com tumores grau III, tratados com cirurgia, sobreviveram pelo mesmo período de tempo.

Em 1973, Bostock já propusera uma classificação para os mastocitomas quanto à relação núcleo-citoplasma, frequência de figuras de mitose, pleomorfismo celular, celularidade tumoral e intensidade dos grânulos intracitoplasmáticos. A nomenclatura desta classificação é oposta a do sistema adotado por Patnaik, na qual os mastocitomas pouco diferenciados são descritos com grau I e os bem diferenciados com grau III.

Admite-se que o exame histopatológico dos mastocitomas permita a sua graduação e conseqüentemente o delineamento adequado do tratamento, porém a subjetividade deste método implica em uma variação entre observadores e não permite estimar o comportamento tumoral em todos os casos (BOSTOCK, 1973; PATNAIK et al., 1984; MURPHY et al., 2004; NORTHRUP et al., 2005 a,b). Northrup et al. (2005a) demonstraram uma diferença significativa entre patologistas na graduação histopatológica do mastocitoma, na qual dez patologistas graduaram em “teste-cego” sessenta casos, havendo uma concordância entre os dez patologistas em 6% e 10% obtiveram as três graduações.

Com o objetivo de diminuir a subjetividade entre observadores na graduação dos mastocitomas, poucos estudos morfométricos foram realizados (STREFEZZI et al., 2003; MAIOLINO et al., 2005). Sendo assim, a avaliação

dos casos limítrofes, como em alguns tumores grau II, permanece um desafio aos patologistas (NORTHRUP et al., 2005 a e b).

Vários fatores prognósticos influenciam a estimativa do comportamento biológico do mastocitoma e auxiliam o delineamento da conduta terapêutica (LONDON e SEGUIN, 2003, THAMM e VAIL, 2007).

A escolha da terapia do mastocitoma está relacionada com estadiamento clínico, graduação histopatológica do tumor e disponibilidade financeira do proprietário do paciente (THAMM e VAIL, 2007).

Para a maioria dos casos a cirurgia convencional, ainda é a principal modalidade terapêutica para a doença (LONDON e SEGUIN, 2003, THAMM e VAIL, 2007). A excisão cirúrgica com margens laterais de 3 cm de tecido normal e um plano fascial de profundidade, geralmente é curativa para os tumores grau I e II (BOSTOCK et al., 1973; PATNAIK et al., 1984; WEISSE et al., 2002).

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

A quimioterapia é indicada para os cães com massas tumorais inoperáveis, devido sua localização ou dimensão ou em casos de metástase (THAMM e VAIL, 2007). Como os mastocitomas grau III apresentam grande probabilidade de metastatizar e conferem ao paciente um período curto de sobrevida (PATNAIK et al., 1984; KIUPEL et al., 2004; WEBSTER et al 2006; WEBSTER et al 2007), a quimioterapia adjuvante nesses casos também é

indicada, independentemente de evidência de metástase (THAMM et al., 2006; HAYES et al., 2007).

Nos últimos anos, para elucidar o comportamento variado desta neoplasia, estudos estão sendo direcionados para compreender o papel do gene *c-kit* e a avaliação do índice de proliferação celular (ABADIE et al., 1999; LONDON et al., 1996; REGUERA et al., 2002; ZEMKE et al., 2002; DOWNING et al., 2002; KIUPEL et al., 2004; WEBSTER et al 2006; SCASE et al., 2006; WEBSTER et al 2007; ROMANSIK et al., 2007).

No homem, mutações no proto-oncogene *c-kit* foram implicadas na patogênese de várias neoplasias incluindo mastocitose, tumor de célula germinativa e tumor estromal gastrointestinal (GISTs) (FURITSU et al., 1993; LONGLEY et al., 2001; HIROTA et al., 1998; TIAN et al., 1999; SAKUMA et al., 2003).

Enquanto a exata etiologia do mastocitoma permanece desconhecida, recentemente, o *c-kit* foi relacionado na sua patogênese (LONDON et al., 1999). Duplicações em tandem (ITD), deleções e mutações pontuais foram identificadas no domínio justamembrana (LONDON et al., 1999; MA et al., 1999, DOWNING et al., 2002), porém, a incidência dessas mutações é variável entre os diferentes estudos realizados (DOWNING et al., 2002; ZEMKE et al., 2002; WEBSTER et al., 2006).

As mutações em ITD do *c-kit* são as mais comuns e, assim como no homem, produzem produtos constitutivamente ativados, implicando o *c-kit* na progressão do mastocitoma (LONDON et al., 1996; MA et al., 1999, DOWNING et al., 2002).

Zemke et al. (2002) demonstraram que mutações no *c-kit* estavam associadas à graduação histopatológica dos mastocitomas e que os pacientes com mutações ITDs tinham um prognóstico desfavorável em relação aqueles que não as apresentavam.

Estudos realizados com técnica de imunistoquímica determinaram padrões anormais de expressão de *c-kit* nos mastocitomas (WEBSTER et al. 2004). Foram identificados três padrões de localização da proteína KIT em mastócitos neoplásicos, sendo eles membranoso, citoplasmático focal e citoplasmático difuso. Estes foram correlacionados com a agressividade do tumor, sendo que animais que possuíam os padrões citoplasmático focal e difuso apresentavam um prognóstico desfavorável (KIUPEL et al., 2004).

Webster et al. (2006) demonstraram que mutações em ITD do *c-kit* correlacionavam-se com os padrões de expressão citoplasmático focal e citoplasmático difuso nos mastocitomas, no entanto, um número significativo de casos com padrão anormais de expressão do *c-kit* não apresentaram mutações ITDs.

Por isso, o real papel do *c-kit* na patogênese do mastocitoma não está totalmente esclarecido, bem como a potencial utilização da droga mesilato de imatinibe, um inibidor da atividade tirosina quinase, utilizado com sucesso em tumores com mutações do *c-kit* no homem (HEINRICH et al., 2002; LONDON, 2004).

Independente de suas causas primárias, as neoplasias apresentam distúrbios no controle do ciclo celular que levam ao aumento da proliferação celular e a formação de massas tumorais (BACCHI e GOWN, 1993).

A detecção e quantificação das células em proliferação constituem parâmetros importantes no prognóstico de diferentes tumores (BACCHI e GOWN, 1993). A distinção entre células quiescentes e células que estão no ciclo celular é de grande relevância, já que a taxa de aumento da população celular é primariamente dependente da fração de células que estão se dividindo. A contagem das figuras mitóticas só é possível na fase do ciclo celular que corresponde à mitose propriamente dita, células em interfase não são consideradas neste tipo de análise, mesmo esta fase correspondendo ao período relativamente mais longo do ciclo celular (ROMANSIK et al., 2007).

A identificação de algumas proteínas que estão presentes somente em células em proliferação trouxe novas perspectivas nos estudos da proliferação celular, com o uso de métodos *in situ*, onde a grande vantagem é que a atividade proliferativa pode ser mensurada sem a perda da integridade tecidual, o que possibilita a análise histológica simultânea e a diferenciação entre as células tumorais e não tumorais (BACCHI e GOWN, 1993).

Diferentes métodos têm sido utilizados, entre eles, a imunistoquímica, que utiliza anticorpos contra antígenos específicos para células proliferativas (ABADIE et al., 1999; ROMANSIK et al., 2007).

A atividade proliferativa determinada pela marcação imunistoquímica pode também ser associada à susceptibilidade do tumor à quimioterapia, uma vez que a maioria das drogas antineoplásicas atua na divisão celular.

No mastocitoma, a avaliação de marcadores de proliferação celular tem sido sugerida como indicador de prognóstico, adicionados à classificação por critérios histopatológicos (ABADIE et al., 1999; ROMANSIK et al., 2007; WEBSTER et al., 2007).

O anticorpo monoclonal de camundongo contra o antígeno Ki-67, clone MIB-1, tem sido aplicado como um marcador de proliferação celular útil em muitas neoplasias. Esse antígeno é expresso durante todo ciclo celular, exceto em G1 precoce, e está ausente em G0. Sua expressão aumenta na segunda metade da fase S, alcançando o máximo em G2 e M (ABADIE et al., 1999).

A avaliação da fração do crescimento pelo índice proliferativo do Ki-67 é altamente preditivo no comportamento de várias neoplasias e, principalmente, nos mastocitomas grau II, na qual a contagem do número de mitoses, juntamente com o polimorfismo celular, pode ser uma característica que o diferencie do grau III (ROMANSIK et al., 2007; WEBSTER et al., 2007).

A variação do comportamento biológico dos mastocitomas cutâneos, que podem ser benignos com a cura pela excisão cirúrgica até metastáticos e fatais (THAMM e VAIL, 2007), faz com que seja necessário estudos mais acurados que assegurem um delineamento terapêutico individualizado.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Delineamento Experimental

Foram utilizados 41 cães sem restrição de sexo, idade ou raça, com diagnóstico citopatológico de mastocitoma cutâneo, realizado pelo Serviço de Patologia Veterinária do Hospital Veterinário da FMVZ, Unesp, Botucatu, e quando possível, com a devida confirmação histopatológica. Estes animais foram atendidos pelo Serviço de Cirurgia de Pequenos Animais do Hospital Veterinário da FMVZ-UNESP, Botucatu, durante um período de 23 meses.

Os cães foram submetidos a coleta de material citológico com objetivo de realizar a graduação citopatológica do tumor, análise morfométrica, além da obtenção de lâminas para exame imunocitoquímico.

A inclusão dos pacientes foi condicionada ao consentimento livre e esclarecimento dos proprietários. O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da FMVZ-UNESP, Botucatu.

A Tabela 1 descreve a metodologia utilizada e seu respectivo número de casos e/ou amostras coletadas.

Tabela 1 – Metodologia empregada, número de animais e número total de amostras para cada procedimento. FMVZ/UNESP, Botucatu, 2008.

Metodologia	Número de animais	Número de amostras
avaliação clínica	41	55
contagem de figuras de mitose, bi e multinucleações	41	55
morfometria	21	23
graduação citopatológica	41	55
imunocitoquímica para <i>c-kit</i> (CD117)	21	35
imunocitoquímica para Ki-67 (MIB-1)	16	21
imunocitoquímica para capase-3	7	10

3.2 Avaliação Clínica

Na ocasião da coleta de material, foram obtidas informações referentes ao sexo, idade, raça, tempo de evolução da neoplasia até o diagnóstico (TED), localização anatômica e aspecto lesional. O TED foi estimado em intervalo entre meses, devido a falta de precisão do proprietário do animal em referir a data de surgimento da lesão. Sendo assim os intervalos referidos para o TED ficaram entre 1 a 3 meses, 3 a 6 meses, 6 a 12 meses e acima de 12 meses.

A característica macroscópica objetivou avaliar a consistência da massa cutânea em firme, fibroelástica e macia, bem como seu aspecto lesional, quanto aos padrões papular, em placa, nodular e tumoral, de acordo com Scott et. al. (2001).

Os casos com acometimento em múltiplas regiões, na qual o tumor ou tumores surgiam distantes 10 cm do tumor original eram categorizados como mastocitoma múltiplo, de acordo com o proposto por Murphy et al. (2006).

3.3 Processamento das Amostras Citológicas

Dos cães com diagnóstico prévio de mastocitoma, feito na primeira consulta do animal, foram colhidas novas amostras da massa tumoral, por citologia aspirativa com agulha fina (CAFF), para confecção de lâminas utilizando seringas descartáveis de 10 ml, agulhas descartáveis (30x0,70) e citoaspirador de Valeri. Após anti-sepsia local, foi realizada a punção da massa tumoral e aplicação de pressão negativa na seringa, fazendo-se o reposicionamento da agulha, em diferentes posições, sem que ela fosse

retirada da massa. A seguir, a pressão negativa era desfeita e a agulha retirada.

A agulha era então desacoplada da seringa, novamente puxado o êmbolo da seringa, a agulha era recolocada na seringa a fim de expulsar o conteúdo da agulha sobre a lâmina de histológica, procedendo-se imediatamente a extensão do material, com auxílio de uma outra lâmina histológica, como descrito por ROCHA (1998).

O esfregaço citológico era seco ao ar ambiente, posteriormente fixado em álcool metílico e corado pelo método de Giemsa (Figura 1), para a avaliação citomorfológica dos mastocitomas e posterior citomorfometria.

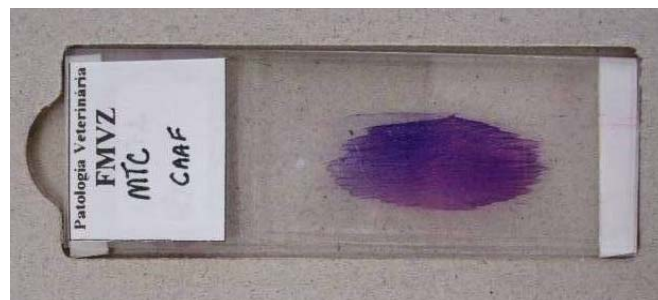


FIGURA 1 – Lâmina histológica. Esfregaço citológico obtido pela técnica de CAAF e corado com Giemsa.

3.4 Exame Imunocitoquímico

Após a punção da massa tumoral para a confecção do esfregaço citológico corado pelo Giemsa, um segundo aspirado foi realizado e o conteúdo da agulha suspenso em um “ependorf” contendo 1,0ml de PBS (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline) mantido refrigerado (4°C).

A seguir, cada “ependorf” devidamente identificado foi subdividido em alíquotas de 100µl e citocentrifugado (500 rpm por durante três minutos), com o

propósito de confeccionar preparados citológicos tipo “botão”. Essas lâminas foram fixadas imediatamente em etanol 95% e armazenadas até o momento da realização da técnica de imunocitoquímica, que não demorava mais que sete dias para o procedimento.

As lâminas armazenadas no etanol 95%, inicialmente foram lavadas em água destilada e em seguida submetidas à recuperação antigênica. Para a recuperação antigênica foi utilizado a solução tampão citrato 10mM, pH 6,0 (Ácido cítrico anidro P.M. 192,13 – Dinâmica) em forno de microondas por três ciclos de cinco minutos cada e a cada intervalo verificava-se o nível da solução tampão e, casos necessário, a solução era repostada.

Em seguida as lâminas foram resfriadas a temperatura ambiente por vinte minutos e submetidas ao bloqueio da peroxidase endógena com água oxigenada 3%. Após essa etapa, as lâminas foram lavadas em água destilada e mantidas em solução tampão TRIS, ph 7,4 até a incubação com os anticorpos primários.

Foram utilizados os seguintes anticorpos primários.

- CD117: para identificação dos mastócitos neoplásicos.
(anti-CD117, policlonal, anti-proteína c-KIT humana. Cod. A4502, DakoCytomation)
- Ki-67 (clone MIB-1): para o estudo do índice de proliferação celular.
(anti-Ki-67, monoclonal, clone MIB-1. Cod. M7240, DakoCytomation)
- anti-caspase-3: para o estudo do índice apoptótico.
(anti-caspase, policlonal, Cod. 9661L, Cellsignaling ASP 175)

Os anticorpos foram diluídos em solução com propriedades redutoras de fundo (Dako Antibody Diluent, cod.S3022) e incubados a 4°C por 18 horas. As diluições foram 1:400 para o CD117 (*c-kit*) e 1:50 para os anticorpos primários anti-Ki-67, clone MIB1, e anti-caspase-3. Após a incubação dos anticorpos primários as lâminas foram lavadas em solução tampão TRIS, ph 7,4 e, em

seguida, aplicado o sistema de amplificação de reação imunocitoquímica ENVISION (ENVISION+DUAL LINK SYSTEM, Peroxidase, cod K4061 – DakoCytomation).

Para a visualização da reação foi utilizado o substrato cromógeno DAB (Liquid DAB Large Volume Substrate Chromogen System (3,3'dimainobenzidina) cod.K3466 – DakoCytomation) por três minutos, lavagem em TRIS , contra-coloração com hematoxilina de Mayer e, por fim, procedia-se a montagem das lâminas que foram levadas à microscopia de luz para ser avaliada a expressão dos anticorpos nos mastócitos neoplásicos (imunomarcção positiva) e quantificação.

Foram feitas lâminas de controle negativo para os anticorpos primários utilizados, substituindo-os por imunoglobulina da espécie em que o anticorpo primário foi produzido. Sendo assim, utilizou-se Ig de camundongo (Universal Negative Control - Mouse Primary Antibodies, N1698,DakoCytomation) no lugar dos anticorpos CD117 e Ki-67 (MIB-1) e Ig de coelho (Universal Negative Control – Rabbit Primary Antibodies, N1699, DakoCytomation) no lugar da caspase-3.

Um corte histopatológico de testículo de cão adulto, clinicamente normal, foi utilizado como controle positivo para a reação imunoistoquímica com o anticorpo primário caspase-3, de acordo com as indicações na bula do anticorpo primário.

A reação imunoistoquímica para o anticorpo primário anti-CD117 quando positiva, confirmava o diagnóstico de mastocitoma.

Para a contagem das células neoplásicas imunomarcadas pelos anticorpos Ki-67, clone MIB-1 e caspase-3 foi estabelecido que somente as células fortemente marcadas fossem consideradas positivas e com marcação nuclear para o MIB-1 e nuclear e/ou citoplasmática para caspase 3.

Sendo assim, contou-se primeiramente, de cada campo, em aumento de 400 vezes, as células positivas e depois as demais células neoplásicas, em todo o campo, até totalizar cem células, mas sempre avaliando o campo todo, mesmo que ultrapassasse as cem células. Quando o esfregaço citológico continha poucas células, todo o material era utilizado para a contagem do percentual de positividade. Para cada caso estabeleceu-se um percentual de positividade para os anticorpos primários Ki-67, clone MIB-1 e caspase-3.

Este procedimento foi realizado com o auxílio de um programa de análise de imagens Leica QWin Plus, que permite a captura de imagens pela câmera digital Leica DFC, acoplada a um microscópio óptico (Leica DMR).

3.5 Graduação Citopatológica

3.5.1 Características citomorfológicas

Os critérios para a graduação citopatológica dos mastocitomas em bem diferenciados (grau I), moderadamente diferenciados (grau II) e pouco diferenciados (grau III) foram adaptados das descrições histopatológicas de Bostock (1973) e Patnaik et al. (1984). Foram consideradas somente as características celulares destes sistemas de graduação (Tabela 3).

Tabela 3 – Características citopatológicas avaliadas nos mastocitomas, adaptadas de Patnaik et al. (1984), Bostock (1973), obtidas de esfregaços citológicos corados pelo Giemsa. FMVZ/UNESP, Botucatu, 2008.

MASTOCITOMA BEM DIFERENCIADO (GRAU I)

Amostra citopatológica com pouca celularidade, arranjando-se de forma debulhada e, de fundo, apresentando discreta a moderada granulação. Os mastócitos neoplásicos não apresentam pleomorfismo celular e nuclear, caracterizando população celular homogênea. As células são arredondadas com citoplasma volumoso exibindo grande quantidade de grânulos de cor púrpura. O núcleo é arredondado, hiper Cromático e excêntrico. Nesta categoria não são observadas figuras de mitose, células binucleadas e multinucleadas. No esfregaço se observa grande quantidade de eosinófilos, porém, este achado não constitui uma regra para a sua graduação citopatológica. Fibroblastos, fibrócitos, células inflamatórias mononucleares e eritrócitos também fazem parte do esfregaço citológico.

MASTOCITOMA MODERADAMENTE DIFERENCIADO (GRAU II)

Amostra citopatológica com moderada a intensa celularidade. Anisocitose é evidente, com pequena a grandes células arredondadas e ovais. Poucas células apresentam-se com característica poligonal e com bordos citoplasmáticos indistintos. Os grânulos intracitoplasmáticos são grandes e abundantes e a observação de grânulos ao fundo da lâmina pode ser intensa. Anisocariose é evidente com os núcleos posicionados mais centralmente. Macrocariose e células gigantes podem ser observadas. O padrão de cromatina nuclear predominate é grosseiro. Há presença de nucléolos, em geral de um a dois proeminentes. Células binucleadas e multinucleadas são observadas. Por vezes, o núcleo de algumas células são convolutos com padrão de cromatina vesicular. Ao fundo do esfregaço pode ser observado cordões de estruturas colágenas. No esfregaço se observa grande quantidade de eosinófilos, porém, este achado não constitui uma regra para a sua graduação citopatológica. Fibroblastos, fibrócitos, células inflamatórias mononucleares e eritrócitos também fazem parte do esfregaço citológico.

MASTOCITOMA POUCO DIFERENCIADO (GRAU III)

Amostra citopatológica com intensa celularidade. O citoplasma da maioria das células é completamente desprovido de grânulos, com poucas células apresentando discreta granulação de cor púrpura. As células são arredondadas e com população mais homogênea em relação as do grau II. Anisocariose é evidente com núcleos posicionados centralmente. Macrocariose e células gigantes podem ser observadas. Figuras de mitoses, células bi e multinucleadas são mais frequentes nesta categoria. Extracelularmente não se observam grânulos e a quantidade de eosinófilos é menor em relação ao grau II. Fibroblastos, fibrócitos, células inflamatórias mononucleares e eritrócitos também fazem parte do esfregaço citológico em menor frequência em relação ao grau II.

3.5.2 Contagem de figuras de mitose, binucleação e multinucleação

A fim de padronizar a metodologia de contagem das figuras de mitose, binucleação e multinucleação foram observados vinte campos em grande aumento (cga-400x), a partir do início do esfregaço citológico, percorrendo em sentido a extremidade lateral oposta e retornando até a extremidade lateral de

origem do esfregaço, sem repetir o campo observado anteriormente. O total de campos observados, em todas as amostras, equivaleu a mais da metade dos esfregaços citopatológicos. A contagem foi realizada com o auxílio de contador de células (Cronobio – contador manual de células sanguíneas cod. 60103).

3.6 Morfometria

Os mastócitos neoplásicos foram analisados por um sistema computadorizado composto por um microscópio óptico (Leica, DMR) acoplado a uma câmara de vídeo (Leica, DFC500) que transfere as imagens para um monitor de computador (Intel, Pentium 4, 3.2GH, 1GB de RAM) equipado com um programa de análise de imagens Leica QWin Plus. As análises morfométricas foram realizadas em aumento de 640 vezes, calibrada previamente com auxílio de régua micrométrica (PYSER-SGI).

Para cada esfregaço citológico foram contornadas no mínimo cem células, utilizando uma caneta e mesa digitalizadora (Trust 1200-V2 Wireless Scroll Tablet), sendo avaliados o núcleo e o citoplasma, respectivamente.

Os parâmetros morfométricos utilizados foram a área (equivalente a área nuclear e citoplasmática), perímetro (equivalente a medida do perímetro nuclear e citoplasmático), fator de circunferência (representando a regularidade do núcleo e citoplasma, no qual o equivalente próximo de 1 demonstra um círculo perfeito) e a relação núcleo-citoplasma.

Primeiramente contornavam-se os núcleos (Figura 2A), em seguida a membrana citoplasmática, obtendo-se os parâmetros de toda a célula, incluindo núcleo e citoplasma (Figura 2B) e o programa de análise de imagens realizava a diferença entre a célula toda e o núcleo, sendo este valor atribuído ao citoplasma (Figura 2C).

As células analisadas apresentavam limites citoplasmáticos e nucleares distintos e não eram sobrepostas no esfregaço, já naquelas em que os grânulos intracitoplasmáticos impediam a visualização nuclear e citoplasmática, estas eram ignoradas, assim como células binucleadas, multinucleadas e as com figuras de mitose.

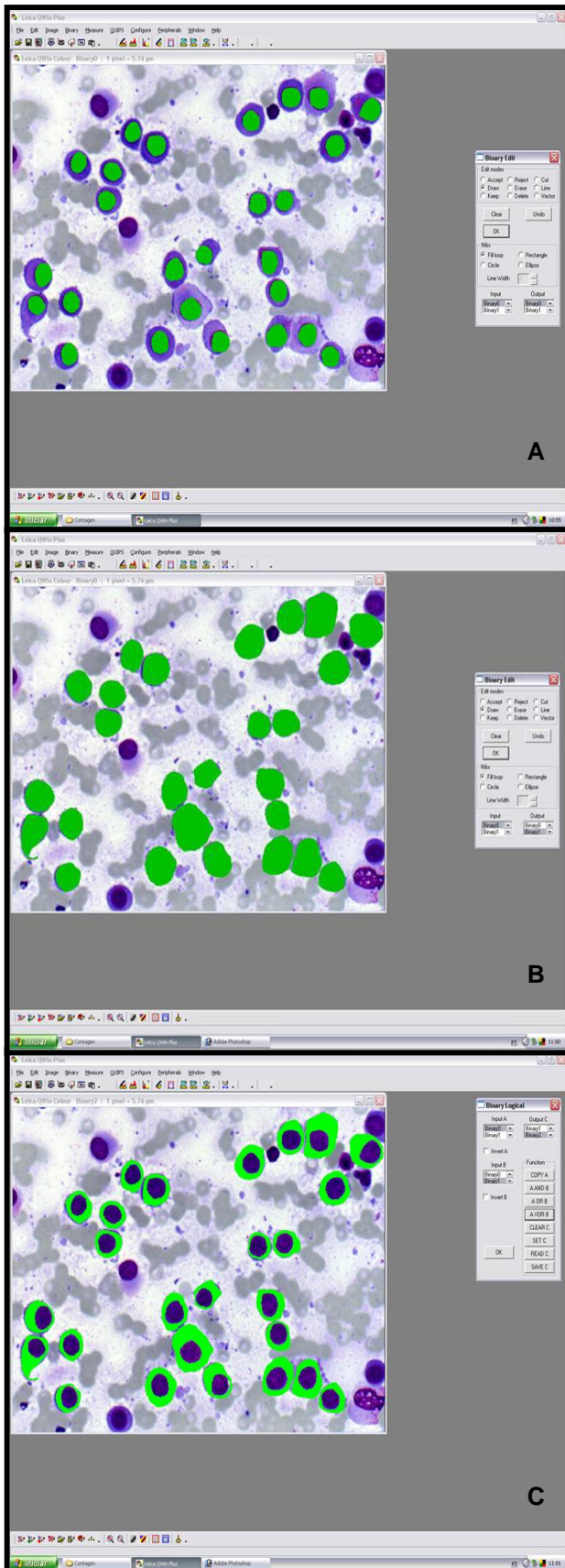


Figura 2. Imagem de esfregaço citológico de um caso de mastocitoma grau III inserido no programa de análise de imagens Leica Qwin Plus.

(A) As estruturas de coloração verde são o resultado do contorno dos núcleos de mastócitos neoplásicos com auxílio de caneta e mesa digitalizadora.

(B) As estruturas de coloração verde são o resultado do contorno, com auxílio de caneta e mesa digitalizadora dos limites citoplasmáticos, na qual representam toda célula

(C) As estruturas de coloração verde representam o citoplasma dos mastócitos neoplásicos, obtidos pela função AXORB (área citoplasmática menos área nuclear) do programa de morfometria computadorizada Leica Qwin Plus.

3.7 Análise Estatística

Os dados foram analisados pelo programa estatístico GraphPad InStat 3, considerando-se como significante, $p < 0,05$, para os seguintes parâmetros:

- Comparação entre o número de figuras de mitose, binucleação e multinucleação com os graus dos mastocitomas: teste de Mann Whitney;
- Comparação entre o número de mitoses, binucleações e multinucleações e o número de células positivas com o índice proliferativo (Ki-67) e apoptótico (caspase 3): teste de Mann Whitney
- Comparação entre o percentual de positividade para os anticorpos primários Ki-67 e caspase-3 e os graus dos mastocitomas: Teste Kruskal Wallis
- Comparação entre os parâmetros morfométricos avaliados e os graus dos mastocitomas: Teste t e Mann Whitney
- Relação núcleo-citoplasma: Teste t não pareado

4. RESULTADOS

4.1 Avaliação Clínica

4.1.2 Sexo, Idade e Raça

Foram avaliados 41 cães, sendo 23 fêmeas e 18 machos, com idade variando entre dois e 15 anos. A média de idade dos animais acometidos foi de 8,5 anos. A distribuição dos casos por sexo e idade estão representados nas figuras 3 e 4.

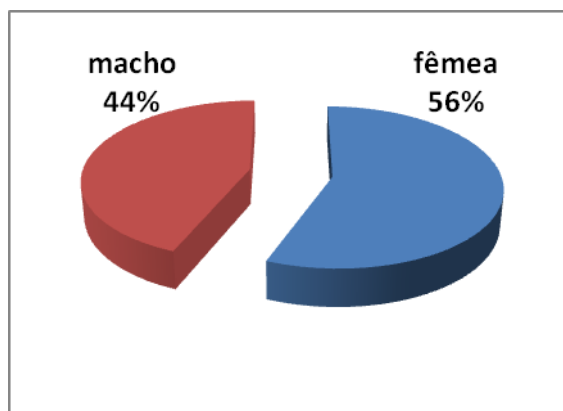


Figura 3 – Frequência do sexo dos animais acometidos pelo mastocitoma, diagnosticado por CAAF, (n=41). FMVZ/UNESP, Botucatu, 2008.

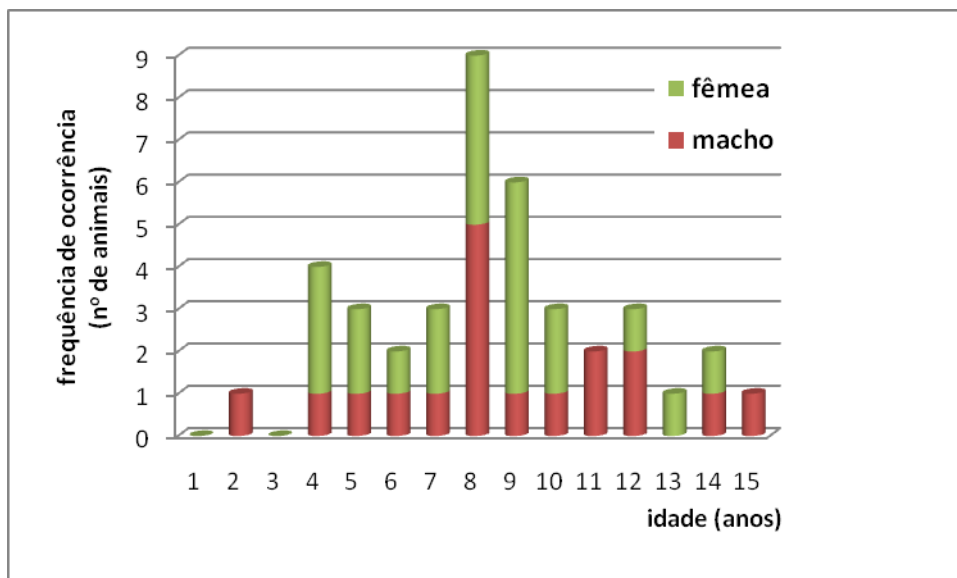


Figura 4 – Número de animais distribuídos por idade (anos) e sexo dos cães acometidos pelo mastocitoma, diagnosticado por CAAF, (n=41). FMVZ/UNESP, Botucatu, 2008.

A raça foi definida em 75,6% dos animais (n=31/41), distribuídas da seguinte forma: Boxer (16/41), Poodle (4/41), Pit bull (2/41), Pinscher, Rottweiler, Terrier Brasileiro, Labrador, Pastor Alemão e Cocker Spaniel Americano.

A maioria dos animais era Boxer (39,02%), seguido pelo mestiço sem raça definida (10/41). A distribuição dos casos por raça está representada na tabela 5.

Tabela 5 - Número de cães distribuídos por raça e animais mestiços SRD, dos cães acometidos pelo mastocitoma, diagnosticado por CAAF. FMVZ/UNESP, Botucatu, 2008.

Definição Racial	N (%)
Boxer	16 (39,02%)
Mestiço S.R.D	10 (24,39%)
Poodle	4 (9,75%)
Pit Bull	2 (4,87%)
Pinscher	2 (4,87%)
Rottweiler	2 (4,87%)
Terrier Brasileiro	2 (4,87%)
Labrador	1 (2,43%)
Pastor Alemão	1 (2,43%)
Cocker Spaniel Americano	1 (2,43%)
TOTAL	41 (100%)

SRD: sem raça definida, N: número absoluto; (%): frequência relativa

Tempo de Evolução até o Diagnóstico

A evolução das massas tumorais até o momento do diagnóstico foi informada em 15 casos (36,6% - 15/41) e variou de um mês a acima de 12 meses. Um caso (6,7% - 1/15) apresentou evolução até três meses (1 a 3 meses), dez (66,6% - 10/15) foram referidos com evolução entre três a seis meses, três casos (20% - 3/15) com evolução entre seis a 12 meses e um (6,7% - 1/15) com evolução de mais de 12 meses. Nos demais casos (63,4% - 26/41), os proprietários não sabiam informar o tempo de evolução do tumor.

4.1.4 Localização Anatômica

Foram computadas 55 massas, uma vez que 11 animais (26,8%) apresentavam mais de um tumor (mastocitoma múltiplo), com distância maior do que 10 cm entre as massas. Destes, oito casos apresentaram acometimento em duas regiões anatômicas diferentes, totalizando dezesseis massas tumorais, e três com acometimento de três regiões, totalizando nove massas tumorais. O total de massas tumorais nos mastocitomas múltiplos foram 25.

As regiões anatômicas mais acometidas, incluindo os mastocitomas únicos e múltiplos, foram o tronco (41,81%) e membros (29,09%), seguida pela região escrotal (10,90%) e inguinal (7,27%). A Tabela 5 apresenta as regiões anatômicas das 55 massas tumorais nos mastocitomas.

Tabela – 5. Localização anatômica das massas cutâneas dos mastocitomas, diagnosticado por CAAF (n=55). FMVZ/UNESP, Botucatu, 2008.

Localização	Número massas tumorais	Percentual Regional (%)	Percentual do Total (%)
Cabeça	Total 2	100	3,63
<i>pavilhão auricular</i>	2	100	3,63
Cervical	Total 1	100	1,81
Tronco	Total 23	100	41,81
<i>torácica</i>	18	78,26	32,72
<i>abdominal</i>	4	17,39	7,27
<i>lombar</i>	1	4,34	1,81
Membros	Total 16	100	29,09
<i>torácicos</i>	1	6,25	1,81
<i>pélvicos</i>	15	93,75	27,27
Inguinal	Total 4	100	7,27
Perianal	Total 1	100	1,81
Vulvar	Total 2	100	3,63
Escrotal	Total 6	100	10,90

4.1.5 Característica Lesional

Foram avaliadas 46 massas de mastocitomas cutâneos caninos (46/55; 83,63%), levando-se em consideração a consistência (Tabela 6) e aspecto clínico (Figura 5). Para as demais massas (9 massas), não foram obtidas informações sobre as características lesionais.

Tabela 6 – Número absoluto e frequência de mastocitomas distribuídos de acordo com a consistência da lesão. FMVZ/UNESP, Botucatu, 2008.

Consistência	n (%)
macia	31 (67,4)
firme	13 (28,3)
fibroelástica	2 (4,3)

n: número absoluto; (%): frequência relativa

Os aspectos lesionais mais frequentes foram o nodular (59%) (Figuras 6 e 7 – E, F, G, H, J) e tumoral (17%) (Figuras 6, 7 – I e F), seguido pelo papular (11%) (Figuras 8 e 9 – A, B, C, D) e em placa (13,%) (Figuras 6 e 7 – A, B, C, D, E).

Quanto a delimitação das massas cutâneas, as papulares e nódulo-tumorais apresentaram-se bem circunscritas (Figuras 6 – A, B, C, D, E, F, G, H, I e 7 – F) . As placas apresentaram-se pouco circunscritas (Figuras 7 – A, B, C, D, E). Os tumores variaram em diâmetro de quatro a 12 centímetros (média de 6,2 cm). As duas massas com consistência fibroelástica apresentaram-se como nódulos pedunculados (Figura 9 – J).

Ulceração ocorreu em oito massas tumorais (17,39%; 8/46), sendo duas torácicas (25%) (Figuras 6 – D,G) e seis escrotais (75%) (Figuras 7 – A, B, C, D, E). Dez (21,73%; 10/46) eram alopecicas, uma hiperpigmentada (2,17%; 1/46) (Figura 6 – A) e doze (26,08%; 12/46) recobertas por pele de aspecto normal.

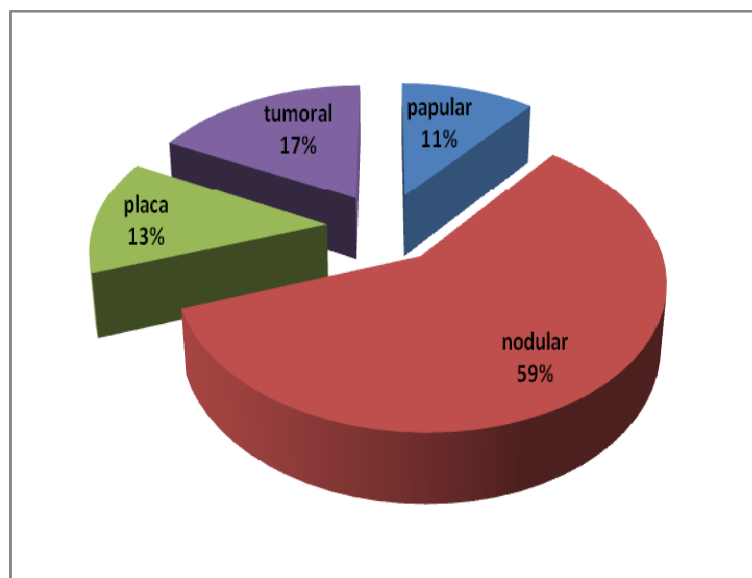


Figura 5 – Percentual de animais distribuídos por aspecto clínico das massas de mastocitoma, diagnosticado por CAAF (n=46).

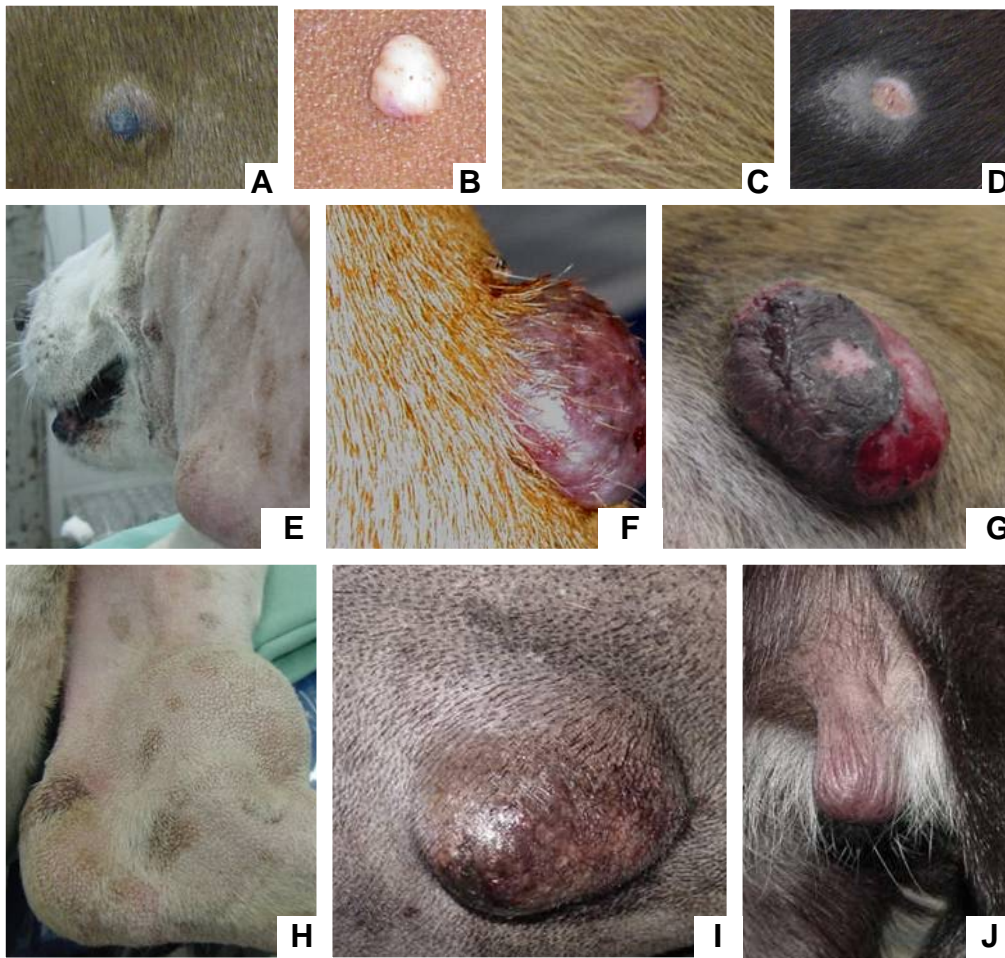


Figura 6 – Apresentação clínica dos mastocitomas cutâneos caninos. (A) Lesão papular hiperpigmentada localizada na região torácica. (B) Lesão papular alopécica localizada na facel lateral da coxa. (C) Lesão papular alopécica localizada na região torácica. (D) Lesão papular ulcerada localizada na região torácica. (E) Lesão nodular recoberta por pele normal localizada na região cervical (região com tricotomia pré-cirúrgica). (F) Lesão nodular alopécica localizada na facel lateral da coxa. (G) Lesão nodular ulcerada localizada na região torácica. (H) lesão nodular recoberta por pele normal localizada em membro na face anterior a articulação do tarso (região com tricotomia pré-cirúrgica). (I) Lesão tumoral localizada na região abdominal. (J) Lesão nodular pedunculada na região inguinal.

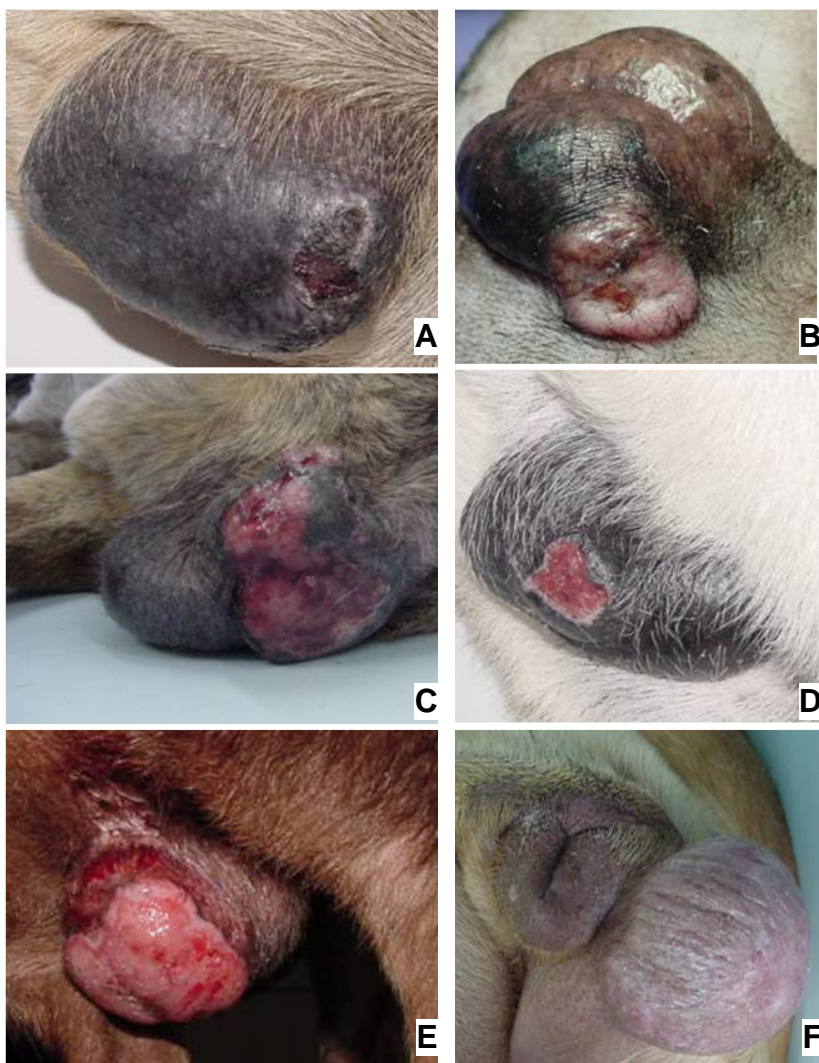


Figura 7 – Aspectos clínicos dos mastocitoma cutâneo canino. (A) Lesão em placa ulcerada localizada no escroto. (B) Lesão em placa ulcerada localizada no escroto. (C) Lesão em placa ulcerada localizada no escroto. (D) Lesão em placa ulcerada localizada no escroto. (E) Lesão em placa ulcerada localizada no escroto. (F) Lesão tumoral perivulvar.

4.2 Graduação Citopatológica

Para a graduação citopatológica foram analisadas 55 amostras, incluindo os mastocitomas únicos (n=30), e múltiplos (n=11 casos; 25 massas tumorais).

A figura 8 apresenta a distribuição dos graus de diferenciação tumoral (bem diferenciado, moderadamente diferenciado e pouco diferenciado) observados nas amostras citológicas.

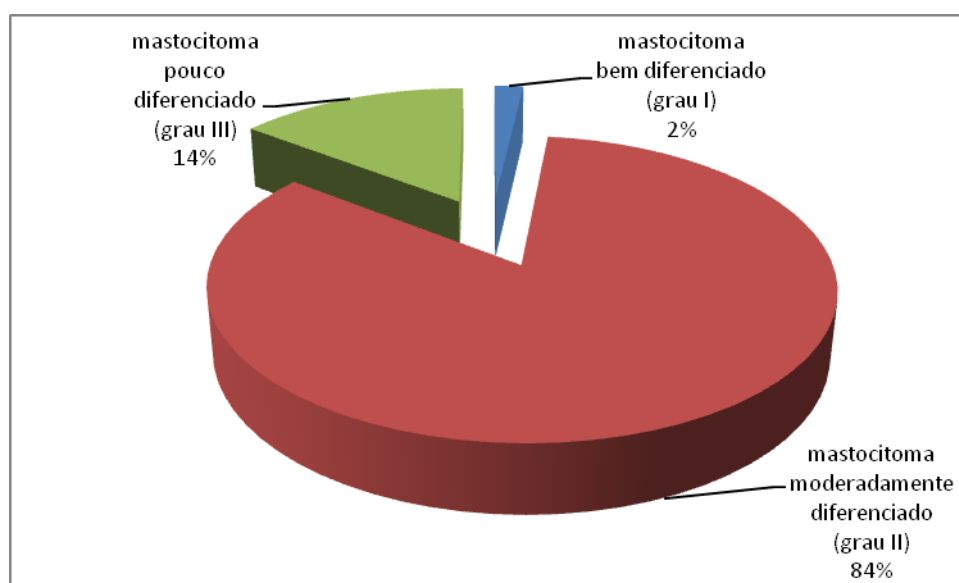


Figura 8 – Distribuição dos mastocitomas cutâneos caninos pela graduação citopatológica (n=55).

Um caso (1/55) (2%) obteve a graduação I, cão da raça boxer, macho de oito anos com lesão papular no tronco, com TED de um a três meses. O esfregaço citológico referente a este caso apresentou pouca celularidade, arranjando-se de forma esparsa e, de fundo, discreta a moderada granulação. As células eram compostas por mastócitos típicos, com núcleo hipercromático e excêntrico. O citoplasma era amplo exibindo grande quantidade de grânulos. A população celular neoplásica era homogênea, acompanhada por eosinófilos, neutrófilos, macrófagos e linfócitos. Fibrócitos, e fibroblastos foram observados

(Figura 9). Não foram observadas figuras de mitose, binucleação e multinucleação.

Mastocitomas moderadamente diferenciados com graduação II compuseram 46 amostras (46/55; 84%). As características citopatológicas encontradas nesta categoria foram:

Celularidade moderada a intensa (Figura 10 - A), anisocitose, com pequenas a grandes células arredondadas ou ovais (Figura 10 - C). Alguns mastócitos neoplásicos apresentavam-se com formato poligonal com bordos citoplasmáticos indistintos. A granulação intracitoplasmática foi intensa em todas as amostras, sendo que os grânulos variavam em seu tamanho e aspecto (Figura 10 - D). Por vezes, eram observados grandes cordões de fibras colágenas (Figura 10 - A e B).

Os núcleos apresentavam-se mais centrais (Figura 10 - D) e a anisocariose era evidente (Figura 10 - D, E e F). O padrão de cromatina variava de grosseiro (Figura 10 - D) a vesicular (Figura 10 - I) com a presença de nucléolos conspícuos (Figura 10 - I e J).

Alguns núcleos apresentavam um ou dois nucléolos grandes e proeminentes (Figura 10 - J). Algumas células volumosas com citoplasma amplo, pouco delimitado e contendo pouca granulação foram observadas (Figura 10 - E e F). Poucas células apresentam núcleos convolutos ou reniformes, grandes, por vezes, com um ou mais nucléolos proeminentes (Figura 10 - D, E e F). A presença de eosinófilos era acentuada nas amostras com mastócitos apresentando intensa granulação ou grânulos atípicos (Figura 10 - F). Fibrócitos foram observados frequentemente, principalmente nas amostras de consistência macia e fibroelástica.

Mastócitos binucleados (Figura 10 - G) foram observada em 47,82% (22/46) das amostras, multinucleação (Figura 10 - H) em 13,04% (6/46) e figuras de mitose em 6,52% (3/46).

Mastocitomas pouco diferenciados com graduação III compuseram oito amostras (14,54%; 8/55). As características citopatológicas encontradas nesta categoria foram:

Celularidade intensa (Figura 11 - A), anisocitose, porém levando em consideração todo o esfregaço citológico, essa diferença de tamanho entre as células foi menos evidente do que no grau II (Figura 11 - A, B, C, D, E e F). A maioria das células apresentava-se discretamente arredondada, no entanto, em cada campo de grande aumento havia células poligonais com núcleo grande e pleomórfico, algumas com citoplasma pouco delimitado (Figura 11 - C, E e F). Os grânulos intracitoplasmáticos foram escassos e atípicos, conferindo ao citoplasma basofilia moderada a intensa (Figura 11 - A, B, C, D, E e F). Muitas células apresentavam citoplasma escasso com relação núcleo-citoplasma próximo de 1 (Figura 11 - D)

Os núcleos apresentavam-se centrais e volumosos (Figura 11 - A, B, C, D, E e F), alguns reniformes. O padrão de cromatina variava de grosseiro a vesicular. Os núcleos com cromatina grosseira apresentavam nucléolos conspícuos, enquanto os núcleos vesiculares apresentavam um ou mais nucléolos proeminentes (Figura 11 - F). Não foram observadas estruturas colagenosas em cordões ao fundo dos esfregaços citológicos.

De um modo geral, a presença de eosinófilos foi menor neste grau, em relação ao grau II.

Binucleação e figuras de mitose (Figura 11 - A, B E D) estavam presentes em todas as amostras (8/8; 100%) e multinucleação em cinco delas (5/8; 62,5%).

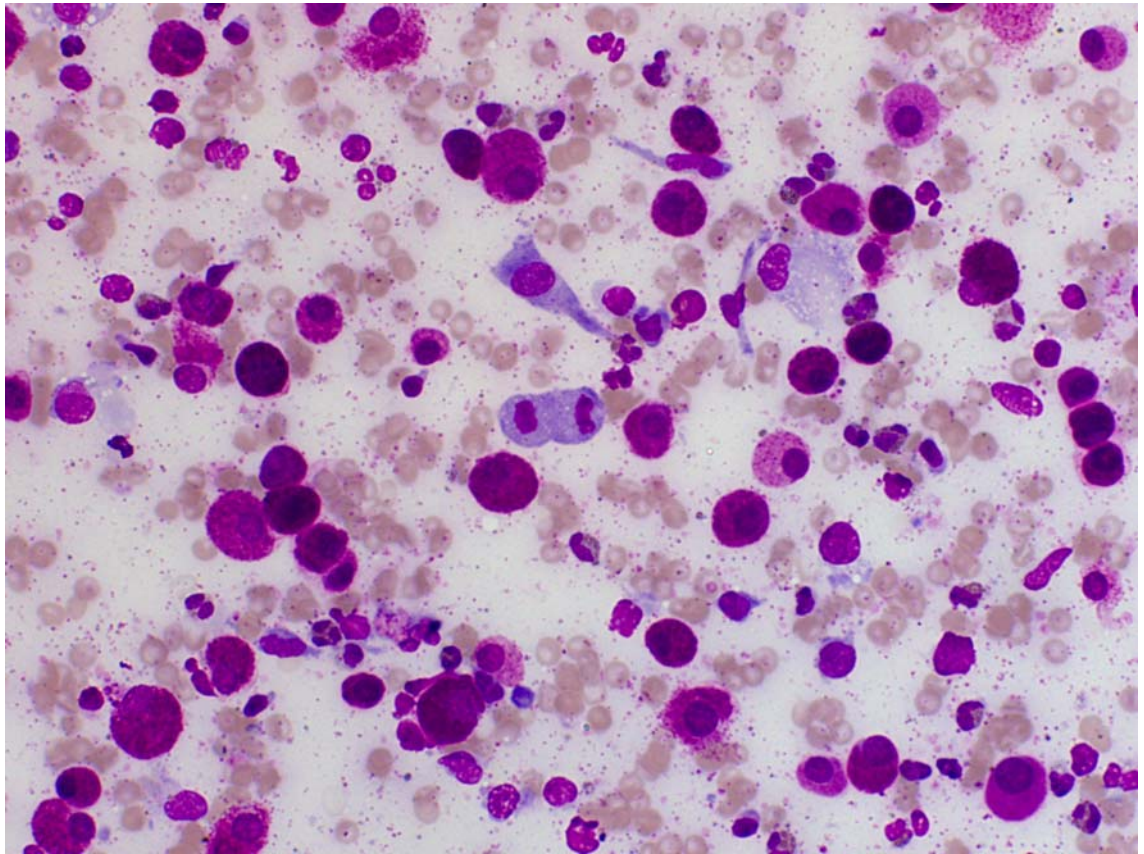


Figura 9 – Mastocitoma cutâneo canino bem diferenciado (grau I). O esfregaço citológico apresenta mastócitos pequenos, apresentando intensa granulação intracitoplasmática típica e núcleo excêntrico. Fibrócitos, eosinófilos, eritrócitos estão presentes no esfregaço. Coloração de Giemsa, 400x.

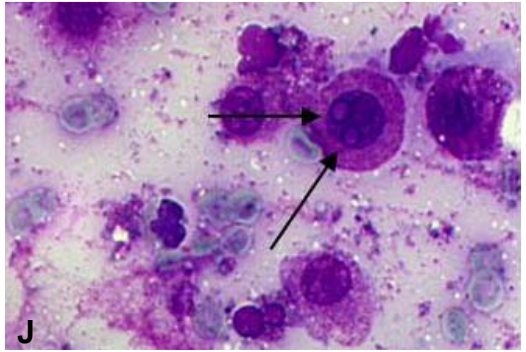
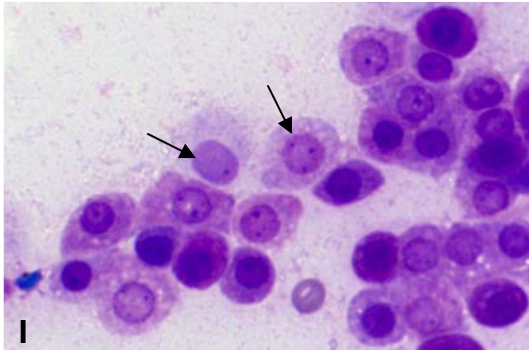
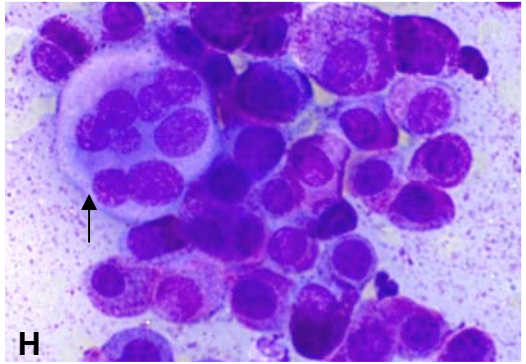
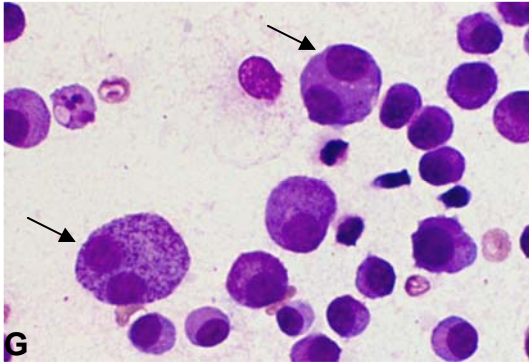
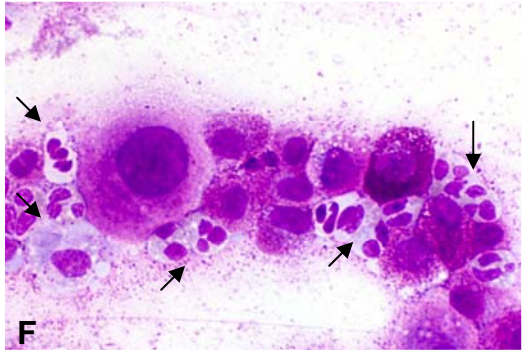
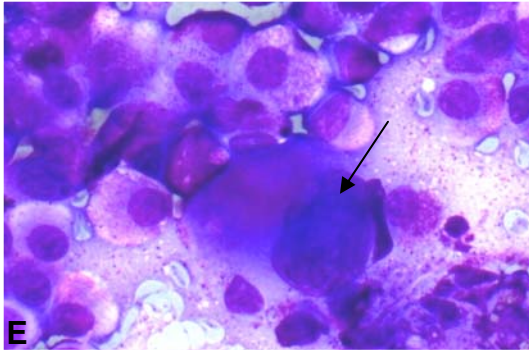
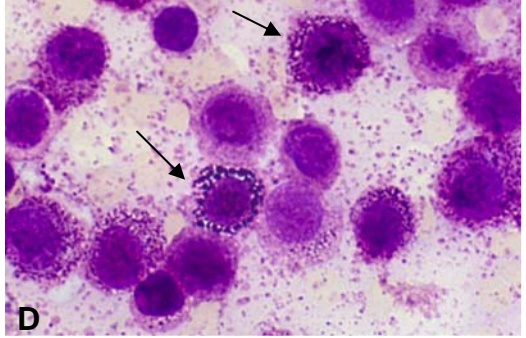
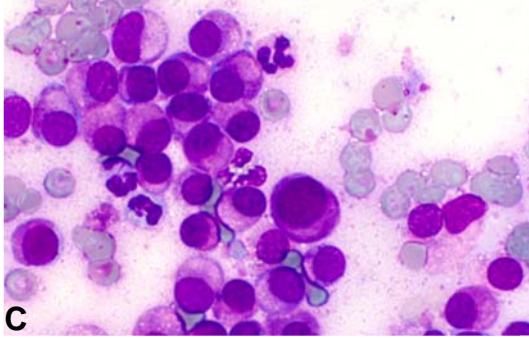
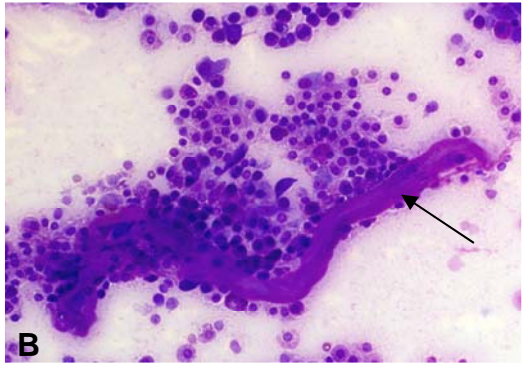
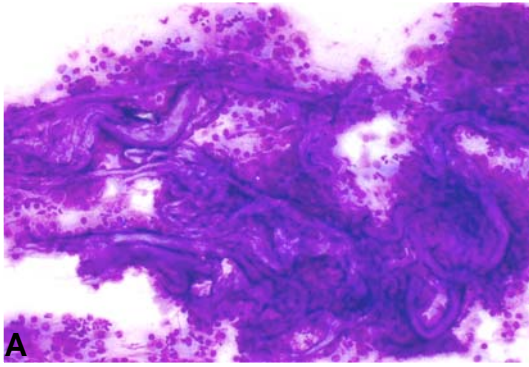


Figura 10 (legendas na página seguinte)

Figura 10 – Características citomorfológicas do mastocitoma cutâneo canino moderadamente diferenciado (grau II) corados por Giemsa.

A – Celularidade intensa ao meio de cordões de fibras colágenas, 100x.

B – Mastócitos neoplásicos próximos a um cordão de fibra colágeno (seta), 100x.

C – Mastócitos neoplásicos apresentando núcleo excêntrico, 400x.

D – Mastócitos neoplásicos arredondados a ovais de diferentes tamanhos (anisocitose), apresentando núcleos de tamanhos variados (anisocariose), 400x.

E – Mastócito com citoplasma volumoso, pouco delimitado contendo núcleo gigante (seta), 400x.

F – Anisocitose e anisocariose, células com intensa granulação e presença de eosinófilos (setas), 400x.

G – Anisocitose, anisocariose e células binucleadas (setas), 400x.

H – Mastócito neoplásico multinucleado (seta), 400x.

I – Mastócitos apresentando núcleos com padrão de cromatina vesicular, contendo um a três nucléolos conspícuos (setas), 400x.

J – Mastócito apresentando núcleo com padrão de cromatina grosseira, contendo dois nucléolos proeminentes (setas), 400x.

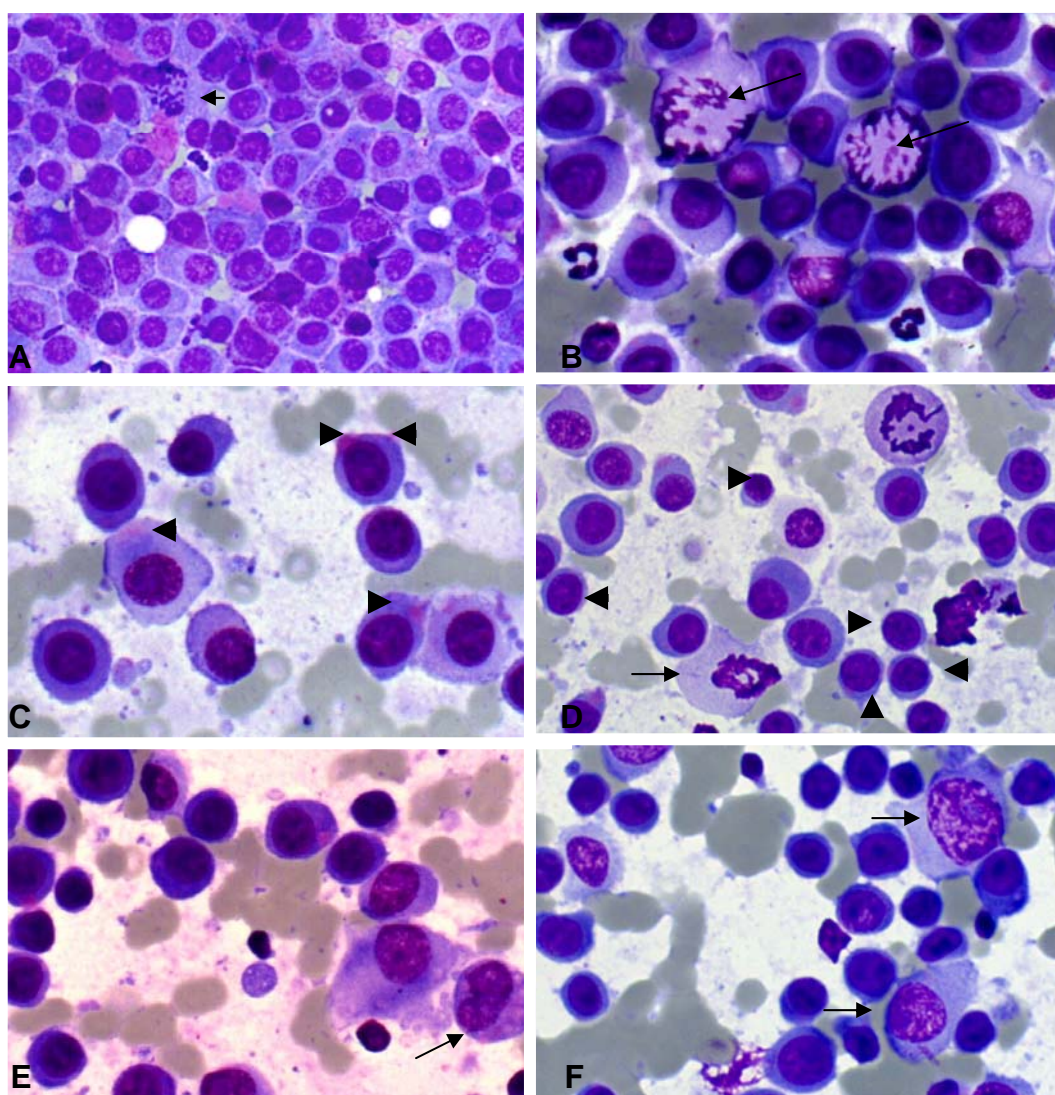


Figura 11 (legendas na página seguinte)

Figura 11 – Características citomorfológicas do mastocitoma cutâneo canino pouco diferenciado (grau III) corados por Giemsa.

A – Celularidade intensa. Mastócitos neoplásicos discretamente arredondados, ovóides e poligonais, 200x.

B – Células com citoplasma escasso e basofílico apresentando núcleos com padrão de cromatina grosseira. Há duas figuras de mitose presentes no esfregaço (setas), 400x.

C – Mastócitos pouco diferenciados apresentando em seus citoplasmas grânulos atípicos (cabeça de seta), 400x.

D – Anisocariose e anisocitose. Células apresentando relação núcleo-citoplasma próxima de 1 (cabeça de seta). Há duas figuras de mitose presentes no esfregaço (setas), 400x.

E – Mastócito apresentando núcleo riniforme (seta), 400x.

F – Mastócitos com citoplasma amplo pouco delimitado, apresentando grandes núcleos centrais vesiculosos (setas), 400x.

A média do número de figuras de mitose foi maior nos mastocitomas grau III (14) do que nos mastocitomas grau II (0,14), havendo diferença estatística ($p < 0,0005$). Nos mastocitomas grau II foram observadas duas figuras de mitoses em um caso e uma figura de mitose em outros dois casos. Nos mastocitomas grau III foram observadas de uma a 45 figuras de mitose.

Também foi observado diferença estatística na média do número de binucleações entre os graus II e III. No grau II o número de binucleações variou de zero a 22 células binucleadas na amostras analisadas e no grau III de zero a 47. Multinucleação não apresentou diferença estatística significativa entre os graus II e III (Tabela 7)

Tabela 7 – Média, desvios padrão, valores mínimo e máximo do número de figuras de mitoses, binucleações e multinucleações dos mastocitomas grau II e III avaliados por CAAF, corados por Giemsa (n=54). FMVZ/UNESP, Botucatu, 2008.

	mitose	binucleação	multinucleação
grau II (n=46)			
média	0,14 _A	3,08 _A	0,56 _A
desvio padrão	0,54	5,66	1,86
mínimo	0	0	0
máximo	3	22	9
grau III (n=8)			
média	14 _B	17,37 _B	3 _A
desvio padrão	16,14	16,44	4,3
mínimo	1	3	0
máximo	45	47	13

Teste estatístico: Mann Whitney

Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna, indicam diferença estatística significativa ($p < 0,0005$).

Quanto ao número de figuras de mitose no grau II a moda foi zero, ou seja, a maioria dos casos não apresentou figuras de mitose (43/46; 93,47%).

Quanto ao número de binucleação dos tumores grau II, a moda também foi zero (24/46; 52,17%). O mesmo ocorreu com as multinucleações no grau II (40/46; 86,95%).

O mastocitoma grau I não fez parte das comparações estatísticas por representar um caso (1/55, 2%).

4.3 Morfometria

Foram analisados 2768 núcleos e limites citoplasmáticos de 17 mastocitomas grau II e 969 núcleos e limites citoplasmáticos de seis mastocitomas grau III.

A área citoplasmática variou de 95,61 μm^2 a 267,35 μm^2 nos mastocitomas grau II e de 87,13 μm^2 a 221,36 μm^2 nos tumores grau III. A média da área citoplasmática do grau III (137,83 μm^2) foi menor em relação ao grau II (185,84 μm^2) (Tabela 8), sem apresentar diferença estatística ($p > 0,05$).

O perímetro citoplasmático também não apresentou diferença estatística entre os graus II e III, variando entre 80,07 e 110,99 μm no grau II e 73,96 e 102,36 μm no grau III. Nota-se que tanto a área quanto o perímetro citoplasmático foram maiores nas neoplasias moderadamente diferenciadas e que estas células eram menos esféricas do que os mastócitos neoplásicos de tumores pouco diferenciados (fator de circunferência citoplasmático 1,61 nos tumores grau II e 1,12 nos grau III) (Tabela 8).

A área nuclear variou de 53,64 μm^2 a 110,52 μm^2 nos mastocitomas grau II e de 52,39 μm^2 a 94,82 μm^2 nos tumores grau III. A média da área

nuclear do grau III (78,41 μm^2) foi maior em relação ao grau II (70,57 μm^2) (Tabela 9), sem diferença estatística ($p>0,05$).

O perímetro nuclear também não apresentou diferença estatística entre os graus II e III, variando entre 27,86 e 40,11 μm no grau II e 27,202 e 37,235 μm no grau III (Tabela 9).

Os núcleos de ambos os graus tiveram valores de fator de circunferência próximos a 1 (Tabela 9), o que indicam que se aproximavam de uma circunferência perfeita. Vale ressaltar que foram excluídas as células bi e multinucleadas, que desviariam a forma nuclear de uma circunferência perfeita.

Tabela 8 - Média, desvios padrão (SD) padrão, valores mínimo e máximo dos parâmetros morfométricos citoplasmáticos dos mastocitomas caninos, diagnosticados por CAAF e corados por Giemsa (n= 23, 17 MCT grau II e 6 MCT grau III). FMVZ/UNESP, Botucatu, 2008.

	área (μm^2)	perímetro (μm)	fator de circunferência
grau II			
média \pm SD	185.84 \pm 54.40 ^A	61.91 \pm 7.34 ^A	1.61 \pm 0.04 ^A
mínimo	95.618	80.071	3.032
máximo	267.356	110.995	5.401
n=17 casos, 2768 células			
grau III			
média \pm SD	137.83 \pm 63.46 ^A	56.05 \pm 9.49 ^A	1.12 \pm 0.03 ^A
mínimo	87.136	73.965	3.597
máximo	221.360	102.362	7.076
n=6 casos, 969 células			

Testes estatísticos: T-test (fator de circunferência) e Mann Whitney, significância $p<0,05$
 Letras maiúsculas iguais na mesma coluna indicam que não houve diferença estatística entre os graus

Tabela 9 - Média, desvios padrão (SD), valores mínimo e máximo dos parâmetros morfométricos nucleares dos mastocitomas caninos, diagnosticados por CAAF e corados por Giemsa (n= 23, 17 MCT grau II e 6 MCT grau III). FMVZ/UNESP, Botucatu, 2008.

	área (μm^2)	perímetro (μm)	fator de circunferência
grau II			
média \pm SD	70.57 \pm 14.54 ^A	32.15 \pm 3.18 ^A	1.11 \pm 0.02 ^A
mínimo	53.644	27.866	1.087
máximo	110.523	40.115	1.177
n=17 casos, 2768 núcleos			
grau III			
média \pm SD	78.41 \pm 14.95 ^A	33.55 \pm 3.56 ^A	1.10 \pm 0.01 ^A
mínimo	52.396	27.202	1.094
máximo	94.826	37.235	1.118
n=6 casos, 969 núcleos			

Testes estatísticos: T-test (fator de circunferência) e Mann Whitney, significância $p < 0,05$
 Letras maiúsculas iguais na mesma coluna indicam que não houve diferença estatística entre os graus

Os mastocitomas grau II obtiveram uma média na relação núcleo-citoplasma (N/C) de 0,28 e os mastocitomas grau III média de 0,38, sendo estatisticamente significativa esta diferença (Tabela 10).

Tabela 10 - Valores médios, desvios padrão, valores mínimo e máximo da relação da área nuclear com a área citoplasmática (N/C) dos mastocitomas cutâneos caninos, diagnosticados por CAAF e corados por Giemsa (n= 23). FMVZ/UNESP, Botucatu, 2008.

grau II	N/C
média	0,28 ^A
desvio padrão	0,06
mínimo	0,19
máximo	0,41
n=17 casos, 2768 células	
grau III	N/C
média	0,38 ^B
desvio padrão	0,10
mínimo	0,25
máximo	0,51
n=6 casos, 969 células	
<small>Teste T não pareado (p=0,0198). Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna demonstram diferença estatística entre os graus.</small>	

O perímetro e a área nuclear se correlacionaram com o fator de circunferência nuclear nos mastocitomas grau III (p=0,06), o que não foi observado no grau II.

4.4 Imunocitoquímica

Foi realizado a imunocitoquímica em 35 mastocitomas (35/55; 61,81%), empregando os anticorpos primários anti-CD117 (21 animais; n=35 massas tumorais), anti-Ki-67, clone MIB-1 (16 animais; n=21 massas tumorais) e anti-caspase-3 clivada (7 animais; n=10 massas tumorais).

4.4.1 CD117

Dentre os 35 mastocitomas submetidos a imunocitoquímica, todos obtiveram imunomarcção positiva para o CD117, conferindo a identificação do receptor para *c-kit*, presentes nos mastócitos. As células positivas apresentaram uma forte marcação de membrana citoplasmática, citoplasma e citoplasmática focal em todas as amostras (Figura 12).

A reação imunocitoquímica auxiliou na confirmação diagnóstica dos tumores menos diferenciados (grau III) com ausência de granulações citoplasmáticas, pela diferenciação de outras neoplasias de células redondas.

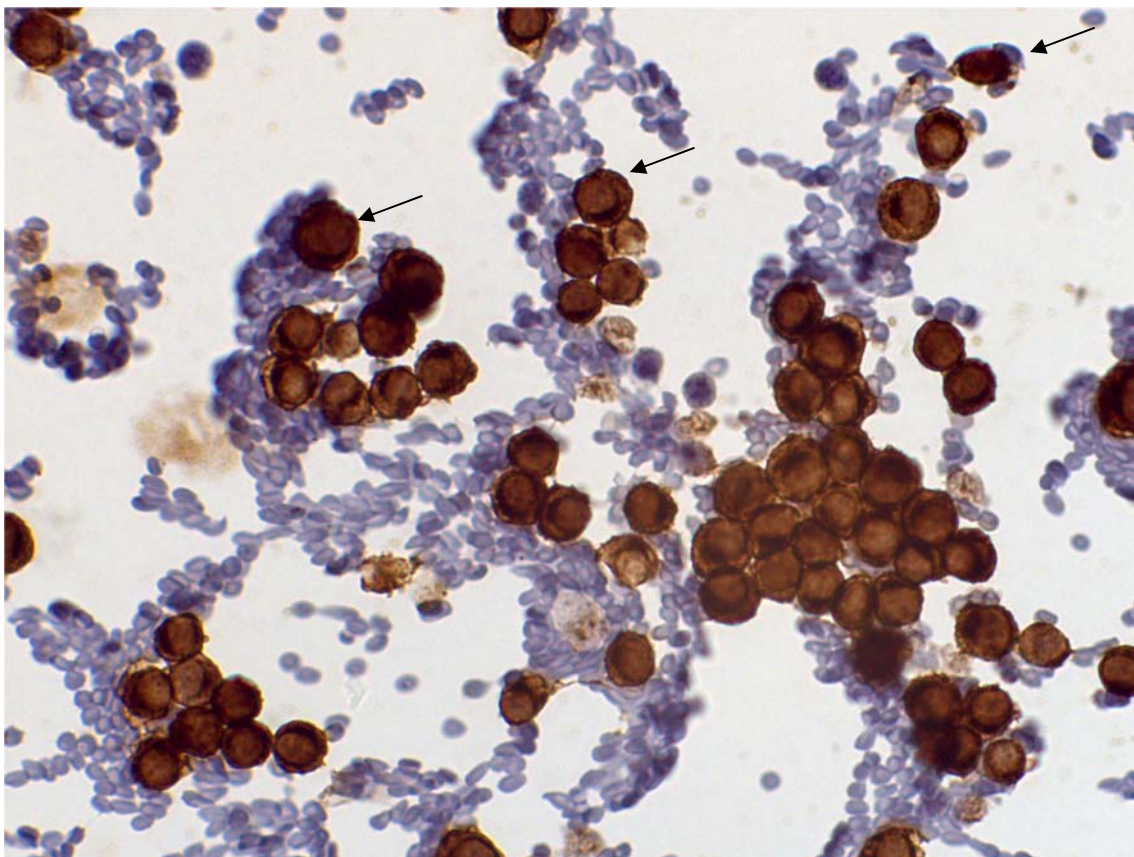


Figura 12 - Mastocitoma cutâneo canino, grau III. Imunocitoquímica. Imunomarcção positiva de mastócitos neoplásicos para c-Kit (CD117) (setas). EnVision, DAB, contra coloração Hematoxilina, objetiva de 40x.

4.4.2 Índices proliferativo (Ki-67) e apoptótico (caspase-3)

A média do número de células positivas para o anticorpo Ki-67, clone MIB-1 (Figura 13) foi maior nos mastocitomas grau III (33,89%) do que nos mastocitomas grau II (9,36%), havendo diferença estatística ($p=0,0082$). A imunomarcção positiva para o grau II variou de zero a 47% e para o grau III de 16 a 76%.

A média do percentual de positividade (citoplasmática e nuclear) para caspase-3 (Figura 14) foi de 5,51% nos tumores grau II e 2,09% nos grau III, sem apresentar diferença estatística (Tabela 11) entre elas.

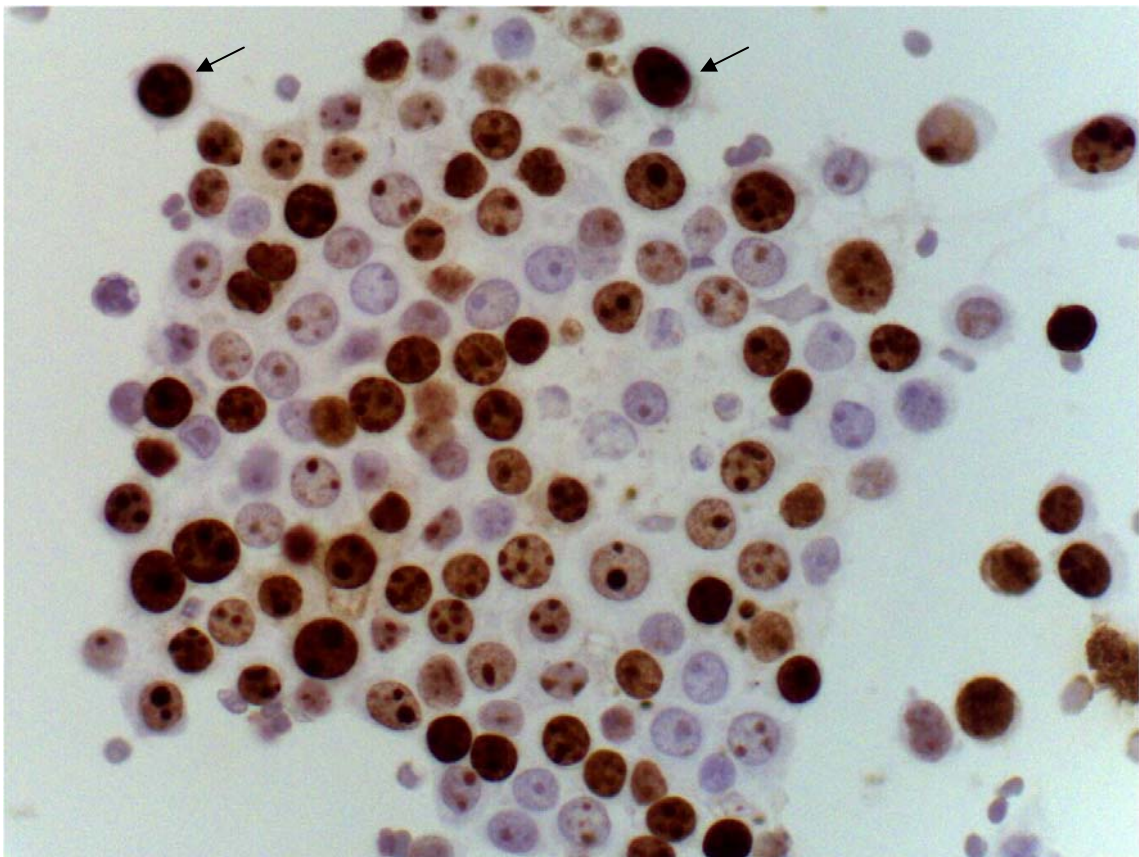


Figura 13 - Mastocitoma cutâneo canino, grau III. Imunocitoquímica. Imunomarcção positiva nuclear de mastócitos neoplásicos para ki-67, clone MIB1 (setas). EnVision, DAB, contra coloração Hematoxilina, objetiva de 40x.

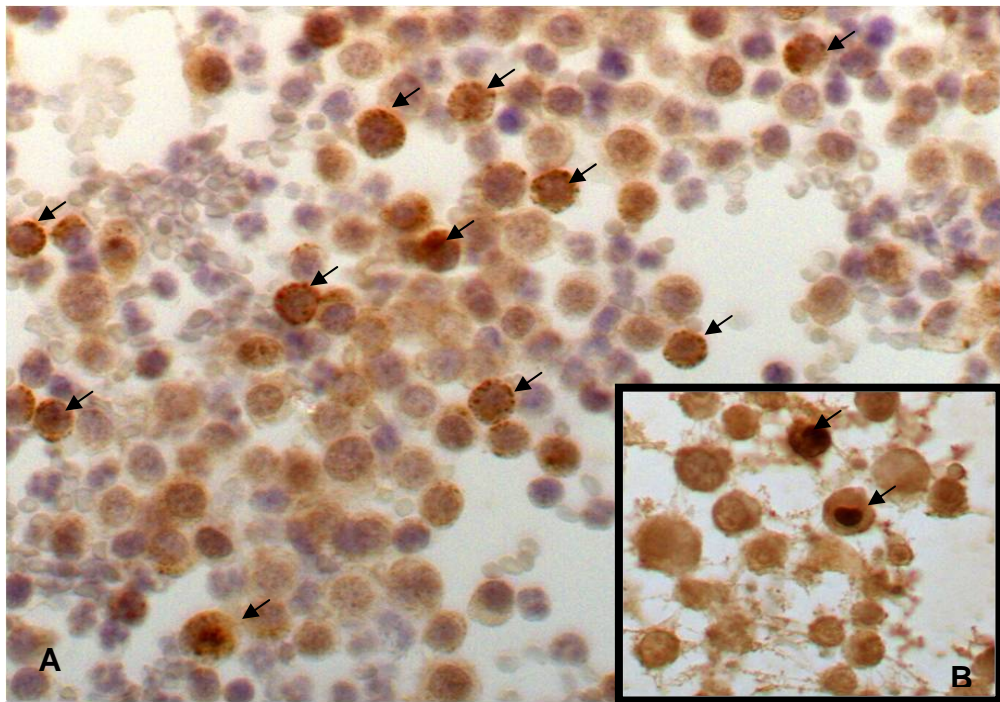


Figura 14 - Mastocitoma cutâneo canino grau II. Imunocitoquímica. Imunomarcção positiva de mastócito para caspase-3. Na figura maior (A) observa-se marcação citoplasmática puntiforme (setas), na figura menor (B) a marcação é nuclear (setas). EnVision, DAB, contra coloração Hematoxilina, (objetiva de 40x).

Tabela 11 - Médias, desvios padrão, valores mínimo e máximo do percentual de positividade para os anticorpos primários anti- Ki-67 (clone MIB1) e anti-caspase-3, dos mastocitomas caninos cutâneos diagnosticados pela CAAF, imunocitoquímica, MCT graus II e III. FMVZ/UNESP, Botucatu, 2008.

	Ki-67 (MIB-1) (%) Índice de proliferação	caspase 3 (%) Índice apoptótico
grau II (n=4)		
média	9,36 _A	5,51 _A
desvio padrão	12,44	9,88
mínimo	0	0
máximo	47	27
numero de amostras	16	7
grau III (n=3)		
média	33,89 _B	2,09 _A
desvio padrão	24,96	1,74
mínimo	16	1
máximo	76	4
número de amostras	5	3

Teste estatístico: Mann Whitney

Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna, indicam diferença estatística significativa ($p < 0,0005$).

4.5 Correlação entre a imunomarcção do Ki-67, caspase-3, número de figuras de mitose, binucleação e multinucleação

Nos mastocitomas grau II houve correlação positiva entre o índice de proliferação celular (imunomarcção pelo Ki-67) e o número de figuras de mitose, avaliadas pelo exame citopatológico ($p < 0,001$), bem como com o número de células bi e multinucleadas ($p < 0,01$).

Para este mesmo grau de diferenciação, o índice apoptótico avaliado pela imunomarcção com caspase 3 não se correlacionou com o índice proliferativo, mas com o número de figuras de mitose ($p < 0,01$) e este último

apresentou correlação positiva com o número de células binucleadas, ou seja, ambos tendem a aumentar em conjunto.

Nos mastocitomas grau III foi observado correlação positiva significativa entre o número de figuras de mitose, binucleações e multinucleações ($p < 0,01$).

5. DISCUSSÃO

A incidência do mastocitoma em machos foi 44% (18/41) e em fêmeas 56% (23/41), corroborando com relatos da literatura, que afirmam não haver predileção por sexo (GOLDSCHMIDT e SHOFRER, 1992; LONDON e SEGUIN, 2003; THAMM e VAIL, 2007).

No que se refere a idade dos animais, 36,58% deles encontra-se na faixa entre 8 e 9 anos de idade (15/41 cães), com idade média de 8,5 anos, o que está de acordo com os dados de literatura americana (PATNAIK, et al., 1984), europeia (BOSTOCK, 1973) e nacional (FURLANI et al., 2008).

Embora a idade não seja um fator decisivo para o desenvolvimento de neoplasias, a alta prevalência dos mastocitomas no cão parece estar correlacionada com a maior longevidade dos animais (THAMM e VAIL, 2007). Assim, os cães idosos estão mais expostos a carcinógenos, possuem sistema imune debilitado, inerente aos indivíduos idosos, e podem estar sujeitos a maior acúmulo de mutações de origem genética no ciclo celular, possibilitando assim o desenvolvimento do câncer (THAMM e VAIL, 2007).

Estudos referem que o cão da raça boxer é predisposto ao mastocitoma (BOSTOCK, 1973; PATNAIK et al., 1984; GOLDSCHMIDT e SHOFRER, 1992), porém a causa de tal associação permanece desconhecida (THAMM e VAIL, 2007). Neste estudo houve maior incidência de mastocitomas na raça boxer (39,02%), seguido pelos cães mestiços sem raça definida (24,39%), sendo estes predominantes em nossa casuística hospitalar.

Ao analisarmos somente as raças definidas, foi observada uma evidente frequência de acometimento do boxer (52%) em relação as outras raças, como

o poodle, pit bull, pinscher, rottweiler, terrier brasileiro, labrador, pastor alemão e cocker spaniel americano.

Em quinze casos (36,58%; 15/41) foi obtido o tempo de evolução dos mastocitomas até o momento do diagnóstico (TED), sendo que esta variou de um mês a acima de 12 meses. O único caso referido com TED entre um a três meses foi de um boxer com mastocitoma bem diferenciado (grau I).

Dez casos foram referidos com TED entre três a seis meses, sendo oito cães com mastocitomas grau II e dois com mastocitoma grau III. Três casos com TED de seis a 12 meses, todos com graduação II e um caso com TED acima de 12 meses, tendo este cão um tumor grau III.

A dificuldade de assinalar este parâmetro deveu-se aos proprietários ou condutores do animal em não saberem precisar o surgimento do tumor, principalmente naqueles casos onde havia mais de um tumor cutâneo.

Bostock (1973) referiu que os boxers podem apresentar as massas cutâneas por longo período, permanecendo estes tumores bem diferenciados. Quanto aos boxers deste estudo, tal característica não foi observada, pois dois animais desta raça (12,5%) apresentaram mastocitomas pouco diferenciados (grau III) com seis a 12 meses de evolução. Como somente um caso foi apresentado com evolução acima de 12 meses, não foi possível associar o tempo de evolução do tumor com sua diferenciação celular.

Dos 41 cães avaliados, 11 apresentaram acometimento de múltiplas regiões (26,82%; 11/41). Nestes casos as massas tumorais eram distantes dez cm da reportada como primária, para evitar que se tratasse de lesões "satélites", de acordo com o sugerido por Murphy et al. (2006).

A percentagem de múltiplas massas tumorais observada neste estudo (26,82%) está acima da descrita na literatura americana, de 9% a 14%, (THAMM e VAIL, 2001; MULLINS et al., 2006) e europeia 21% (MURPHY et al., 2006), no entanto, é próxima dos 25% observados em estudo retrospectivo nacional de Furlani et al. (2008).

O maior índice de mastocitomas múltiplos observados neste estudo é diferente da literatura internacional consultada, talvez pelo encaminhamento tardio dos animais ao atendimento médico veterinário em nosso país, possibilitando o surgimento de novas massas tumorais.

Porém, este aspecto é pouco descrito na literatura, devendo-se levar em consideração outros fatores como a raça do animal, estado imunológico, manutenção do estímulo carcinogênico, entre outros.

Das 55 massas tumorais, incluindo-se todos os mastocitomas únicos e múltiplos, 23 (41,81%; 23/55) ocorreram na região do tronco (regiões torácica, abdominal e lombar), 16 (29,09%; 16/55) nos membros, sendo os membros posteriores mais acometidos (93,75%; 15/16), seis (10,90%; 6/55) na região escrotal, quatro (7,27%; 4/55) na região inguinal, dois (63%; 2/55) na região vulvar e cabeça e um (1,81%) na região perianal e cervical.

Tais achados foram similares aos descritos na literatura americana e europeia (BOSTOCK, 1973; GOLDSCHMIDT e SHOFER, 1992; TURREL et al., 1988; SEGUIN et al. 2001; KIUPEL et al., 2005; MURPHY et al. 2006; MULLINS et al., 2006, THAMM e VAIL, 2007) e nacional (FURLANI et al. 2008).

Quanto a elevada frequência de acometimento da região escrotal (10,9%), não foi encontrado similaridade na literatura estrangeira e,

provavelmente, isto se deve ao fato da maioria dos animais avaliados naqueles trabalhos serem castrados e com isso a pele nessa região ser menos exposta aos fatores que induzem ao processo carcinogênico.

Foram observadas pápulas, placas, nódulos e tumores, com consistência à palpação firme, macia e fibroelástica. Esta variação no aspecto das lesões cutâneas faz com que os mastocitomas sejam sempre considerados um potencial diagnóstico diferencial para todas as neoplasias cutâneas (THAMM e VAIL, 2007).

Em oito lesões (17,39%; 8/46) ocorreram ulcerações, sendo duas na região torácica e, as demais, em bolsa escrotal. Nos tumores escrotais foi referida pelos proprietários lambadura constante, o que pode ter corroborado com o surgimento das úlceras.

Nas massas torácicas ulceradas, uma de aspecto papular e outra nodular, a categorização citopatológica foi pouco diferenciada (grau III) e com elevado índice mitótico (nove figuras de mitose por cga e quatro figuras de mitose por cga, respectivamente), o que corrobora com o crescimento rápido da massa e maior probabilidade de necrose, com conseqüente ulceração do tumor. Thamm e Vail (2007) referem que as ulcerações são mais observadas nos tumores mais agressivos.

Oito casos (19,51%) foram submetidos ao exame histopatológico, posterior à excisão cirúrgica da massa tumoral como única modalidade de tratamento ou por biópsia incisional, para confirmar o diagnóstico de mastocitoma e realizar a graduação histopatológica. Segundo Thamm e Vail (2007), tal procedimento é fundamental para o delineamento do tratamento dos mastocitomas.

Em nossa rotina hospitalar, poucos são os casos confirmados pela histopatologia. Provavelmente, isto se deva a falta de indicação enfática do cirurgião-clínico responsável pelo caso, por determinar que o resultado citopatológico satisfaça ou por ter o retorno do resultado histopatológico após longo período, atrasando as condutas terapêuticas adjuvantes.

Nos tumores em que foi possível realizar a correlação do diagnóstico citológico e histopatológico, 100% dos casos (8/8) obtiveram a mesma graduação. Ghisleni et al. (2006) descreveram uma concordância de 97,9% entre o diagnóstico citopatológico e histopatológico, em diversos tumores cutâneos de cães e gatos. Porém, neste estudo não foram abordadas comparações quanto a graduação desses tumores.

Os critérios adotados pelo Serviço de Patologia Veterinária da FMVZ-UNESP, Botucatu, para a classificação histopatológica dos mastocitomas, seguiram o sistema de graduação de Patnaik e foi realizado pelo patologista responsável pelo caso recebido na rotina, sem que o mesmo soubesse do resultado do exame citológico realizado anteriormente.

Quarenta e seis tumores (83,63%; 46/55) obtiveram graduação citopatológica II e oito (14,54%; 8/55) grau III. A proporção entre os graus nos diversos estudos dos mastocitomas é variável, dependendo, principalmente do número de cães avaliados e método histopatológico utilizado para a graduação (BOSTOCK, 1973; PATANIK et al., 1984; BOSTOCK et al., 1989; MURPHY et al., 2004; NORTHROP et al., 2005 a e b)

Os mastocitomas moderadamente diferenciados (grau II) apresentaram população heterogênea e, diferentemente, do descrito por Patnaik et al. (1984) para histopatologia, os critérios de anisocitose e anisocariose não foram

discretos e sim acentuados. Isto provavelmente, se deva aos critérios celulares de malignidade serem mais evidenciados no exame citopatológico do que no histopatológico (RASKIN e MEYER, 2001).

Nas amostras citopatológicas observou-se intensa granulação em todos casos grau II, diferentemente do descrito na histopatologia, na qual os tumores moderadamente diferenciados apresentam moderada granulação (BOSTOCK, 1973; PATNAIK et al., 1984; GOLDSCHMIDT e SHOFER, 1992; GROSS et al., 2005). Tal observação deve ser creditada aos grânulos serem mais evidenciados em colorações do tipo Romanowsky do que na tradicional Hematoxilina e Eosina, utilizadas nos cortes histológicos (RASKIN e MEYER, 2001).

Nestas amostras, a distribuição dos grânulos não foi uniforme em todas as células do esfregaço, sendo que alguns mastócitos apresentavam grânulos grandes e desproporcionais (atípicos), esparsamente distribuídos no citoplasma, segundo Sueiro et al. (2002), que observaram ultra-estruturalmente diferenças na morfologia dos grânulos de acordo com o grau de anaplasia dos mastocitomas, sendo estes mais atípicos nos mastocitomas graus II e III.

Um dos critérios de anaplasia nos mastocitomas, tanto no exame citopatológico como histopatológico, a diminuição ou ausência de granulação (BOSTOCK, 1973; PATNAIK et al., 1984; GOLDSCHMIDT e SHOFER, 1992; RASKIN e MEYER, 2001; GROSS et al., 2005) foi observada nos esfregaços das amostras grau III.

Cordões de fibras colágenas foram frequentemente observados nos tumores grau II, especialmente naqueles com consistência macia e fibroelástica. Mastócitos típicos e atípicos, juntamente com eosinófilos e outras

células inflamatórias, surgiam aderidos a estas estruturas colágenas, dificultando nesses esfregaços a análise morfométrica das células neoplásicas.

Tais estruturas são referidas na histopatologia como figuras em chama, que têm sua patogenia incerta, podendo ter origem na degeneração do colágeno, em conseqüência à liberação de substâncias proteolíticas pelos eosinófilos, ou representarem uma afinidade tintorial à presença dos eosinófilos e suas substâncias degranuladas (FAIRLEY, 1991; GROSS et al., 2005).

Os cordões de fibras colágenas não foram observados nas amostras grau III, talvez pelo estroma nesses tumores ser escasso, como descrito por Patnaik et al. (1984), Goldschmidt e Shofer, (1992) e Gross et al. (2005).

Este achado corrobora também com a ulceração observada em alguns tumores grau III e com elevado índice mitótico, uma vez que podemos inferir que as células neoplásicas se proliferaram independente do estroma de sustentação, e por isso, ocorre necrose.

Binucleação ocorreu em aproximadamente metade (47,82%) (22/46) das amostras grau II e multinucleação em 13,04% (6/46). Este percentual foi menor do que o encontrado no grau III, no qual binucleações ocorreram em todos os casos (100%; 8/8) e multinucleação em 62,5% deles (5/8). Os critérios de graduação histopatológica propostos, não fornecem números específicos de células binucleadas e multinucleadas, apenas referem ser mais frequentes nos mastocitomas pouco diferenciados e ausentes nos mastocitomas bem diferenciados (BOSTOCK, 1973; PATNAIK et al., 1984; GOLDSCHMIDT e SHOFER, 1992; GROSS et al., 2005).

Células neoplásicas com múltiplos núcleos, de vários tamanhos, frequentemente observadas nos esfregaços citológicos grau III, podem

representar evidência de divisão anormal com desigual distribuição de cromatina nuclear, sendo considerado um critério de malignidade (RODILLA, et al., 1993).

A presença de figuras de mitose foi maior nas amostras de grau III, indicando o elevado índice de proliferação nesta categoria. Romanski et al. (2007) demonstraram que a contagem de figuras de mitose, em amostras histopatológicas é um indicador prognóstico para os mastocitomas.

Os dados referentes ao número de figuras de mitose, células binucleadas e multinucleadas, observados em esfregaços citológicos obtidos pela CAAF, são inéditos na literatura consultada e podem contribuir para um estadiamento patológico mais acurado dos mastocitomas cutâneos. Esta contagem em esfregaços citológicos, corados convencionalmente, é simples, não sendo laborioso como a avaliação morfométrica e não exige equipamentos sofisticados e de alto valor como, por exemplo, é necessário para os procedimentos imunoistoquímicos.

Estes critérios quantitativos, relacionados à binucleação, multinucleação e figuras de mitose fornecidos pela citopatologia podem corroborar para uma graduação mais objetiva dos mastocitomas no exame citopatológico, uma vez que houve diferença estatística entre o número de figuras de mitose e células binucleadas entre os tumores grau II e III.

Ressaltamos que este tipo de quantificação é executada em esfregaços citológicos, corados por Romanovsky, o que torna seu uso na rotina exequível de baixo custo e com rápidos resultados.

Não foi observada correlação entre a localização anatômica dos mastocitomas com o número de figuras de mitose, binucleações e

multinucleações, talvez pelo pequeno número de amostras quando subdividíamos os tumores por região anatômica. O mesmo ocorreu quando foram correlacionados estes parâmetros com mastocitomas únicos e múltiplos.

Para o estudo morfométrico foram analisados 17 tumores grau II e seis tumores grau III, na qual os esfregaços citológicos se adequaram para a análise morfométrica.

O caso de mastocitoma grau I foi excluído, pois não era possível delimitar as bordas citoplasmáticas e nucleares dos mastócitos neoplásicos para a análise morfométrica, bem como por este representar apenas um caso.

Foi analisado o total de 2768 células no grau II e 969 no grau III, na qual a área citoplasmática variou amplamente nos dois graus. Esta variação pode ser explicada pelo acentuado pleomorfismo celular e pela presença de células gigantes nos dois graus (BOSTOCK 1973; PATANAIK et al, 1984).

Como observado na avaliação citopatológica dos esfregaços corados pelo Giemsa, a maioria da população celular no grau III era composta de mastócitos mais arredondados e menores em relação ao grau II, e que apresentavam pouco citoplasma.

Porém, os resultados não demonstraram diferenças estatísticas entre os graus II e III, quanto aos parâmetros morfométricos citoplasmáticos.

Não houve correlação significativa entre a área e o perímetro nuclear entre os graus II e III. Isto implica que nos tumores grau III o tamanho do núcleo não é estatisticamente maior do que os de grau II, como foi observado por Strefezzi et al. (2003), em amostras citopatológicas.

Maiolino et al. (2005) observaram diferença estatística de área e perímetro nuclear em amostras histopatológicas de mastocitomas entre os

graus I e III e II e III, não havendo diferença entre os graus I e II. Em nosso estudo não foi possível a comparação entre os graus I e II, por haver apenas um cão com mastocitoma bem diferenciado.

O fator de circunferência nuclear e citoplasmático foi mais próximo de um nos mastocitomas grau III, porém não houve diferença estatística entre os graus II e III, não sendo possível afirmar numericamente que os mastócitos neoplásicos no grau III são mais arredondados. Maiolino et al. (2005) não observaram correlação entre o fator de circunferência e os graus histopatológicos, sugerindo que o núcleo nos diferentes graus é morfologicamente similar, quando avaliados pela morfometria.

Strefezzi et al. (2003) demonstraram que os valores da área e do perímetro nuclear foram estatisticamente diferentes entre os graus II e III, em amostras citopatológicas fixadas em álcool e, posteriormente coradas pela hematoxilina e eosina e, entre os graus I e III em amostras coradas pelo panótico, porém os parâmetros morfométricos se sobrepuseram em todos os graus e não houve diferença estatística entre os graus I e II. Demonstraram também que a regularidade entre o eixo maior e menor dos núcleos e o fator de circunferência não apresentaram diferenças estatísticas entre os diferentes graus do mastocitoma. Estes autores não utilizaram parâmetros citoplasmáticos, referindo ser difícil a visualização de bordas citoplasmáticas no exame citopatológico pela presença dos grânulos. Nosso estudo não se deparou com tal dificuldade na maioria das amostras citológicas dos mastocitomas grau II e grau III, sendo viável com a nossa metodologia determinar parâmetros morfométricos citoplasmáticos.

No que se refere a relação núcleo-citoplasma entre estes graus II e III (0,28 e 0,38, respectivamente), houve diferença estatística corroborando com a maior relação núcleo-citoplasma observada por Bostock (1973) nos mastocitomas pouco diferenciados.

O maior valor da relação núcleo citoplasma nos tumores grau III é devido a maior área nuclear média e menor área citoplasmática média observada nesse tumores. Ou seja, apesar desta categoria apresentar células neoplásicas com citoplasma de menor área que os moderadamente diferenciados, seus núcleos são mais volumosos e por isso a relação N/C maior.

A grande sobreposição dos valores morfométricos e falta de diferença estatística entre eles, limitam o auxílio destes na graduação citopatológica nos mastocitomas, corados pelo Giemsa. No entanto, ressaltamos que a relação núcleo citoplasma deva ser levada em consideração na graduação citopatológica, mesmo que não possamos sugerir valores de variação para cada grau, já que eles se sobrepõem.

Foi realizado a imunocitoquímica em 35 mastocitomas (35/55; 61,81%), na qual foi empregado os anticorpos primários anti-CD117 (*c-kit*) (100%), anti-Ki-67, clone MIB-1, em 16 animais (n=21 massas tumorais) e anti-caspase-3 clivada em sete animais (n=10 massas tumorais).

A imunomarcção para o anticorpo *c-kit* obteve uma forte marcação tanto de membrana como citoplasmática, não sendo possível analisar padrões de expressão de membrana, citoplasmático e citoplasmático focal, como descritos por Webster et al. (2006), em amostras histopatológicas, na qual correlacionaram o prognóstico dos mastocitomas.

Como não havia relatos na literatura da avaliação desses padrões em amostras citológicas, para que pudessemos utilizar uma diluição do anticorpo pré-estabelecida, foi necessário utilizar a diluição proposta em amostra histopatológica (1:400), padronizada pelo laboratório de Imunoistoquímica do Serviço de Patologia Veterinária do Hospital Veterinário da FMVZ, Unesp, Botucatu.

A utilização do anticorpo CD117 (*c-kit*) demonstrou ser de fácil execução quanto a metodologia empregada na imunocitoquímica, podendo ser recomendada para a identificação de mastócitos neoplásicos bem diferenciados a anaplásicos. A avaliação dos padrões de marcação em amostras citopatológicas deve ser testado com maiores diluições do anticorpo primário.

Em relação a imunomarcação do Ki-67, clone MIB-1, os mastocitomas pouco diferenciados (grau III) obtiveram maior percentual de positividade (33,89%) do que os mastocitomas moderadamente diferenciados (9,36%) (grau II), havendo diferença estatística entre estes valores, corroborando com o observado em amostras histopatológicas de mastocitomas (ABADIE et al., 1999; CALDERON, 2005; SCASE et al., 2006; SEGUIN et al., 2006; NEWMAN et al., 2007; WEBSTER et al., 2007).

Estes autores observaram índices proliferativos, utilizando o anticorpo primário Ki-67, clone MIB-1 nas amostras histopatológicas, significativamente diferente entre os três graus do mastocitoma, classificados de acordo com o sistema de Patnaik et al. (1984) (ABADIE et al., 1999; SCASE et al., 2006; SEGUIN et al., 2006; NEWMAN et al., 2007; WEBSTER et al., 2007).

A técnica imunocitoquímica para a utilização do Ki-67 também se mostrou de fácil realização, podendo este exame ser mais um instrumento na avaliação do potencial proliferativo, além de auxiliar a criação de critérios mais objetivos para a graduação citopatológica dos mastocitomas caninos.

Nos mastocitomas grau II, a correlação positiva observada entre a imunomarcagem pelo Ki-67 e o número de figuras de mitose avaliadas pelo exame citopatológico demonstra a eficácia do uso da imunocitoquímica para a avaliação do índice proliferativo nos mastocitomas e a possibilidade de utilizarmos a contagem de figuras de mitose, na coloração de rotina para esfregaços citológicos, como critério prognóstico, de proliferação celular.

Ao analisar os resultados do índice de apoptose pela imunocitoquímica, utilizando o anticorpo anti-caspase-3, não foi obtida diferença estatística significativa entre os graus II e III. Deve-se ressaltar que os tumores grau II obtiveram menor média de positividade para proliferação celular e maior para apoptose, o que poderia refletir um maior índice de morte celular em relação à proliferação dos mastócitos neoplásicos moderadamente diferenciados.

Estes resultados podem representar o descrito em livros textos de patologia geral, sobre o comportamento biológico das neoplasias, aonde tumores menos diferenciados tendem a apresentar maior índice proliferativo e menor índice apoptótico (como observado nos mastocitomas grau III).

Até o presente momento, não existem dados na literatura sobre a avaliação do índice apoptótico pela expressão da caspase-3 nos mastocitomas em amostras histopatológicas e citopatológicas. Scase et al. (2006) avaliaram o índice apoptótico dos mastocitomas, utilizando o anticorpo anti-survivina, e não observaram diferença de sua expressão entre os graus histopatológicos.

Frente ao exposto, consideramos que é possível graduar os mastocitomas na citopatologia, à semelhança do que é feito na histopatologia. Raskin e Meyer (2001), em seu livro texto de citopatologia veterinária, abordam os mastocitomas nos três graus de diferenciação, porém não são específicos quanto aos critérios adotados, sendo a quantidade de granulação intracitoplasmática e a atipia nuclear os únicos critérios utilizados para a graduação citopatológica.

A acurácia absoluta de uma graduação citopatológica não é possível, mas a consagrada classificação de Partnaik et al. (1984), para amostras histopatológicas, também não, pois diferenças entre observadores na interpretação dos graus já foram reportadas, inclusive com mastocitomas recebendo as três graduações (NORTHRUP et al., 2005 a, b).

Sendo assim, amostras citológicas apresentando celularidade adequada, obtidas pela aspiração de uma massa tumoral com o auxílio de citoaspirador, podem ser submetidas à avaliação de critérios de malignidade que traduzam uma graduação de mastocitomas bem diferenciado (grau I), moderadamente diferenciado (grau II) e pouco diferenciado (grau III).

A fidelidade desta graduação citopatológica, principalmente, nos tumores grau II, que apresentam a maior variabilidade de características, pode ser alcançada com a contagem de número de figuras de mitose, células binucleadas e multinucleadas, como foi observado em nosso estudo, havendo diferença estatística significativa do número de mitoses e binucleações entre os graus II e III. No entanto, ainda não podemos estimar uma variação numérica entre os valores dessas características, pois para isto seria necessária uma quantidade maior de casos nos três diferentes graus.

Cabe ressaltar que a citopatologia é um exame diagnóstico simples, econômico e rápido sendo a contagem de figuras de mitose, células bi e multinucleadas facilmente obtida, em colorações convencionais, com auxílio de um contador de células manual.

O estabelecimento de uma graduação citológica somente é possível com a avaliação de vários critérios em conjunto, no entanto, algumas características são mais importantes. Entre elas estão as características morfológicas de malignidade como aspectos nucleares de cromatina, presença ou não de nucléolos, relação núcleo-citoplasma e principalmente intensidade e atipia de grânulos intracitoplasmáticos. Conforme os resultados aqui apresentados a quantidade de figuras de mitose nos tumores pouco diferenciados, bem com a relação núcleo-citoplasma são de grande valia na diferenciação dos tumores grau II, bem como a relação núcleo citoplasma, conforme resultados apresentados.

Até o presente momento, a graduação histopatológica deve ser mantida como critério para determinação do prognóstico, pois somente encontramos trabalhos da correlação do grau histopatológico com a sobrevida do paciente, assim como o tempo livre de doença.

Mais uma vez cabe ressaltar que ambos estudos de Patnaik et al. (1984) e Romansik et al. 2007 (2007), que consolidaram a graduação histopatológica e a contagem de figuras de mitose, como fatores preditivos para os mastocitomas, apresentaram o que é fundamental para a validação de critérios patológicos, a sua correlação com o tempo de sobrevida e/ou intervalo livre de doença no paciente oncológico.

Critérios fornecidos pelas características morfológicas são um argumento que apóia um julgamento, mas não é um pedaço de conhecimento em si mesmo. Qualquer critério válido refere a uma correlação entre a presença ou ausência de uma característica definitiva, neste caso, sua correlação com o que acontece com o paciente. Sendo assim, é fundamental correlacionar os critérios citopatológicos com tempo de sobrevida e/ou intervalo livre de doença no paciente oncológico.

Pelo exposto, ressaltamos que a interação entre o clínico, cirurgião e patologista é o que permitirá um crescimento exponencial da oncologia veterinária, pela troca de informações necessárias, como o estadiamento clínico, diagnóstico acurado e futuras correlações de biomarcadores prognósticos com a evolução da neoplasia, tempo livre de doença, e resposta ao tratamento.

6. CONCLUSÕES

Com base nos achados obtidos durante o experimento, podemos concluir que:

- Utilizando critérios citopatológicos foi possível estabelecer três graus: bem diferenciado (grau I), moderadamente diferenciado (grau II) e pouco diferenciado (grau III)
- O número de figuras de mitose nos esfregaços citológicos corados pelo Giemsa demonstrou ser maior nos mastocitomas pouco diferenciados (grau III), assim como o número de células binucleadas, podendo com isto utilizar estes dois parâmetros quantitativos para auxiliar na diferenciação entre os mastocitomas grau II e III em esfregaços citopatológicos.
- Não foi possível a correlação citomorfométrica com os graus II e III dos mastocitomas, devido a ampla sobreposição dos valores obtidos.
- A identificação dos mastócitos neoplásios, utilizando o anticorpo CD117 (*c-kit*), pela imunocitoquímica, foi possível em todos os casos, podendo esta técnica ser útil na diferenciação dos mastocitomas pouco diferenciados de outras neoplasias de células redondas.
- Os resultados de índice mitótico, índice proliferativo (avaliado pela imunomarcção com o anticorpo primário Ki-67, clone MIB-1) e índice apoptótico (avaliado pela imunomarcção com o anticorpo primário anti caspase-3) obtidos nos mastocitomas grau II, nos permite inferir que o comportamento biológico destes tumores seja melhor do que os menos diferenciados (grau III), já que apresentam menor índice mitótico, índice proliferativo e maior índice apoptótico.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABADIE, J.J.; AMARDEILH, M.A.; DELVERDIER, M.E. Immunohistochemical detection of proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 in mast cell tumors from dogs. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.215, p.1629-1633, 1999.
- BACCHI, C.E.; GOWN, A.M. Detection of cell proliferation in tissue sections. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.26, p.677-687, 1993.
- BELLEI, M.H.M.; NEVES, D.S.; GAVA, A.; LIZ, P.P.; PILATI, C. Prevalência de neoplasias cutâneas diagnosticadas em caninos no estado de Santa Catarina, Brasil, no período entre 1998 a 2002. **Rev. Ciênc. Agrovet.**, v.5, n.1, p. 73-79, 2006.
- BOSTOCK, D.E. The prognosis following surgical removal of mastocytomas in dogs. **J. Small Anim. Pract.**, v.14, p.27-40, 1973.
- BOSTOCK, D.E.; CROCKER J.; HARRIS, K.; SMITH, P. Nucleolar organizer regions as indicators of post surgical prognosis in canine spontaneous mast cell tumors. **Br. J. Cancer**, v.59, p.915-918, 1989.
- BOSTOCK, D.E. Neoplasms of the skin and subcutaneous tissues in dogs and cats. **Br. Vet. J.**, v.142, p.1-19, 1986.
- BOWLES, C.A.; KERBER, W.T.; RANGAN, S.R.; KWAPIEN, R.; WOODS, W.; JENSEN E.M. Characterization of a transplantable, canine, immature mast cell tumor. **Cancer Res.**, v. 32, p.1434-1441, 1972.
- CAHALANE, A.K.; PAYNE, S.; BARBER, L.G.; DUDA, L.E.; HENRY, C.J.; MAULDIN, G.E.; FRIMBERGER, A.E.; COTTER, S.M.; MOORE, A.S. Prognostic factors for survival of dogs with inguinal and perineal mast cell tumors treated surgically with or without adjunctive treatment: 68 cases (1994-2002). **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.225, p.401-408, 2004.
- CALDERÓN, C. **Avaliação do índice de proliferação celular dos mastocitomas cutâneos caninos pela histopatologia, histoquímica, imunoistoquímica e imunomarcção de COX-2.** 2005. 150f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
- CROWE, D.T.; GOODWIN, MA.; GREENE, C.E. Total laryngectomy for laryngeal mast cell tumor in a dog. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.22, p.809-816, 1986.

DAVIES, A.P.; HAYDEN, D.W.; KLAUSNER J.S.; PERMAN, V. Noncutaneous systemic mastocytosis and mast cell leukemia in a dog: case report and literature review. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.17, p.355-360, 1981.

DE NARDI, A.B.; RODASKI, S.; SOUSA, R.S.; COSTA, T.A.; MACEDO, T.R.; RODIGHERI, S.M.; RIOS, A.; PIEKARZ, C.H. Prevalência de neoplasias e modalidades de tratamentos em cães, atendidos no hospital veterinário da universidade federal do Paraná. **Arch. Vet. Sci.**, v.7, n.2, p.15-26, 2002.

DOWNING, S.; CHIEN, M.B.; KAAS, P.H.; MOORE, P.E.; LONDON, C.A. Prevalence and importance of internal tandem duplications in exons 11 and 12 of c-KIT in mast cell tumors of dogs. **Am. J. Vet. Res.**, v.63, p.1718-1723, 2002.

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

FAIRLEY, R.A. Collagenolysis: "it ain't easy being pink". **Vet. Pathol.**, v.28, p.96-97, 1991.

FULCINITI, F.; DI MATTIA, D.; CURCIO, M.P.; BOVE, P.; ROTA, A.M.; BOTTI, G. Canine mastocytoma: report of 8 cases diagnosed by fine needle cytology and clinicopathologic correlations. **Acta Cytol.**, v.51, p.616-620, 2007.

FURITSU, T.; TSUJIMURA, T.; TONO, T.; IKEDA, H.; KITAYAMA, H.; KOSHIMIZU, U.; SAGAHARA, H.; BUTTERFIELD, J.H.; ASHMAN, L.K.; KANAYAMA, Y.; MATSUZAWA, Y.; KITAMURA, Y.; KANAKURA, Y. Identification of mutations in the coding sequence of the proto-oncogene c-kit in a human mast cell leukemia cell line causing ligand-independent activation of c-kit product. **J. Clin. Invest.**, v.92, p.1736-1744, 1993.

FURLANI, J.M.; DALECK, C.R.; VICENTI, F.A.M.; DE NARDI, A.B.; PEREIRA, G.T.; SANTANA, A.E.; EURIDES, D.; SILVA, L.A.F. Mastocitoma canino: estudo retrospectivo. **Ciênc. Anim. Bras.**, v.9, p.242-250, 2008.

GHISLENI, G.; ROCCABIANCA, P.; CERUTI, R.; STEFANELLO, D.; BERTAZZOLO, W.; BONFANTI, U.; CANIATTI, M. Correlation between fine-needle aspiration cytology and histopathology in the evaluation of cutaneous and subcutaneous masses from dogs and cats. **Vet. Clin. Pathol.**, v.35, p.24-30, 2006.

GIEGER, T.L.; THÉON, A.P.; WERNER, J.A.; MCENTEE, M.C.; RASSNICK, K.M.; DECOCK, H.E.V. Biologic behavior and prognostic factors for mast cell tumors of the canine muzzle: 24 cases (1990-2001). **J. Vet. Intern. Med.**, v. 17, p.687-92, 2003.

GINN, P.E.; FOX, L.E.; BROWER, J.C.; GASKIN, A.; KURKAZMAN, I.D.; KUBILIS, P.S. Immunohistochemical Detection of p53 Tumor-Suppressor Protein is a Poor Indicator of Prognosis for Canine Cutaneous Mast Cell Tumors. **Vet. Pathol.**, v.37, p.33-39, 2000.

GOLDSCHIMIDT, M.H.; SHOFER, F.S. **Skin tumors of the dog and cat**. Tarrytown: Pergamon Press, 1992. 316p.

HAYES, A.; ADAMS, V.; SMITH, K.; MAGLENNON, G.; MURPHY, S. Vinblastina and prednisolone chemotherapy for surgically excised grade III canine cutaneous mast cell tumors. **Vet. Comp. Oncol.**, v.5, p.168-176, 2007.

HEINRICH, M.; BLANKE, C.D.; DRUKER, B.J.; CORLESS, C.L. Inhibition of KIT tyrosine kinase activity: a novel molecular approach to the treatment of KIT-positive malignancies. **J. Clin. Oncol.**, v.20, p.1692-1703, 2002.

HIROTA, S.; ISOZAK, I.K.; MORIYAMA, Y.; HASHIMOTO, K.; NISHIDA, T.; ISHIGURO, S.; KAWANO, K.; HANADA, M.; KURATA, A.; TAKEDA, M.; TUNIO, G.M.; MATSUZAWA, Y.; KANAKURA, Y.; SHINOMURA, Y.; KITAMURA Y. Gain-of-function mutations of c-kit in human gastrointestinal stromal tumors. **Science**, v.279, p.577-580, 1998.

IWATA, N.; OCHIAI, K.; KADOSAWA, T.; TAKIGUCHI, M.; UMEMURA, T. Canine extracutaneous mast-cell tumours consisting of connective tissue mast cells. **J. Comp. Pathol.**, v.123, p.306-310, 2000.

JAFFE, M.H.; HOSJOOD, G.; TAYLOR, H.W.; KERWIN, S.C.; HEDLUND, C.S.; LOPEZ, M.K.; DAVIDSON, J.R.; MILLER, D.M.; PARANIPE, M. Immunohistochemical and clinical evaluation of p53 in canine cutaneous mast cell tumors. **Vet. Pathol.**, v.37, p.40-46, 2000.

KIUPEL, M.; WEBSTER, J.D.; MILLER, R.A.; KANEENE, J.B. Impact of tumour depth, tumour location and multiple synchronous masses on the prognosis of canine cutaneous mast cell tumours. **J. Vet. Med. A Physiol. Pathol. Clin. Med.**, v.52, p.280-286, 2005.

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

LONDON, C.A.; GALLI, S.J.; YUUKI, T.; HU, Z.Q.; HELFAND, S.C.; GEISLER, E.N. Spontaneous canine mast cell tumours express tandem duplication in the proto-oncogene c-KIT. **Exp. Hematol.**, v.27, p.689-697, 1999.

LONDON, C.A. Kinase inhibitors in cancer therapy. **Vet. Comp. Oncol.**, v.2, p.177-193, 2004.

LONDON, C.A.; SEGUIN, B. Mast cell tumors in the dog. **Vet. Clin. Small Anim. Pract.**, v.33, p.473-479, 2003.

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

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

LONGLEY, B.J.; REGUERA, M.J.; MA Y. Classes of c-KIT activating mutations: proposed mechanisms of action and implications for disease classification and therapy. **Leuk. Res.**, v.25, p.571-576, 2001.

MA, Y.; LONGLEY, B.J.; WANG, X.; BLOUNT, J.L.; LANGLEY, K.; CAUGHEY, G.H. Clustering of activating mutations in c-KIT 's juxtamembrane coding region in canine mast cell neoplasms. **J. Invest. Dermatol.**, v.112, p.165-170, 1999.

MAIOLINO, P.; CATALDI, M.; PACIELLO, O.; RESTUCCI, B.; VICO, G. Nucleomorphometric analysis of canine cutaneous mast cell tumours. **J. Comp. Pathol.**, v.133, p.209-211, 2005.

MAYR, B.; REIFINGER, M.; BREM, G.; FEIL, C.; SCHLEGER, W. Cytogenetic, ras, and p53: studies in cases of canine neoplasms (hemangiopericytoma, mastocytoma, histiocytoma, chloroma). **J. Hered.**, v.90, p.124-128, 1999.

McNIEL, E.A.; PRINK, A.L.; O'BRIEN, T.D. Evaluation of risk and clinical outcome of mast cell tumours in pug dogs. **Vet. Comp. Oncol.**, v.4, p.2-8, 2006.

MOORE, L.E.; GARRETT, L.D.; DEBEY, B.; BILLER, D.S. Spinal mast cell tumor in a dog. **J. Am. Anim. Hosp. Assoc.**, v.3, p.67-70, 2002.

MULLINS, M.N.; DERNELL, W.S; WITHROW, S.J.; EHRHART, E.J.; THAMM, D.H.; LANA, S.E. Evaluation of prognostic factors associated with outcome in dogs with

multiple cutaneous mast cell tumors treated with surgery with and without adjuvant treatment: 54 cases (1998-2004). **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.228, p.91-95, 2006.

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

MURPHY, S.; SPARKES, A.H.; SMITH, K.C.; BREARLEY, K.C. Relationships between the histological grade of cutaneous mast cell tumours in dogs, their survival and the efficacy of surgical resection. **Vet. Rec.**, v.154, p.743-746, 2004.

NEWMAN, S.J.; MRKONJICH, L.; WALKER, K.K.; ROHRBACH, B.W. Canine Subcutaneous Mast Cell Tumour: Diagnosis and Prognosis. **J. Comp. Pathol.**, v.136, 231-239, 2007.

NORTHRUP, N.C.; HARMON, B.G.; GIEGER, T.L.; BROWN, C.A.; CARMICHAEL, K.P.; GARCIA, A.P.; LATIMER, K.S.; MUNDAY, J.S.; RAKICH, P.M.; RICHEY, L.J.; STEDMAN, N.L.; CHENG, A.L. Variation among pathologists in histologic grading of canine cutaneous mast cell tumors. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v.17, p.245-248, 2005a.

NORTHRUP, N.C.; HOWERTH, E.W.; HARMON, B.G.; BROWN, C.A.; CARMICHAEL, K.P.; GARCIA, A.P.; LATIMER, K.S.; MUNDAY, J.S.; RAKICH, P.M.; RICHEY, L.J.; STEDMAN, N.L.; GIEGER, T.L. Variation among pathologists in the histologic grading of canine cutaneous mast cell tumors with uniform use of a single grading reference. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v.17, p.561-564, 2005b.

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.

RASKIN, R.E., MEYER, D.J.(Eds.). **Atlas of canine and feline cytology**. Philadelphia: WB Saunders, 2001.

REGUERA, M.J.; FERRER, L.; RABANAL, R.M. Evaluation of an intron deletion in the c-kit gene of canine mast cell tumors. **Am. J. Vet. Res.**, v.63, p.1257-1261, 2002.

REGUERA, M.J.; RABANAL, R.M.; PUIDGEMONT A.; FERRER, L. Canine mast cell tumors express stem cell factor receptor. **Am. J. Dermatopathol.**, v.22, p.49-54, 2000.

ROCHA, N.S. Citologia aspirativa por agulha fina em medicina veterinária: I. **Cães e Gatos**, v.75, p.15-16, 1998.

RODIGHERI, S.M.; DALECK, C.R.; CALAZANS, S.G.; FERNANDES, S.C.; DE NARDI, A.B.; CESAR, J.R.F.; CASTRO, J.H.T. Neuropatia paraneoplásica associada ao mastocitoma canino. **Ciênc. Rural**, v.38, n.3, p.819-822, 2008.

ROMANSIK, E.M.; REILLY, C.M.; KASS, P.H.; MOORE, P.F.; LONDON, C.A. Mitotic Index Is Predictive for Survival for Canine Cutaneous Mast Cell Tumors. **Vet. Pathol.**, v.44, p.335–341, 2007.

SAKUMA, Y.; SAKURI, S.; OGUNI, S.; HIRONAKA, M.; SAITO, K. Alterations of the c-kit gene in testicular germ cell tumors. **Cancer Sci.**, v.94, p.486-491, 2003.

SCASE, T.J.; EDWARDS, D.; MILLER, J.; HENLEY, W.; SMITH, K.; BLUNDEN, A.; MURPHY, S. Canine mast cell tumors: correlation of apoptosis and proliferation markers with prognosis. **J. Vet. Intern. Med.**, v.20, p.151-158, 2006.

SCOTT, D.W.; MILLER, W.H.; GRIFFIN, C.E. **Muller & Kirk' small animal dermatology**. 6. ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 2001. p.1528.

SEGUIN, B.; BESANCON, M.F.; MCCALLAN, J.L.; DEWE, L.L.; TENWOLDE, M.C.; WONG, E.K.; KENT, M.S. Recurrence rate, clinical outcome, and cellular proliferation indices as prognostic indicators after incomplete surgical excision of cutaneous grade II mast cell tumors: 28 dogs (1994 – 2002). **J. Vet. Intern. Med.**, v.20, p.933-940, 2006.

SEGUIN, B.; LEIBMAN, N.F.; BREGAZZI, V.S.; OGILVIE, G.K.; POWERS, B.E.; DERNELL, W.S.; FETTMAN, M.J.; WITHROW, S.J. Clinical outcome of dogs with grade-II mast cell tumors treated with surgery alone: 55 cases (1996 – 1999). **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.7, p.1120-1123, 2001.

SFILIGOI, G.; RASSNICK, K.M.; SCARLETT, J.M.; NORTHRUP, N.C.; GIEGER, T.L. Outcome of dogs with mast cell tumors in the inguinal or perineal region versus other cutaneous locations: 124 cases (1990-2001). **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.226, p.1368-1374, 2005.

SOUZA, M.L.; TORRES, L.F.; ROCHA, N.S.; TAKAHIRA, R.K.; MAMPRIM, M.J.; BURINI, C.H.P.; BANDARRA, E.P.; FIGUEIREDO, L.M.A. Peritoneal effusion in a dog secondary to visceral mast cell tumor. **Acta Cytol.**, v.45, 2001.

STEFFEY, M.; RASSNICK, K.; PORTER, B.; NJAA, B.L. Uretral mast cell tumor in a dog. **J. Am. Anim. Hosp. Assoc.**, v.40, p.82-85, 2004.

STONE, J.M.; JACKY, P.B.; PRIEUR, D.J. Chromosomal fragile site expression in dogs: II. Expression in boxer dogs with mast cell tumors. **Am. J. Med. Genet.**, v.40, p.223-229, 1991.

- STREFEZZI, R.F.; XAVIER, J.G.; CATÃO-DIAS, J.L. Morphometry of canine cutaneous mast cell tumours. **Vet. Pathol.**, v.40, p.268-75, 2003.
- SUEIRO, F.A.R.; DALECK, C.R.; ALESSI, A.C. Ultra-estrutura dos mastócitos de diferentes tipos histológicos de mastocitoma em cães. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.54, p.255-258, 2002.
- TAKAHASHI, T.; KADOSAWA, T.; NAGASE, M.; MATSUNAGA, S.; MOCHIZUKI, M.; NISHIMURA, R.; SASAKI, N. Visceral mast cell tumors in dogs: 10 cases (1982-1997). **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.216, p.222-226, 2000.
- THAMM, D.; TUREK, M.; VAIL, D. Outcome and prognostic factors following adjuvant prednisolone/vinblastine chemotherapy for high risk canine mast cell tumour: 61 cases. **J. Vet. Med. Sci.**, v.68, p. 581-587, 2006.
- THAMM, D.H.; VAIL, D.M. Mast cell tumors. In: : WITHROW, S.J.; MACEWEN, E.G.(Eds.). **Withrow & MackEwen's Small animal clinical oncology**. 4. ed. St. Louis: Saunders Elsevier, 2007. p. 402-424.
- TIAN, Q.; FRIERSON, HF.; KRYSTAL, G.W.; MOSKALUK, C.A. Activating c-kit gene mutations in human germ cell tumors. **Am. J. Pathol.**, v.154, p.1643-1647, 1999.
- TURREL, J.M.; KITCHELL, B.E.; MILLER, L.M.; THEON, A. Prognostic factors for radiation treatment of mast cell tumor in 85 dogs. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.193, p.936-940, 1988.
- WEBSTER, J.D.; KIUPEL, M.; YUZHASIYAN-GURKAN. Evaluation of the kinase domain of c-KIT in canine cutaneous mast cell tumors. **BMC Cancer**, v.6, p.85, 2006.
- WEBSTER, J.D.; YUZHASIYAN-GURKAN, V.; MILLER, R.A.; KIUPEL, M. Cellular Proliferation in Canine Cutaneous Mast Cell Tumors: Associations with c-KIT and Its Role in Prognostication. **Vet. Pathol.**, v.44, p.298-308, 2007.
- WEBSTER, J.D.; YUZHASIYAN-GURKAN, V.; KANEENE, J.B.; MILLER, R.; RESAU, J.H.; KIUPEL, M. The role of c-Kit in tumorigenesis: evaluation in canine cutaneous mast cell tumors. **Neoplasia**, v.8, p.104-111, 2006.
- WEISSE, C.; SHOFER, F.S.; SORENMO, K. Recurrence rates and sites for grade II canine cutaneous mast cell tumors following complete surgical excision. **J. Am. Anim. Hosp. Assoc.**, v.38, p.71-73, 2002.

WU, H.; HAYASHI, T.; INOUE, M. Immunohistochemical expression of Mdm2 and p53 in canine cutaneous mast cell tumours. **J. Vet. Med. A Physiol. Pathol. Clin. Med.**, v.53, p.65-68, 2006.

ZEMKE D.; YAMINI B.; YUZBASIYAN-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.**, v.13, p.341-45, 2001.

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.529-535, 2002.

ANEXO – Trabalho submetido à revista *Veterinary Clinical Pathology*

Using cytoplasmic and nuclear morphometry to grade Canine Mast Cell Tumors

Rafael Torres Neto¹, Pedro Pinczowski¹, Celmira Calderon¹, Sheila C. Rahal², Noeme S. Rocha¹, Barbara E. Kitchell³, Renée Laufer Amorim¹. ¹Department of Veterinary Clinic, Sao Paulo State University, UNESP, Botucatu, Brazil. ²Department of Veterinary Surgery and Anesthesiology, Sao Paulo State University, UNESP, Botucatu, Brazil. ³Center for Comparative Oncology, Department of Small Animal Clinical Science, College of Veterinary Medicine, Michigan State University, East Lansing, MI.

Corresponding author: Renée Laufer-Amorim (renee@fmvz.unesp.br)

Short Title: Morphometry in canine mast cell tumors

Abstract

Background: The cutaneous mast cell tumor (MCT) is the most common skin neoplasm in dogs. Cytopathology is a useful tool in MCT diagnosis, and morphometric parameters can help in the grading of this tumor.

Objectives: Our aim was to evaluate morphometric nuclear and cytoplasmic parameters in moderately and poorly differentiated mast cell tumors from dogs.

Methods: Fine needle aspiration (FNA) samples from 21 dogs subjected to surgical resections of cutaneous MCTs were stained with Giemsa. Neoplastic mast cells, 100 from each smear, were visualized on a Leica microscope, using a digital camera to capture images for morphometric analysis. The parameters examined were: the area of both the cytoplasm and nucleus, the perimeter of the cytoplasm and the nucleus, and a circumference factor. In all cases, the tumor grade was confirmed by histopathology.

Results: The mean cytoplasmic area was 185.84 μm^2 (\pm 54.40) for grade II tumors and 137.83 μm^2 (\pm 63.46) for grade III MCTs, while the mean cytoplasmic perimeter was 61.91 μm (\pm 7.34) for grade II tumors and 56.05 μm (\pm 9.49) for grade III tumors. The mean nuclear area was 70.57 μm^2 (\pm 14.54) for grade II tumors and 78.41 μm^2 (\pm 14.95) for grade III tumors, while the mean nuclear perimeter was 32.15 μm (\pm 3.18) for grade II tumors and 33.55 μm (\pm 3.56) for grade III tumors. The mean nuclear circumference factor was 1.11 (\pm 0.02) for grade II tumors and 1.10 (\pm 0.01) for grade III tumors, and the mean cytoplasmic circumference factor was 1.61 (\pm 0.04) for grade II tumors and 1.12 (\pm 0.03) for grade III tumors. No statistical difference in the cytoplasmic and nuclear parameters analyzed was found between moderately and poorly differentiated mast cell tumors. There was considerable overlap in morphometric values for cells of grades II and III MCTs.

Conclusions: The morphometric measurements analyzed herein can not be used to grade mast cell tumors cytologically.

Keywords: cytopathology, morphometry, dogs, mast cell tumor

Introduction

Cutaneous mast cell tumors (MCTs) are one of the most common tumors in dogs, accounting for 16-21% of all skin tumors¹. Animals that are affected are generally older, with a mean age of diagnosis of 8 years. Boxers, Boston terriers, Labrador retrievers, beagles and schnauzers have an increased risk

of MCT development^{1,2,3}. Most dogs with MCTs will present with solitary lesions, but approximately 11-21% of animals will present with multiple lesions^{4,5}. Grossly, the appearance of mast cell tumors is variable, ranging from soft, slow-growing masses to rapidly enlarging, ulcerated masses^{1,2,3}. Metastatic sites include the regional lymph nodes, spleen and liver⁶. Lung and bone marrow metastasis is uncommon⁶. The process by which cutaneous mast cells transform into a MCT remains largely unknown^{1,7,8}. Clinically, these tumors range from a benign mass that can be cured by surgical excision alone, to potentially fatal metastatic disease^{1,2,3}. Dogs with high-grade MCTs and those with a history of disseminated disease have a short survival time^{1,2,3}.

Attempts have been made to predict the behavior of these tumors with criteria such as clinical stage^{2,4,5}, growth rate², proliferative activity⁹, intratumoral angiogenesis¹⁰, c-KIT mutations^{7,8} and histological grade^{2,3}. The results of these studies have been highly variable, and no single parameter has been shown to clearly predict the biological behavior of canine cutaneous MCTs. However, histological grade is the most frequently used criterion in routine diagnostic procedures because it is accepted as predictive, is easily applied to stained histological sections, and does not require more expensive and complicated techniques^{1,2,3}. The histological grading system proposed by Patnaik is based on certain histological features (extent of tumor, cellularity, cellular morphology, mitotic index and stromal reaction) and is the most commonly used method². Although this grading system is the accepted method for predicting MCT behavior, it is not reproducible, with as much as 50–60% discordance between experienced pathologists¹¹. This is especially true in the evaluation of borderline cases because of the lack of objective morphometric parameters¹¹. The Patnaik classification is based on information derived from analysis of different histological features, some of which may be strongly influenced by subjective inter-observer differences as well as intratumoral heterogeneity¹¹.

Over the last few decades, the development of computerized morphometric techniques has minimized subjective inter-observer variation and, consequently, aided diagnostic decisions¹². In addition, increased use of cytopathologic examination, which is efficient and practical for the diagnosis of mast cell tumors¹, has also provided a more solid basis for diagnostic decisions. Using cytopathology is advantageous because the cells are spread on the slide so that the pathologist can see the entire cytoplasm, thereby eliminating the difficulty of evaluating all sections of a cell encountered in histopathology¹³. A recent study reports that nuclear area, mean nuclear diameter, and the nuclear perimeter of the tumor cell are statistically different between grade II and III MCTs¹². The goal of the present study was to determine whether moderately (grade II) and poorly differentiated (grade III) MCTs have different nuclear and cytoplasmic morphometric measurements, by combining the precision of computerized morphometric analysis with the rapidity and practicality of cytopathologic examination.

Materials and Methods

Sample Acquisition

Twenty-one cutaneous MCTs from eighteen dogs were obtained from the Department of Veterinary Surgery and Anesthesiology, College of Veterinary Medicine and Animal Science, Sao Paulo State University (UNESP), Botucatu, Brazil, from March 2006 to July 2007. These lesions were subjected to fine-needle aspiration (FNA) before surgical excision as the only treatment modality. A medical history was obtained, and a physical exam was performed, for each case including: age at diagnosis, sex, breed, weight, adjunct medications given at the time of surgery, tumor duration before removal, tumor location, and the number of tumor masses at the time of diagnosis.

Cytopathology and morphometric analysis

The cytopathologic slides obtained by FNA were air-dried and fixed in methanol for five minutes and stained with Giemsa stain for thirty minutes. According to the cytopathologic features described by Raskin and Meyer¹⁴ and the cytopathological parameters used to formulate Patnaik's grade system, the selected cases were categorized as grade II (moderately-differentiated) or grade III (poorly-differentiated). In all cases, an additional slide was alcohol-fixed and stained immunocytochemically for CD117 (anti-CD117, rabbit anti-human polyclonal; Dako, Glostrup, Denmark). CD117 has previously demonstrated cross-

reactivity with canine c-kit¹⁵. The material obtained by FNA was analyzed by a computer system composed of an optical microscope (Leica-DMR) coupled to a digital camera (Leica-DFC500) that transfers the images to a computer. The images were analyzed with an image analysis program designed for quantitative microscopy (Leica-QWin). The measurements were calibrated with the aid of a micrometric ruler (Pyser-SGI) at 640x magnification.

For each cytological smear, 100 cells (nucleus and cytoplasm) were isolated using a Trust 1200-V2 Wireless Scroll Tablet (Dell). The cells analyzed had distinct cytoplasmic and nuclear borders; avoiding overlapping cells (Figure 1). The morphometric parameters used were: the area of both the cytoplasm and the nucleus; the perimeter of the cytoplasm and the nucleus; and a circumference factor, representing the regularity of the nucleus and cytoplasm, in which a calculated value close to 1 is a perfect circle. Tumor grade was confirmed by histopathology in all cases colocara o sistema utilizado.

Statistical Analysis

The results obtained by computerized morphometry were compared and correlated with the grades obtained by cytopathological examination using software (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA). A *P* value of less than 0.05 was considered significant.

Results

The age of the 18 affected dogs in this study ranged from 2 to 17 years with a mean age of 9 years. Eleven of the dogs in this study were intact females and seven were intact males. A total of eight breeds were represented including boxers (*n* = 6), mixed breed dogs (*n* = 4), pit bulls (*n* = 2), a cocker spaniel (*n* = 1), a miniature pinscher (*n* = 1), a poodle (*n* = 1), a german shepherd (*n* = 1), a rottweiler (*n* = 1) and a brazilian terrier (*n* = 1). The MCTs anatomical location for all dogs is listed in Table 1. Three dogs had multiple synchronous MCTs in two different body regions.

We found only one case of grade I MCT. This sample was not included in the study as it was not possible to obtain morphometric measurements in these neoplastic cells due to intense intracytoplasmic granulation. Seventeen cases (81%) had grade II MCTs. In these cases, the moderately-differentiated mast cells were round to polygonal with moderate to accentuated intracytoplasmic granules of varying size and shape. Those nuclei that were not obscured by granules had lightly stained chromatin and inconspicuous nucleoli, and anisokaryosis was evident (Figure 2a). Binucleated cells were found frequently. Extracellular collagenous matrix, in the form of eosinophilic strands, often mixed with eosinophils and normal mast cells, was observed. Mitotic figures were not observed in grade II MCTs.

Only four cases (19%) were poorly-differentiated grade III MCTs. Features of malignancy including multinucleation (more than 2 nuclei) and atypical mitotic figures were found frequently in all grade III cases (Figure 2b). Neoplastic mast cells from grade III tumors comprised a monolayer population of round-to-oval shapes with some cells having an atypical polygonal shape. The cytoplasm had either no or sparse cytoplasmic granules and nuclei with prominent and multiple nucleoli. The nuclei were increased in size compared to those seen in grade II MCTs. These grade III tumor cells presented with nuclear heterochromatin containing an open pattern and irregular nuclear membrane. Rare nuclei were oval or spindle-shape. Immunocytochemical staining was positive for c-kit (CD117) in all grade II and grade III MCTs.

For grade II MCTs, a total of 1700 nuclei and adjacent cellular cytoplasm were analyzed. For grade III MCTs, 400 cells were evaluated. Tables 2 and 3 show the results of area, perimeter, and circumference factor (nuclear and cytoplasmic) measurements. The cytoplasmic area varied widely within cells from grades II (from 95,618 μm^2 to 267,356 μm^2) and III (from 87,136 μm^2 to 221,360 μm^2) tumors (Table 3). There was no correlation between the nuclear perimeter and the nuclear circumference factor in grade II MCTs (*P* = 0.7024, *r* = 0.1001), and only a minor correlation between these parameters in grade III MCTs (*P* = 0.06, *r* = 0.77). Grade II tumors had no correlation between area and the circumference factor and in grade III tumors this correlation was of little significance (*P* = 0.06, *r* = 0.78).

Discussion

Our intent was to apply quantitative values to the classic tumor grading schemes, which lack association with a quantitative value², based in cytoplasmic and nuclear morphometric criteria and to compare our findings to existing data. The present comparison of cytoplasmic morphometry between grade II and grade III MCT cells revealed no differentiation extent-dependent differences in mean cytoplasmic area or mean cytoplasmic perimeter. Likewise, the concurrent comparison of nuclear morphometry indicated that mean nuclear area, mean nuclear perimeter and mean nuclear circumference did not differ between grade II and grade III tumors. Indeed, consistent with the findings of Strefezzi and colleagues¹² considerable overlap in morphometric values was observed for cells of grades II and III MCTs

The clinical data obtained in this study are in agreement with the published literature with regard to breed, with Boxers afflicted most frequently, and the average age of the affected dogs (9 years)^{1,2,3}. Mixed breed dogs were the second most frequently seen, which is consistent with their prevalence in our hospital population. Despite reports in the literature of no sex predilection for MTC¹, more females were affected (61.11%) than males (38.88%) over the duration of this study. Multiple tumors were found in three cases (16.66%); while the tumors had the same cytopathologic grade as the first MCT, these tumors were not a local recurrence.

The basic pathology of MCTs is well documented, as is the concept that histological features such as cellular differentiation, mitotic rate and tumor invasion may be used to grade the tumor, and thus predict the biological behavior of the tumor and the patient's prognosis^{2,3}. Our system of cytopathologic grading was adapted from Patnaik's system regarding cytological features, allowing us to classify all tumors in the study. All cases were graded by a single investigator (R.T.N) who was blinded to clinical and histopathological results. Recent studies have shown that, using the Patnaik system, different veterinary pathologists will assign different histological grades to the same MCT¹¹, revealing numerous problems in standardizing the histological grading criteria set out in Patnaik's original paper. Furthermore, strict application of Patnaik's grading technique precludes the grading of the large numbers of well and moderately-differentiated MCTs that originate from within the subcutis. The one study that evaluated the significance of tumor depth as a sole prognostic indicator did not find prognostic significance for dogs with cutaneous MCTs¹⁶.

Cytopathologic evaluation of Giemsa-stained FNA samples can be used to establish the diagnosis of MCTs in dogs¹. However, cytology is not a substitute for histopathology in MCT grading, because there are no studies demonstrating a correlation between cytology and prognosis. Cytopathology is a useful tool for the practicing veterinarian, since samples can be collected quickly, easily, and inexpensively. Importantly, this is a procedure that, in most cases, poses little or no risk to the patient¹⁴. In previous histopathological studies of substantial numbers of canine MCTs, the proportions of moderately and poorly-differentiated tumors identified has varied^{2,3,5,17}. In our study, as determined by cytopathological exam, 81% were grade II tumors (moderately-differentiated) and 19% grade III (poorly-differentiated). The higher incidence of grade II tumors is consistent with the literature^{2,3}. Mitotic figures were observed in all grade III tumor slides (n = 4), but not in grade II MCT slides. Therefore, the presence of mitotic figures could be a valuable criterion in evaluating grade III MCTs on cytopathologic smears.

The cytoplasmic area of grade II and III mast cells were widely variable (Table 3), which could result from the presence of giant cells in the pleomorphic moderately and poorly-differentiated neoplastic cells^{2,3}. We also found that the mean cytoplasmic area of the grade III tumor cells was smaller than seen in grade II, possibly because of the quantity and nature of the granules in grade II MCT¹⁸. The intracytoplasmic granules in moderately-differentiated tumors are larger than in well and poorly-differentiated tumors¹⁸. These atypical granules could expand the cytoplasm. No one has published previously an evaluation of cytoplasmic morphometric parameters in cytopathologic smears of MCTs.

The nuclear:cytoplasmic ratio was higher in grade III tumors (0.56) than in grade II tumors (0.38). Most data in the veterinary literature regarding the nuclear:cytoplasmic ratio of MCTs are in histopathological samples. This is the first study to examine this parameter on cytopathological slides. The

neoplastic cells of grade III were more round than the grade II neoplastic cells, as confirmed by the cytoplasmic circumference (grade III = 1.12; grade II = 1.61), in which a calculated value close to 1 is a perfect circle.

Streffezi's study did not use cytoplasmic parameters, because seeing the cytoplasmic borders in the cytopathologic preparations is very difficult due to density of granules. In our study we did not encounter this difficulty in the moderately and poorly-differentiated mast cells samples we evaluated, making it possible to determine cytoplasmic morphometric parameters. To our knowledge, this is the first report of successful evaluation of cytoplasmic morphometric parameters including the area, perimeter and circumference factor in MCTs in cytopathological smears.

The substantial overlap in the measured morphometric variables evaluated here limits the utility of this method for cytopathologic grading of MCTs. The lack of statistically that nuclear and cytoplasmic morphometry results obtained by our method of cytopathologic examination are not appropriate as an objective discriminator to differentiate grades of MCTs.

Acknowledgements: Morphometry of neoplastic mast cells and clinical data was collected from the Veterinary Medical Teaching Hospital at Sao Paulo State University (UNESP), Botucatu, Brazil. This work was funded by the State of São Paulo Research Foundation (FAPESP). Rafael Torres Neto was supported by FAPESP, as a doctoral student in the Department of Veterinary Clinic at UNESP.

References

1. Thamm DH, Vail DM. Mast cell tumors. In: Withrow and Macewen's Small Animal Clinical Oncology, 4 ed. St. Louis, Saunders Elsevier, 2007, p.402-424.
2. Bostock DE. The prognosis following surgical removal of mastocytomas in dogs. *J Small Anim Pract.*1973;14:27-41.
3. Patnaik AK, Ehler WJ, MacEwen EG. Canine cutaneous mast cell tumor: morphologic grading and survival time in 83 dogs. *Vet Pathol.*1984;21:469-474.
4. Mullins MN, Dernel WS, Withrow SJ, Ehrhart EJ, Thamm DH, Lana SE. Evaluation of prognostic factors associated with outcome in dogs with multiple cutaneous mast cell tumors treated with surgery with and without adjuvant treatment: 54 cases (1998-2004). *J Am Vet Med Assoc.* 2006;228:91-95.
5. Murphy S, Sparkes AH, Blunden AS, Brearley MJ, Smith KC. Effects of stage and number of tumours on prognosis of dogs with cutaneous mast cell tumours. *Vet Rec.*2006;158: 287-291.
6. Endicott MM, Charney SC, McKnight JA, Loar AS, Barger AM, Bergman PJ. Clinicopathological findings and results of bone marrow aspiration in dogs with cutaneous mast cell tumours: 157 cases (1999 – 2002). *Vet Comp Oncol.*2007;5:31–37.
7. 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.*2002;39:529-535.
8. Webster JD, Yuzbasiyan-Gurkan V, Miller RA, Kaneene JB, Kiupel M. Cellular Proliferation in Canine Cutaneous Mast Cell Tumors: Associations with c-KIT and Its Role in Prognostication. *Vet Pathol.* 2007;44:298-308.
9. Abadie JJ, Amardeilh MA, Delverdier ME. Immunohistochemical detection of proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 in mast cell tumors from dogs. *J Am Vet Med Assoc.*1999;215:1629-1633.
10. Preziosi R, Sarli G, Paltrinieri M. Prognostic value of intratumoral vessel density in cutaneous mast cell tumors of dogs. *J Comp Pathol.*2004;130:143-151.
11. Northrup NC, Howerth EW, Harmon BG, et al. Variation among pathologists in the histologic grading of canine cutaneous mast cell tumors with uniform use of a single grading reference. *J Vet Diagn Invest.*2005;17:561-564.
12. Streffezi RF, Xavier JG, Catão-Dias JL. Morphometry of canine cutaneous mast cell tumours. *Vet. Pathol.*2003;40:268-75.
13. Gil J, Barba J. Principles of stereology. Computerized applications to anatomic pathology. In: Marchevsky AM, Bartels PH. Image analysis: a primer for pathologists. New York, Raven Press, 1994, p.79-124.
14. Raskin RE, Meyer DJ, eds. Atlas of Canine and Feline Cytology. Philadelphia, PA: WB Saunders; 2001.
15. Kiupel M, Webster JD, Kaneene JB, Miller R, Yuzbasiyan-Gurkan V. The use of KIT an tryptase expression patterns as prognostic tools for canine cutaneous mast cell tumors. *Vet. Pathol.*2004;41:371-377.
16. Kiupel M, Webster JD, Miller RA, Kaneene JB. Impact of tumour depth, tumour location and multiple synchronous masses on the prognosis of canine cutaneous mast cell tumours. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med.*2005;52:280-286.

17. Murphy S, Sparkes AH, Smith KC, Brearley KC. Relationships between the histological grade of cutaneous mast cell tumours in dogs, their survival and the efficacy of surgical resection. *Vet Rec.*2004;154:743-746.
18. Sueiro FAR, Daleck CR, Alessi AC. Ultra-estrutura dos mastócitos de diferentes tipos histológicos de mastocitoma em cães. *Arq Bras Med Vet Zootec.*2002;54:255-258.

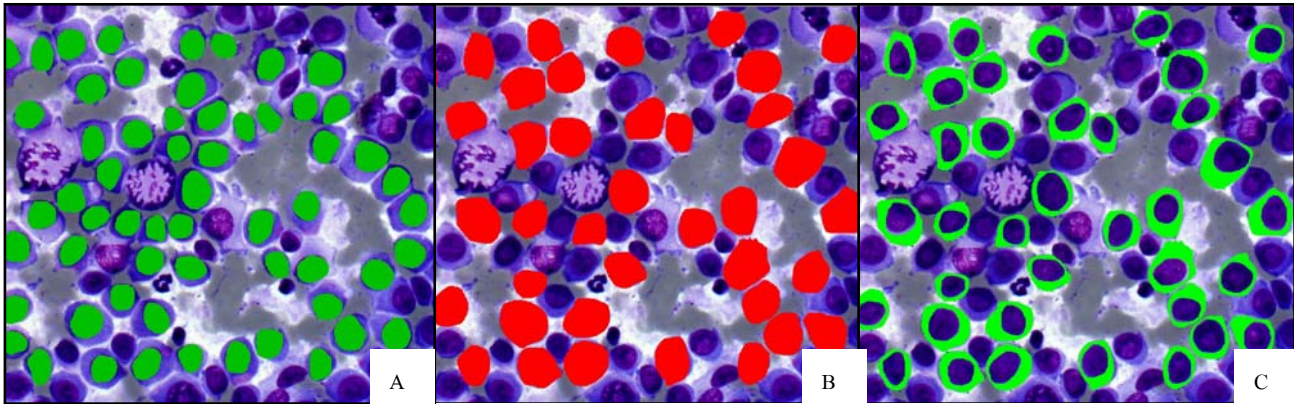


Figure 1. Computerized morphometry of cytopathological smears of grade III MCT. (A) The green circles represent the nuclei. (B) The red circles represent the whole cell (nucleus and cytoplasm). (C) The green areas represent the cytoplasm. QWin software was used for the image analysis as described in the Materials and Methods section (bar=10µm).

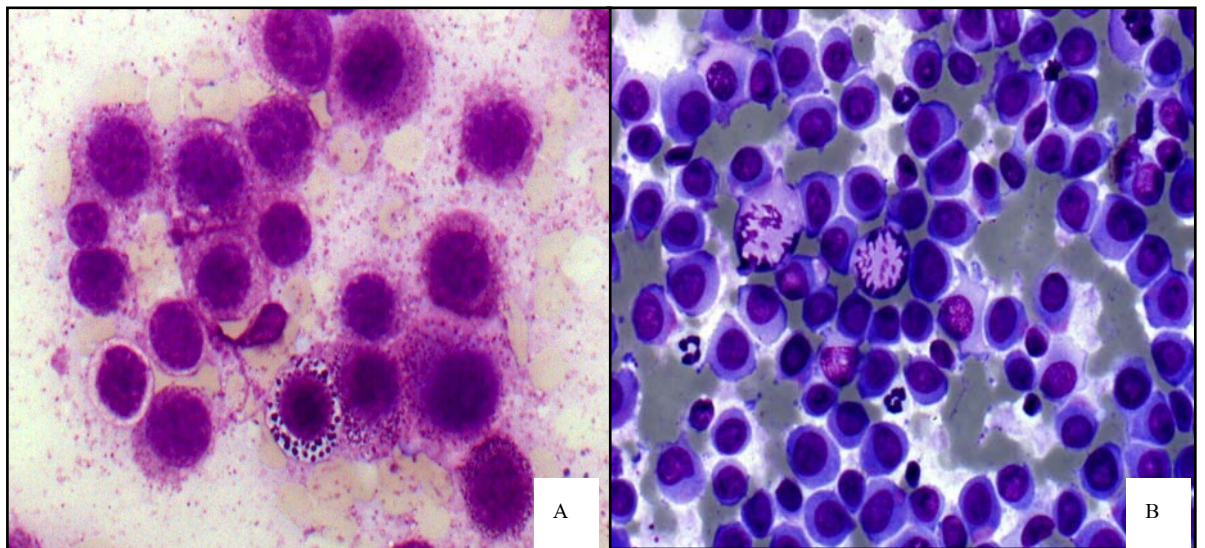


Figure 2. Mast cells with variable staining of granules, anisokaryosis and anisocytosis. The cells were stained with Giemsa staining as described in the Materials and Methods section. Images were acquired using a Leica DMR microscope with a Leica DFC500 camera. (A) Grade II; (B) Grade III. In B, the mast cells have no granules and marked basophilia of the cytoplasm, while the nuclei have coarse chromatin and variable nuclear to cytoplasmic ratios. Note two mitotic figures in the center (bar=10µm).

Table 1. Distribution of MCTs in different body locations

Location*	n =
Head/neck	2
Extremities	5
Trunk	10
Inguinal/perineal	4

*Three dogs had multiple synchronous MCTs at two distinct locations

Table 2. Distribution of the nuclear morphometric parameters of grade II and III MCTs obtained from cytopathologic samples stained with Giemsa.

	area	perimeter	circumference factor
grade	(μm^2)	(μm)	
II (n = 17)			
mean \pm SD	70.57 \pm 14.54 ^A	32.15 \pm 3.18 ^A	1.11 \pm 0.02 ^A
minimum	53.644	27.866	1.087
maximum	110.523	40.115	1.177
III (n = 4)			
mean \pm SD	78.41 \pm 14.95 ^A	33.55 \pm 3.56 ^A	1.10 \pm 0.01 ^A
minimum	52.396	27.202	1.094
maximum	94.826	37.235	1.118

T-test and Mann Whitney

^A no significant statistical difference

Table 3. Distribution of the cytoplasmic morphometric parameters of grade II and III MCTs obtained from cytopathologic samples stained with Giemsa.

	area	perimeter	circumference factor
grade	(μm^2)	(μm)	
II (n = 17)			
mean \pm SD	185.84 \pm 54.40 ^A	61.91 \pm 7.34 ^A	1.61 \pm 0.04 ^A
minimum	95.618	80.071	3.032
maximum	267.356	110.995	5.401
III (n = 4)			
mean \pm SD	137.83 \pm 63.46 ^A	56.05 \pm 9.49 ^A	1.12 \pm 0.03 ^A
minimum	87.136	73.965	3.597
maximum	221.360	102.362	7.076

Test t and Mann Whitney

^A no significant statistical difference

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)