



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Saúde Animal

**ANÁLISE DE SOBREVIVÊNCIA E FATORES PROGNÓSTICOS DE CÃES
COM MASTOCITOMA CUTÂNEO**

FERNANDA SOUZA NATIVIDADE

Dissertação de Mestrado em Saúde Animal

Brasília/DF
OUTUBRO/2013



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Saúde Animal

**ANÁLISE DE SOBREVIDA E FATORES PROGNÓSTICOS DE CÃES
COM MASTOCITOMA CUTÂNEO**

FERNANDA SOUZA NATIVIDADE

Dissertação de Mestrado em Saúde Animal
Área de Concentração: Clínica Médica e Cirurgia Animal
Linha de pesquisa: Métodos de diagnóstico e tratamento de afecções dos
animais domésticos e silvestres.

Brasília/DF
OUTUBRO/2013



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Saúde Animal

**ANÁLISE DE SOBREVIDA E FATORES PROGNÓSTICOS DE CÃES
COM MASTOCITOMA CUTÂNEO**

FERNANDA SOUZA NATIVIDADE

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Paula Diniz Galera

Publicação 085/2013

Dissertação de Mestrado em Saúde Animal

Área de Concentração: Clínica Médica e Cirurgia Animal

Linha de pesquisa: Métodos de diagnóstico e tratamento de afecções dos
animais domésticos e silvestres.

Brasília/DF

OUTUBRO/2013

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

NATIVIDADE, F.N. Análise de sobrevida e fatores prognósticos de cães com mastocitoma cutâneo. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2013, 24p. Dissertação de Mestrado.

Documento formal, autorizada reprodução desta dissertação de mestrado para empréstimo ou comercialização, exclusivamente para fins acadêmicos, foi passado pelo autor à Universidade de Brasília e acha-se arquivado na Secretaria do Programa. O autor reserva para si os outros direitos autorais, de publicação. Nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem autorização por escrita do autor. Citações são estimuladas desde que citada a fonte.

Natividade, Fernanda Souza

Análise de sobrevida e fatores prognósticos de cães com mastocitoma canino/ Fernanda Souza Natividade orientação de Paula Diniz Galera.
Brasília, 2013. 24p.: il.

Dissertação de mestrado (M)-Universidade de Brasília/ Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2013.

1. Análise de sobrevida 2. Fatores prognósticos 3. Mastocitoma Canino 4. Cães I. NATIVIDADE, F.S. II. Título

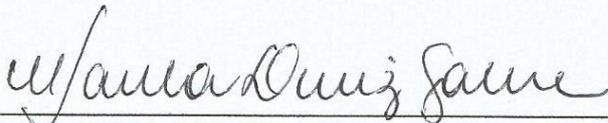
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

**ANÁLISE DE SOBREVIVÊNCIA E FATORES PROGNÓSTICOS DE CÃES COM
MASTOCITOMA CUTÂNEO**

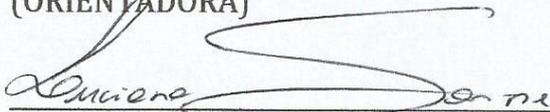
FERNANDA SOUZA NATIVIDADE

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-
GRADUAÇÃO EM SAÚDE ANIMAL, COMO
PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS
A OBTENÇÃO DE GRAU DE MESTRE EM
SAÚDE ANIMAL

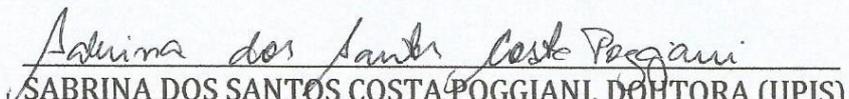
APROVADA POR:



PAULA DINIZ GALERA, DOUTORA (UnB)
(ORIENTADORA)



LUCIANA SONNE, DOUTORA (UFRGS)
(EXAMINADORA EXTERNA)



SABRINA DOS SANTOS COSTA POGGIANI, DOUTORA (UPIS)
(EXAMINADORA EXTERNA)

BRASÍLIA, 23 DE OUTUBRO DE 2013.

Dedico este trabalho a Deus, à minha família e aos amigos, que são meu sistema de suporte.

AGRADECIMENTOS

Ao meu marido e minha família por me darem todo o apoio, força e estímulo quando eu mais precisei.

A minha orientadora, chefe e amiga, por tudo, desde sempre.

Ao LPV-UnB, especialmente Letícia e Anahí, por me receberem tão bem.

Ao co-orientador Márcio Botelho de Castro, pelos ensinamentos e instruções durante a execução deste trabalho.

SÚMARIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	ix
LISTA DE FIGURAS	x
INTRODUÇÃO	2
MATERIAIS E MÉTODOS.....	5
RESULTADOS	6
DISCUSSÃO E CONCLUSÕES.....	9
REFERÊNCIAS.....	16
FIGURAS	19

LISTA DE ABREVIATURAS

cm	Centímetros
IM	Índice Mitótico
LPV-HVET	Laboratório de Patologia Veterinária do Hospital veterinário da Universidade de Brasília
SRD	Sem Raça Definida
AgNOR	Regiões Organizadoras Nucleolares com Afinidade para Prata
PCNA	Antígeno Nuclear de Proliferação Celular
CI	Intervalo de Confiança

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Curva de sobrevida estratificada pelo grau histológico de acordo com Patnaik et al. (1984) de cães com mastocitoma canino. Quando analisada isoladamente houve influência sobre a sobrevida ($P < .0001$).	19
Figura 2	Curva de sobrevida pelo índice mitótico (IM) estratificado segundo Romansik et al. (2007) de todos os animais com mastocitoma canino. IM foi fator prognóstico para a sobrevida final ($P < .0001$).	19
Figura 3	Correlação significativa do índice mitótico com classificação histológica em graus. Demonstração da distribuição dos índices mitóticos em graus 1, 2 e 3. O índice mitótico aumenta significativamente com o aumento do grau histológico ($P < .0001$).	20
Figura 4	Curva de probabilidade de ocorrência de recidiva local em cães com mastocitoma canino. O índice mitótico (IM) foi fator prognóstico para ocorrência de recidiva local ($P < 0,05$).	20
Figura 5	Curva de sobrevida pelo índice mitótico (IM) estratificado segundo Romansik et al. (2007) dos animais com mastocitoma canino grau 2. IM foi fator prognóstico para a sobrevida ($P < .0001$).	21
Figura 6	Curva de sobrevida pelo índice mitótico (IM) estratificado segundo Romansik et al. (2007) dos animais com mastocitoma canino grau 3. IM não foi fator prognóstico para a sobrevida ($P = 0,9$).	21
Figura 7	Curva de sobrevida pelo índice mitótico (IM) estratificado segundo Elston et al. (2009) dos animais com mastocitoma. IM foi fator prognóstico para a sobrevida ($P < .0001$).	22
Figura 8	Curva de sobrevida pelo índice mitótico (IM) estratificado segundo Elston et al. (2009) dos animais com mastocitoma canino grau 2. IM foi fator prognóstico para a sobrevida ($P < .0001$).	22
Figura 9	Curva de sobrevida estratificada pelo grau histológico de acordo com Kiupel et al. (2011) de cães com mastocitoma canino. Quando analisada isoladamente houve influência sobre a sobrevida ($P < .0001$).	23

Análise de sobrevida e fatores prognósticos de cães com mastocitoma cutâneo

Fernanda S. Natividade^{1*}, Márcio B. Castro¹, Anahí S. Silva¹, Letícia B. de Oliveira¹, Concepta M. McManus¹ & Paula D. Galera¹

ABSTRACT.- Natividade F.S., Silva A.S., Oliveira L.B., McManus C.M., Castro M.B. & Galera P.D. 2013. [**Survival analyses and prognostic markers in canine cutaneous mast cell tumors.**] Análise de sobrevida e fatores prognósticos de cães com mastocitoma cutâneo. Programa de Pós Graduação em Saúde Animal Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Av. L4 Norte Campus Universitário Darcy Ribeiro, Brasília DF 70910-900, Brasil. E-mail: natividade@unb.br

Mast cell tumor (MCT) is the most common malignant cutaneous neoplasm in dogs. Even with several prognostic markers being studied, in attempt to prevent the biological behavior of these tumors, the histological grading is still commonly used to predict behavior, however, it is not significant to predict intermediately differentiated MCT behavior. Different prognostic and cell proliferation markers are being tested with promising results however, the majority of them requires specific staining and immunohistochemical techniques that even nowadays are expensive and not suitable for all veterinarians. Mitotic index is an indirect measure of cell proliferation and it can be established in a common histological microscope slide, and studies indicate it as an important prognostic marker for MCT in dogs. Given the recent publication of the novel two-tier histologic grading system and the unavailability of specific techniques to determine other prognostic markers, this study objective to evaluate the prognostic value of the different grading systems associating with survival and compare it with the mitotic index. Even though both grading systems associate with survival in the univariable analyses ($P<.001$), at the multivariable analyses neither was associated with survival ($P>0,05$), and the mitotic index was the best predictive marker for survival, regardless of the cut-off point used ($P<0,05$), especially when Patnaik grade 2 tumors with unpredictable biological behavior were analysed. The mitotic index was also significantly associated with both local and distant recurrence and paraneoplastic syndrome. In this study, mitotic index was the best prognostic marker, in the absence of specific staining and advanced immunohistochemical techniques, and its use is indicated associated with the histological grading, aiming to add higher prognostic value possible.

INDEX TERMS: Cutaneous mast cell tumor, prognostic markers, mitotic index, dogs.

RESUMO.- O mastocitoma é a neoplasia cutânea maligna de maior frequência em cães. Mesmo com o estudo e desenvolvimento de diversos marcadores prognósticos, na tentativa de prever o comportamento biológico deste tipo de neoplasia, a graduação histológica continua sendo utilizada como principal delineador prognóstico dos animais acometidos, mesmo não conseguindo prever o comportamento de mastocitomas de diferenciação intermediária. Diferentes marcadores de proliferação e atividade celular vêm sendo testados com resultados promissores, entretanto, em sua maioria, demandam técnicas específicas de coloração e imuno-histoquímica que ainda hoje são de alto

custo e muitas vezes não estão facilmente disponíveis. O índice mitótico é um dos métodos indiretos de mensuração da atividade proliferativa celular que pode ser contabilizado em uma lâmina comum de avaliação histológica, e estudos vem determinando-o como importante marcador prognóstico para o mastocitoma canino. Dada a recente publicação sugerindo nova graduação em 2 graus (alto e baixo) e indisponibilidade das técnicas específicas utilizadas na determinação de outros fatores prognósticos, objetivou-se avaliar o poder prognóstico das diferentes classificações, associando-as à sobrevida destes animais e comparando com o índice mitótico. Apesar de isoladamente ambas as classificações histológicas apresentarem associação com a sobrevida ($P < .001$) dos animais acometidos, na análise multifatorial nenhuma foi significativamente associada com a sobrevida ($P > 0,05$). O índice mitótico foi o fator prognóstico mais confiável para sobrevida independente do ponto de corte utilizado ($P < 0,05$), principalmente quanto aos mastocitomas grau 2 de Patnaik et al. (1984) que apresentam comportamento biológico variado, sendo também associado à ocorrência de recidivas tanto locais como distantes e de síndromes paraneoplásicas ($P < 0,05$). Conclui-se ser o índice mitótico o melhor marcador prognóstico na ausência de técnicas específicas mais avançadas. Preconiza-se seu uso associado às graduações histológicas, visando um melhor poder prognóstico.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: mastocitoma cutâneo, marcadores prognóstico, índice mitótico, cães.

INTRODUÇÃO

O mastocitoma cutâneo é a segunda neoplasia maligna mais comum em cães, representando cerca de 20% dos casos, e é a neoplasia cutânea maligna de maior incidência, compreendendo entre 7% e 21% dos animais acometidos por este tipo de tumor (Patnaik et al. 1984, Murphy et al. 2004, Dobson & Scase 2007, Romansik et al. 2007, Costa-Casagrande 2008, Welle et al. 2008, Strefezzi et al. 2010, Kiupel et al. 2011, White et al. 2011, Blackwood et al. 2012, Costa-Poggiani et al. 2012, Mahler 2012, Vascellari et al. 2013). Define-se mastocitoma como uma proliferação neoplásica de mastócitos, os quais têm origem na medula óssea e no tecido conjuntivo, sendo também conhecido como mastocitoma histiocítico ou sarcoma da célula do mastócito, com etiologia desconhecida (De Nardi et al. 2002, Costa-Casagrande 2008, Welle et al. 2008, Blackwood et al. 2012).

O local mais acometido é a pele, embora qualquer órgão ou região corporal possam ser afetados. Seu comportamento biológico é variado e imprevisível, podendo apresentar desde nodulações únicas com comportamento benigno que podem ser tratadas apenas com ressecção cirúrgica até massas múltiplas e metastáticas, com comportamento extremamente maligno e potencialmente fatal, e que exigem tratamento adjuvante (Dobson & Scase 2007, Neto et al. 2008, Kiupel et al. 2011, Costa-Poggiani et al. 2012, Vascellari et al. 2013).

Diversos fatores já foram utilizados na tentativa de prever o comportamento biológico do mastocitoma canino, a exemplo da idade, raça, sexo, estadiamento clínico e localização do tumor, intervalo entre diagnóstico e tratamento, tempo de evolução, ocorrência de sinais sistêmicos, presença de

metástase no momento do diagnóstico, e mais recentemente marcadores de proliferação celular, entre outros, além da gradação histológica – esta, a mais utilizada inclusive, para a determinação de terapia adjuvante (Seguin et al. 2001, Neto et al. 2008, Costa-Poggiani et al. 2012).

Vários autores relatam não haver predisposição quanto ao gênero. Já quanto à raça, alguns autores referem ser o Boxer raça mais predisposta, assim como todas as descendentes do Buldogue, além de Labrador, Dachshund e animais mestiços (De Nardi et al. 2002, Maiolino et al. 2005, Dobson & Scase 2007, Costa-Casagrande 2008, Welle et al. 2008, Strefezzi et al. 2010, Costa-Poggiani et al. 2012). While et al. (2011) ressalta a predisposição de raças de grande porte de desenvolverem mastocitoma cutâneo.

O mastocitoma pode acometer qualquer região corpórea, mas se verifica maior acometimento em membros, região inguinal e prepucial. Acredita-se que mastocitomas localizados em regiões mucocutâneas e na região inguinal apresentem comportamento mais agressivo, embora não seja consenso entre os estudos (Dobson & Scase 2007, Welle et al. 2008, Mahler 2012).

Para gradação histológica, a metodologia mais utilizada é a proposta por Patnaik et al. (1984) que considera a extensão da lesão, celularidade e morfologia celular, figuras de mitose e reação estromal, classificando os tumores em três graus: 1, bem diferenciado, 2 de diferenciação intermediária e 3, pouco diferenciados ou anaplásicos. Baseando-se nesta gradação, cães com mastocitoma grau 1 dificilmente apresentam metástase ou complicações e apresentariam sobrevida mais longa e conseqüentemente melhor prognóstico. Os mastocitomas grau 3 apresentam comportamento agressivo, mais de 80% causariam metástase e morte devido a complicações relacionadas. Já tumores com classificação grau 2, apresentam comportamento biológico variado, entre 5 e 22% causando metástases (Patnaik et al. 1984, Neto et al. 2008, Strefezzi et al. 2010, Kiupel et al. 2011, Blackwood et al. 2012). Como esta classificação em graus baseia-se em fatores subjetivos, provoca discordância e variações nas classificações, principalmente no que se refere aos tumores de diferenciação intermediária, grau 2 (Maiolino et al. 2005, Romansik et al. 2007, Welle et al. 2008, Strefezzi et al. 2010, Kiupel et al. 2011, Thompson et al. 2011, Blackwood et al. 2012), como observado por Kiupel et al. (2011), apenas 75% dos patologistas foram coerentes quanto à classificação do mastocitoma grau 3 e 63% quanto a graus 1 e 2.

O mastocitoma grau 2, mais predominante, possui variação do comportamento biológico, podendo apresentar comportamento benigno ou mais agressivo, levando o clínico a subestimar a agressividade da neoplasia ou a realizar tratamentos agressivos potencialmente tóxicos e desnecessários (Scase et al. 2006, Strefezzi et al. 2010, Kiupel et al. 2011). Diversas pesquisas avaliam a qualidade dos tratamentos disponíveis, sem se aterem ao fato de que a maioria dos mastocitomas graus 1 e 2 são tratados com sucesso realizando-se apenas a ressecção cirúrgica com margens limpas (Seguin et al. 2001, Dobson & Scase 2007).

Além da gradação histológica, patologistas de todo o mundo vêm buscado a identificação de marcadores prognósticos do mastocitoma, a exemplo do índice mitótico. Busca-se, desta forma, prever o comportamento biológico desta neoplasia e concomitantemente delinear tratamentos mais efetivos que repercutam positivamente na sobrevida destes animais (Seguin et

al. 2001, Scase et al. 2006, Welle et al. 2008, Strefezzi et al. 2010, Vascellari et al. 2013).

O índice mitótico (IM) é um dos métodos indiretos de mensuração da atividade proliferativa celular, baseado na quantificação das figuras de mitose em uma lâmina de histologia corada com hematoxilina eosina. Segundo Romansik et al. (2007), após uma avaliação geral da amostra em microscopia de luz, deve-se selecionar a área de maior atividade celular para submetê-la a contagem de figuras de mitose. A contagem é feita em 10 campos de grande aumento (400X) com campos de 2,7 mm². Comparativamente a outros fatores prognósticos, o exame constitui-se em um método simples, que não requer colorações adicionais e técnicas de imuno e histoquímicas especiais, apresenta fácil execução e baixo custo (Romansik et al. 2007, Strefezzi et al. 2010).

Em seu estudo, Romansik et al. (2007) observaram que o índice mitótico teve relação direta com a graduação de Patnaik et al. (1984), além de observarem que o tempo médio de sobrevida em cães com IM \leq 5 foi significativamente maior (70 meses) que cães com IM $>$ 5 (2 meses), independente do grau histológico. Buscando maior acurácia, o estudo de Elston et al. (2009) propõe uma estratificação em 3 grupos, com pontos de corte em 1 e 7 figuras de mitose em 10 campos de grande aumento. Segundo Vascellari et al. (2013) o índice mitótico é uma mensuração objetiva e pode diminuir a variação inter observador na avaliação histológica dos mastocitomas caninos e propõe que o problema principal seria a determinação do melhor ponto de corte já que diferentes estudos sugerem diferentes pontos.

A fim de dirimir discordâncias entre patologistas e ampliar o acerto prognóstico mediante a avaliação histológica, Kiupel et al. (2011) recentemente sugeriram um novo sistema de classificação em dois grupos histológicos para os mastocitomas: alto grau e baixo grau. Segundo eles, os mastocitomas de alto grau devem apresentar qualquer uma das seguintes características: pelo menos 7 figuras de mitose em 10 campos de grande aumento; pelo menos 3 células multinucleadas (com 3 ou mais núcleos) em 10 campos de grande aumento; pelo menos 3 núcleos bizarros em 10 campos de grande aumento; cariomegalia (diâmetros nucleares de pelo menos 10% das células neoplásicas variando em pelo menos o dobro). Para as avaliações destes diferentes parâmetros são selecionados os campos de maior atividade celular ou maior grau de anisocariose. Segundo os autores, mastocitomas de alto-grau apresentaram evolução mais rápida quanto à apresentação de metástases ou ao surgimento de novos tumores, bem como menor sobrevida, de aproximadamente quatro meses, em contraste aos dois anos de sobrevida em animais com tumores de baixo grau.

Sabe-se que a é rotineira a presença de eosinófilos em amostras histológicas de mastocitoma cutâneo. A presença destas células pode ser justificada devido resposta inflamatória local ou por quimiotaxia exercida pela liberação de conteúdo dos grânulos intracitoplasmáticos (Blackwood et al. 2012). Até o presente momento, no conhecimento dos autores, não há dados publicados quanto a possível associação da quantidade destas células com o prognóstico da doença.

A crescente incidência desta neoplasia instiga a busca pela determinação do prognóstico de nossos pacientes, bem como o estabelecimento do melhor tratamento. Frente aos resultados conflitantes quanto ao ponto de corte para o índice mitótico bem como às vantagens

relatadas para a classificação em alto e baixo grau, objetivou-se, neste estudo, avaliar, de forma comparativa, o índice mitótico como marcador prognóstico (Romansik et al. 2007), a classificação em alto e baixo grau (Kiupel et al. 2011) e a graduação histopatológica tradicional (Patnaik et al. 1984). Pretendeu-se, desta forma, determinar qual o fator prognóstico mais confiável para cães com mastocitoma cutâneo dentre estes três fatores propostos, e verificar se há correlação entre eles e a presença de eosinófilos no tumor.

MATERIAIS E MÉTODOS

O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética de Uso Animal do Instituto Biológico da Universidade de Brasília sob o protocolo nº 15346/2012.

Foi realizado um levantamento dos casos de mastocitoma cutâneo canino do Laboratório de Patologia Veterinária do Hospital Veterinário da Universidade de Brasília (LPV-HVET/UnB), seguido de análise retrospectiva nos prontuários dos pacientes atendidos pelo Serviço de Clínica Cirúrgica do Hospital Veterinário da Universidade de Brasília. Selecionaram-se pacientes acometidos por mastocitoma cutâneo canino que foram submetidos à exérese tumoral e receberam diagnóstico histológico por este mesmo laboratório, no período de janeiro de 2005 a setembro de 2012.

O histórico e o acompanhamento dos animais foram avaliados a partir dos prontuários médicos, que informaram gênero, raça, idade do animal, idade do animal à manifestação da doença (sendo considerada a data na qual o nódulo foi observado pelo proprietário), localização e tamanho do tumor, número de nódulos (único ou múltiplo), ocorrência de metástase local ou distante, ocorrência de recidivas locais ou distantes (quando o desenvolvimento de um novo mastocitoma se deu em localização diversa ao local primeiramente acometido, segundo Seguin et al. 2001)), ocorrência de sinais clínicos associados à síndrome paraneoplásica e data do óbito associado à doença, quando ocorrido.

Utilizando-se do arquivo de peças histológicas do LPV-HVET, foram reavaliadas todas as amostras classificadas como mastocitoma cutâneo canino. Assim que recebidas, todas as amostras foram fixadas em formol tamponado e posteriormente seguiram para processamento histológico rotineiro. Realizaram-se cortes que foram rotineiramente corados com hematoxilina eosina para avaliação histológica.

Objetivando diminuir a margem de erro nas análises histológicas, as amostras foram avaliadas e classificadas separadamente, às cegas, por três patologistas (A.S.S, L.B.O, M.B.C), sendo realizada posteriormente uma acareação entre eles para discussão dos casos onde houve discordância na classificação e sendo priorizada a concordância entre pelo menos dois patologistas para definição da classificação final daquela amostra. A classificação final foi determinada por consenso entre os patologistas como realizado por Elston et al. (2009).

A graduação histológica seguiu, primeiramente, a descrição proposta por Patnaik et al. (1984) para classificação do mastocitoma em graus 1, 2 e 3. Em cães com múltiplos tumores e diferentes graduações histológicas, apenas a graduação mais alta foi considerada para a análise estatística (Costa-Poggiani et al. 2012). Posteriormente, o índice mitótico (IM) foi estabelecido com a contagem de figuras de mitose em dez campos de grande aumento, segundo

descrito por Romansik et al. (2007) nas lâminas previamente classificadas, sendo posteriormente dividido em dois grupos, $IM \leq 5$ e $IM > 5$. Seguiu-se análise do ponto de corte para o índice mitótico (Elston et al., 2009) em 3 grupos: $IM=0$, IM entre 1 e 7 e $IM > 7$. Foram, ainda, reavaliados e reclassificados os mastocitomas caninos em alto-grau e baixo-grau segundo Kiupel et al. (2011).

Estabeleceu-se, ainda, a análise quantitativa de eosinófilos na região de maior atividade celular, classificando-a em cruzes, sendo zero a ausência de eosinófilos, uma cruz (+), discreta quantidade de eosinófilos, duas cruzes (++) quantidade moderada, e três cruzes (+++) evidenciando eosinófilos em quantidade abundante.

Para estabelecimento da sobrevida, baseando-se nos dados dos prontuários e/ou contato com os proprietários, foram obtidas informações quanto à data do óbito e sua provável relação com a doença e quanto ao tempo de sobrevida após diagnóstico, sendo realizado no mínimo um ano de observação e acompanhamento pós-operatório.

Os pacientes que se encontravam vivos, após consentimento de seus proprietários, foram avaliados mediante exame clínico. Quando possível, foram realizados exames de auxílio diagnóstico (hemograma completo e série bioquímica, ultrassonografia abdominal, radiografia torácica e abdominal, punção de nódulos existentes e de linfonodos reativos para avaliação citológica), objetivando localizar possíveis recidivas locais ou distantes e ocorrência de metástases nestes animais.

Foi considerada ocorrência de síndrome paraneoplásica a apresentação de sinais clínicos sistêmicos associados à degranulação dos mastócitos, repercutindo em vômitos, diarreia, hipotensão, anemia ferropriva, perfuração gástrica e peritonite, além de choque anafilático e colapso. Normalmente a síndrome paraneoplásica ocorre em cães com a doença disseminada ou extensa (London & Seguin 2003, Welle et al. 2008, Blackwood et al. 2012).

Os dados analisados através do Programa SAS® (Statistical Analysis System, Cary, North Carolina) para realização do teste de χ^2 para análise de frequências. Adicionalmente, realizou-se regressão logística e *lifetest* para avaliar a influência sobre a sobrevida dos seguintes fatores: tamanho do nódulo, classificação do mastocitoma em graus 1, 2 e 3 (Patnaik et al. 1984), e em alto e baixo grau (Kiupel et al. 2011), índice mitótico (Romansik et al. 2007), idade do animal e contagem de eosinófilos. Avaliou-se, também, a ocorrência de metástases, recidivas locais ou distantes e ocorrência de síndrome paraneoplásica. Posteriormente, realizou-se análise de variância para modelos não paramétricos (Glimmix), a fim de identificar a influência de todas as variáveis sobre o tempo de sobrevida. Por fim, aplicou-se o teste de correlação de Spearman, avaliando a correlação entre os dados analisados. Gráficos foram gerados a partir do *lifetest*.

RESULTADOS

Diagnosticaram-se 98 casos como mastocitoma cutâneo em cães no período de 2005 a 2012 pelo LPV-HVET. Destes, dez casos foram identificados e considerados como recidivas e os animais foram submetidos a novos procedimentos cirúrgicos, totalizando 88 cães acometidos com mastocitoma cutâneo neste período. O tempo de acompanhamento pós-operatório dos

animais acometidos foi, no máximo de 90 meses e no mínimo de 12 meses, sendo a maior sobrevida observada de 67 meses.

Dentre os animais acometidos, 43 eram machos e 45 fêmeas. A idade de acometimento variou entre três e 14 anos, tendo como idade média 8,86 anos, sendo nove a idade de maior frequência (moda). Vinte e três raças foram acometidas, sendo Boxer (n=20), Labrador (n=12), Sem Raça Definida (n=11), Pit Bull (n=8), Fila Brasileiro (n=5) e Poodle (n=5) as mais prevalentes; as 17 outras raças foram representadas por um a três animais cada.

Até a data em que este estudo foi finalizado, dos 88 animais acometidos, 53 vieram a óbito ou foram eutanasiados em decorrência da doença, 24 encontravam-se vivos e com 11 não se conseguiu contato, provavelmente por alteração de dados de telefone dos prontuários. Metástase em linfonodos ou órgãos distantes foi diagnosticada em sete animais. A ocorrência de síndrome paraneoplásica foi observada em 20 casos. A recidiva ocorreu em 12 cães localmente e em 22 à distância. A ocorrência de síndrome paraneoplásica foi significativamente associada à presença de metástases ($P<0,05$) e de recidivas locais ($P<0,05$).

O tamanho dos nódulos variou entre 0,3 e 20 centímetros, apresentando em média 4,28 cm, sendo um centímetro o tamanho do tumor mais frequente. O tamanho do nódulo teve relação significativa inversamente proporcional com a sobrevida ($P<0,05$). Também houve associação significativa com ocorrência de síndrome paraneoplásica e de recidiva local ($P<0,05$). Os locais de acometimento foram membros (n=21), bolsa escrotal (n=13) e tórax (n=11). Outras 28 ocorrências foram distribuídas entre cabeça, pescoço, dorso, abdômen e região perianal. Em 15 animais foi observada a apresentação múltipla (acometendo mais de um local no momento diagnóstico).

Em relação à classificação histológica dos mastocitomas cutâneos, (Patnaik et al. 1984) sete amostras foram classificadas em grau 1 (7,95%), sendo que estes animais não atingiram um tempo médio de sobrevida (CI 95%), devido ao fato de animais deste grupo apresentarem alta probabilidade de sobrevida após 60 meses; 70 amostras foram classificadas em grau 2 (79,55%), cujos animais apresentaram tempo médio de sobrevida de 50,73 meses (CI 95%); e 11 amostras foram classificadas em grau 3 (12,5%), e os animais apresentaram tempo médio de sobrevida 12,22 meses (CI 95%). A correlação da sobrevida com a classificação em graus foi estabelecida com um número reduzido de animais (n=74), excluídos os casos nos quais não se conseguiu contato ou que não apresentavam dados completos em seus prontuários. Ressalta-se o fato de que animais nos quais foi utilizada quimioterapia citorrredutora os graus histológicos podem ter sido influenciados.

Quando analisada isoladamente, a classificação de Patnaik apresentou correlação significativa com a sobrevida ($P<.001$), maior o grau, menor a sobrevida. Considerando a análise de sobrevida estratificada pela graduação de Patnaik (Fig. 1), mastocitomas grau 2 apresentaram probabilidade de sobrevida de 0,86 (n=41, CI 95%) e 0,80 (n=25, CI 95%) aos sete e 24 meses, respectivamente. Já os tumores grau 3 apresentaram probabilidade de sobrevida de 0,44 (n=5, CI 95%) aos 8 meses e apenas 2 animais sobreviveram mais de 12 meses.

Quando realizada a análise multifatorial, a correlação da classificação histológica em graus com a sobrevida não foi significativa ($P>0,05$). Porém, foi diretamente relacionada à ocorrência de recidiva local ($P<.0001$), sendo que

amostras classificadas com maior grau apresentam maior probabilidade de desenvolvimento de recidiva local. Neste estudo, mastocitomas grau 1 tiveram 0 (zero) como valor médio de IM, mastocitomas grau 2 apresentaram IM médio de 0,89 (0-12) e mastocitomas grau 3 apresentam IM médio de 11,4 (0-30).

O índice mitótico foi estabelecido para todas as amostras, sendo adotado o ponto de corte descrito por Romansik et al. (2007) de até 5 figuras de mitose em 10 campos de grande aumento em região de maior atividade celular, ficando 77 amostras abaixo do ponto de corte ($IM \leq 5$) com tempo médio de sobrevida de 50,15 meses (CI 95%) e 11 acima ($IM > 5$), com tempo médio de sobrevida de 12,8 meses (CI 95%). Além de significativamente associado à sobrevida, demonstrado pelas diferenças nas curvas de sobrevida dos dois grupos ($P < 0,05$) (Fig.2), também foi associado à classificação histológica em graus ($P < .0001$), sendo que amostras classificadas com maior grau tendem a apresentar maior quantidade de figuras de mitose (Fig. 3). O índice mitótico também foi estatisticamente associado à ocorrência de recidivas tanto locais ($P < 0,05$) (Fig. 4) como distantes ($P < 0,05$) e de síndrome paraneoplásica ($P < 0,05$). Quando analisados apenas animais com classificação Patnaik grau 2 ($n=70$), também houve influência do IM destes casos sobre a sobrevida (Fig. 5), sendo que animais com $IM > 5$ apresentaram tempo médio de sobrevida de 12,4 (CI 95%) meses, enquanto animais com $IM \leq 5$ apresentaram 52,47 (CI 95%) meses de tempo médio de sobrevida ($P < .0001$). Já para animais com classificação de Patnaik grau 3, o IM não apresentou influência sobre a sobrevida ($P=0,9$), animais $IM \leq 5$ apresentaram tempo médio de sobrevida de 16,4 meses (CI 95%), enquanto que animais $IM > 5$ tiveram tempo médio de sobrevida de 13,2 meses (CI 95%) (Fig. 6). Entretanto, apenas um animal grau 3 e $IM > 5$ sobreviveu mais de 9 meses, influenciando negativamente os resultados estatísticos, já que a probabilidade de sobrevida até 9 meses foi de apenas 0,2 ($n=1$, CI 95%) para estes animais, e para animais com mastocitomas grau 3 e $IM \leq 5$ a probabilidade de sobreviver até 13 meses foi de 0,4 ($n=2$, CI 95%).

Quando utilizado o ponto de corte sugerido por Elston et al. (2009), também houve correlação estatisticamente significativa com a sobrevida ($P < .0001$), sendo que animais do grupo $IM=0$ ($n=53$) não alcançaram o tempo médio de sobrevida, com 22 animais ainda vivos ao final do estudo. Os animais do grupo $IM 1-7$ ($n=14$), apresentaram tempo de sobrevida média de 19,21 meses (CI 95%) e probabilidade de sobrevida aos 12 meses de 0,45 ($n=6$, CI 95%); os do grupo $IM > 7$ ($n=6$), apenas 5,33 meses (CI 95%) com 0,5 de probabilidade de sobrevida aos 3 meses ($n=3$, CI 95%), e ambos os grupos tinham apenas um animal vivo ao final do estudo (fig. 7). A mesma correlação foi encontrada avaliando-se apenas os animais classificados como grau 2 de Patnaik et al. (1984) ($P < .0001$), com sobrevidas médias de 22 e 2 meses para os grupos $IM 1-7$ e $IM > 7$, respectivamente (Fig. 8).

Quando utilizada a nova classificação sugerida por Kiupel et al. (2011), 17 amostras foram classificadas como alto grau (19,32%) tendo uma sobrevida média de 10,88 meses (CI 95%) e probabilidade de sobrevida de 6 meses menor que 0,5 ($n=6$, CI 95%) e 71 como baixo grau (80,68%) com sobrevida média de 55,49 meses (CI 95%), com probabilidade de sobrevida aos 7 meses de 0,92 ($n=46$, CI 95%) (Fig. 9). Quando analisada isoladamente, esta classificação também foi significativamente associada à probabilidade de sobrevida, na qual animais classificados como alto grau tendem a apresentar

menor sobrevida ($P < .0001$). Já na análise multifatorial, esta classificação não apresentou correlação estatisticamente significativa com a sobrevida ($P > 0,05$), porém houve correlação com a ocorrência de recidiva local ($P < 0,05$), sendo que neoplasias classificadas como alto grau apresentaram maior incidência de recidiva local ($n=6$). Esta classificação também foi significativamente associada ao tamanho dos nódulos, neoplasias maiores tendendo a ser classificadas como alto grau ($P < .0001$).

Comparando as classificações de Patnaik et al. (1984) e Kiupel et al. (2011) houve associação estatisticamente significativa na qual mastocitomas com graduação maior tendem a ser classificados como alto grau ($P < .0001$). No presente estudo, todos os mastocitomas grau 1 foram classificados como baixo grau ($n=7$), 90% ($n=63$) dos graduados como 2 foi classificado como baixo grau e apenas 10 % ($n=7$) foi classificado como alto grau. Dentre os tumores graduados como grau 3 ($n=11$), 10 foram classificados como alto grau e apenas 1 como baixo grau.

A quantificação de eosinófilos no tumor não foi significativamente associada à sobrevida total dos animais acometidos, não se observando correlação estatística com nenhuma das variáveis. A distribuição da contagem de eosinófilos está ilustrada no quadro 1, sendo observada maiores quantidades de eosinófilos nos mastocitomas grau 2.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Os mastocitomas cutâneos são neoplasias de alta incidência em cães, e de comportamento variado. A graduação histológica é amplamente utilizada para prever seu comportamento biológico, sendo considerado o fator prognóstico mais consistente, embora não consiga prever o comportamento de todos os mastocitomas cutâneos, principalmente os de diferenciação intermediária (London & Seguin 2003, Romansik et al. 2007).

O mastocitoma cutâneo acomete geralmente animais idosos, podendo também ser observado em filhotes e cães jovens. Neste estudo, apesar da ampla faixa etária de animais acometidos, verificou-se que a idade média de acometimento foi de 8 a 9 anos, corroborando com a maioria dos relatos (London & Seguin 2003, Fulcher et al. 2006, Dobson & Scase 2007, Welle 2008, Strefezzi et al. 2010, Blackwood et al. 2012, Costa-Poggiani et al. 2012, O'Connel & Thomson 2011, Zieckman et al. 2013), e um pouco aquém da faixa etária descrita por Costa-Casagrande et al. (2008), que observaram maior incidência em animais entre 9 e 11 anos de idade.

Assim como previamente descrito por diversos autores, não se observou, neste estudo, correlação entre o gênero e a incidência do tumor (London & Seguin 2003, Murphy et al. 2004, Fulcher et al. 2006, Preziosi et al. 2007, Dobson & Scase 2007, Costa-Casagrande et al. 2008, Welle 2008, Strefezzi et al. 2010, Monteiro et al. 2011, Blackwood et al. 2012), embora alguns autores relatem predisposição por fêmeas (O'Connel & Thomson 2011) castradas e machos inteiros (White et al. 2011).

Diversas raças foram acometidas pelo mastocitoma canino, verificando-se maior predisposição das raças Boxer, Labrador e cães sem raça definida, à similitude do observado por Costa-Poggiani et al. (2012). Os cães das raças Boxer e Labrador foram relatados como predispostos em vários estudos (London & Seguin 2003, Murphy et al. 2004, Dobson & Scase 2007, Welle et al.

2008, Strefezzi et al. 2010, Monteiro et al. 2011, Blackwood et al. 2012). Recentemente, White et al. (2011) confirmaram a maior incidência do mastocitoma nestas raças e adicionaram o Rhodesian e Weimaraner, além de referirem que raças de maior porte apresentam maior risco de desenvolver mastocitomas cutâneos. Dobson & Scase (2007), Welle et al. (2008) e Blackwood et al. (2012) reportam que, no Boxer, o comportamento do tumor tende a ser menos agressivo comparativamente ao evidenciado no Labrador e no Sharpei. A grande incidência de cães sem raça definida (SRD) corrobora com resultados apresentados por Costa-Casagrande et al. (2008), associando a grande casuística destes animais na Medicina Veterinária no Brasil.

Fatores limitantes em estudos retrospectivos são dados incompletos dos prontuários dos animais, assim como interrupção acompanhamento clínico e a desatualização dos dados de pacientes mais antigos. Portanto, a análise das variáveis como metástase, recidiva local ou distante e síndrome paraneoplásica, foi prejudicada já que se obtiveram dados de um número reduzido de animais para realização das análises, e os resultados decorrentes destas foram espandidos para o número total de animais.

O tamanho médio dos nódulos observado neste estudo foi aproximadamente de 4,28cm, semelhante ao descrito por Monteiro et al. (2011) ($26,2\text{cm}^2 \cong 5\text{cm}$), por Costa-Poggiani et al. (2012) ($39\text{cm}^3 \cong 3,39\text{cm}$) e por Seguin et al. (2006) (3cm). Entretanto, são dados que diferem do apresentado por Seguin et al. (2001) de 2cm, por Sfiligoi et al. (2005) que apresentou mediana de 1,5cm, e por Fulcher et al. (2006) com média de 1,3cm. Ressaltam-se, nestes estudos, que os intervalos foram menores do que os observados no presente trabalho, sendo 1-15cm, 0,4-3,1cm e 1-4cm respectivamente, comparativamente ao intervalo de 0,3-20cm, elevando, assim, o valor do tamanho médio dos tumores.

Mediante análise multifatorial, o tamanho do nódulo foi diretamente associado à sobrevida, o que difere do encontrado por alguns autores (Sfiligoi et al. 2005, Fulcher et al. 2006), mas corrobora com Welle et al. (2008), que afirmam que tumores maiores tendem a apresentar pior prognóstico. Já quanto à recidiva local, houve correlação significativa com o tamanho do nódulo, a exemplo do descrito por Donnelly et al. (2013), que observaram que tumores completamente excisados que apresentaram recidiva eram significativamente maiores que aqueles que não recidivaram. Monteiro et al. (2011) ressaltam que tumores de maior tamanho apresentam maior risco de não serem completamente excisados, e neoplasias com tamanho superior a três centímetros possuem maior risco de apresentarem recidiva local (O'Connell & Thomson 2011).

Os membros constituíram o principal sítio de acometimento do mastocitoma (23,8%), o que também foi observado por Costa-Poggiani et al. (2012), seguidos da bolsa escrotal (14,8%), conforme anteriormente reportado por Maiolino et al. (2005), Seguin et al. (2006), Cooper et al. (2009) e Monteiro et al. (2011). Entretanto, outros pesquisadores reportaram maiores incidências em outras localidades, como abdômen (Simoies et al. 1994), tronco (Fulcher et al. 2006, Welle et al. 2008) e região inguinal (Sfiligoi et al. 2005). Verifica-se, desta forma, a falta de um comportamento padrão quanto ao sítio de eleição deste tumor.

O comportamento mais agressivo tem sido atribuído aos mastocitomas localizados em regiões mucocutâneas e região inguinal, principalmente em

machos (Dobson & Scase 2007). Já Costa-Poggiani et al. (2012) não observaram correlação entre prognóstico e localização, entretanto dois animais deste estudo que apresentaram tumores na região inguinal apresentaram apenas 4 meses de sobrevida. Em um estudo para determinar o prognóstico de mastocitomas em região inguinal, verificou-se que esta localização não foi significativamente associada à sobrevida nem à recidiva local (Sfiligoi et al. 2005). Além disto, verificaram que mastocitomas em região inguinal, ao contrário do que se acreditava, não pioram o prognóstico da doença, conforme observado também no presente estudo. Blackwood et al. (2012) ressaltam a possibilidade de esta localização ser considerada de difícil acesso cirúrgico, portanto mais agressivos.

Segundo O'Connel & Thomson (2011), mastocitomas em regiões mucocutâneas não foram associados com pior prognóstico, bem como neoplasias localizadas nas extremidades repercutiram em melhor prognóstico, provavelmente por permitirem melhor visibilização e diagnóstico rápido, favorecendo o tratamento precoce. Ressalta-se, porém, que a localização do tumor não deveria sobrepor outros fatores prognósticos importantes e mais específicos na determinação da agressividade do tumor (Cooper et al. 2009).

A apresentação do mastocitoma em múltiplos locais foi observada em 15 animais (17,04%) deste estudo, similar aos 18% observados por Sfiligoi et al. (2005), próximo ao observado por Murphy et al. (2004) de 13% e por Murphy et al. (2006) de 21%. Estes resultados encontram-se, ainda, dentro do que foi descrito por Welle et al. (5-25%) e por Blackwood et al. (2012) (10-21%). Porém, difere da apresentação de 36% (Fulcher et al. 2006).

Murphy et al. (2006) não observaram correlação da apresentação múltipla do tumor com pior prognóstico. Alguns autores afirmam que, algumas raças, a exemplo do Pug, Boxer e Golden Retriever, tendem a apresentar mais de um tumor no mesmo momento diagnóstico, e o que anteriormente era classificado como doença metastática ou recidiva distante associada a pior prognóstico, deveria ser tratado da mesma maneira que um cão com apenas um nódulo de mesmo grau histológico. Sugerem, ainda, que sejam incluídos outros critérios para o estadiamento clínico, como acometimento de linfonodos regionais e órgãos distantes (Dobson & Scase 2007, Blackwood et al. 2012, O'Connel & Thomson 2011). No estudo aqui apresentado não se verificou associação da ocorrência de neoplasias múltiplas com pior prognóstico, como também observado por Costa-Poggiani et al. (2012).

Verificou-se que aproximadamente 80% dos casos foram classificados como grau 2, resultado que difere do descrito por diversos autores (Patnaik et al. 1984, Murphy et al. 2006, Preziosi et al. 2007, Costa-Casagrande et al. 2008, Vascellari et al. 2013), mas assemelha-se ao encontrado por Scase et al. (2006), Romansik et al. (2007), Costa-Poggiani et al. (2012) e Donnelly et al. (2013). O tempo de sobrevida média destes animais foi significativamente superior aos que apresentaram mastocitoma grau 3, corroborando com literatura anterior (Vascellari et al. 2013).

Na tentativa de diminuir a ambiguidade da classificação dos mastocitomas em grau 2, sugeriu-se a nova classificação em dois graus proposta por Kiupel et al. (2011), em baixo e alto grau. Neoplasias classificadas como alto grau apresentam alto risco de comportamento agressivo e as de baixo grau devem ser monitoradas quanto a outros fatores prognósticos, a exemplo da expressão de KIT (Kiupel et al. 2011, Vascellari et al. 2013). Neste

estudo, 80% dos tumores foram classificados em baixo-grau e 20% em alto-grau, próximo ao observado por Costa-Poggiani et al. (2012) de 70% de baixo-grau e 30% de alto grau. No presente estudo, esta classificação apresentou correlação com a sobrevida mediante análise unifatorial, corroborando com Kiupel et al. (2011), e correlação com a recidiva local na análise multifatorial. Segundo Donnelly et al. (2013), neoplasias classificadas como alto grau tendem a apresentar recidiva local, independente da margem cirúrgica. Embora a classificação de Patnaik et al. (1984) ainda seja a mais utilizada, a classificação sugerida por Kiupel et al. (2011) tende a se tornar mais difundida entre os patologistas veterinários (Blackwood et al. 2012).

Quanto à distribuição dos mastocitomas graduados segundo Patnaik et al. (1984) em relação à classificação de Kiupel et al. (2011) observou-se, como esperado, que todos os tumores classificados como grau 1 também o foram como baixo-grau, 90% dos mastocitomas grau 2 foram classificados como baixo-grau e 10% como alto-grau e apenas 1 cão classificado como grau 3 também o foi como baixo-grau, sendo todos os outros classificados como alto-grau, dados semelhantes aos apresentados por Vascellari et al. (2013). Baseado na distribuição observada neste estudo e no estudo de Kiupel et al. (2011), a maioria dos mastocitomas grau 2 apresentaria um comportamento benigno.

No presente estudo confirmou-se a correlação do índice mitótico com o grau histológico, verificando-se que quanto maior o grau histológico, maiores índices mitóticos médios, corroborando com Romansik et al. (2007). Em relação à sobrevida, o índice mitótico apresentou correlação positiva significativa independente do ponto de corte utilizado. Esta correlação tem implicação direta sobre os mastocitomas classificados como grau 2, cujo comportamento biológico é amplo, e cujo índice mitótico pode auxiliar no delineamento da terapêutica mais apropriada (Romansik et al. 2007, Monteiro et al. 2011, Thompson et al. 2011, Blackwood et al. 2012). Apesar de não ter se verificado neste estudo a associação significativa com ocorrência de metástases, como observado por Romansik et al. (2007), o índice mitótico foi associado à ocorrência de recidiva local, a exemplo do observado por Kiupel et al. (2011), e à presença de síndrome paraneoplásica. Também na análise multifatorial, verificou-se que a ocorrência de recidiva local e síndrome paraneoplásica foram significativamente associadas com a ocorrência de metástases e de pior prognóstico, concluindo-se estar o índice mitótico também associado à ocorrência destes eventos. Consequentemente, maior o índice mitótico, pior prognóstico para o animal, conforme relatado por Romansik et al. (2007).

Relativamente ao ponto de corte ideal, diferentes trabalhos citam valores distintos. Neste estudo, ambos os pontos de cortes sugeridos apresentaram correlação significativa com a sobrevida (Romansik et al. 2007, Elston et al. 2009). Entretanto, considerando os resultados quanto à probabilidade de sobrevida e sobrevida média do grupo IM=0, talvez fosse importante isolar este grupo quanto à avaliação do prognóstico e manter o ponto de corte mais conservador de até 5 figuras de mitose. Entretanto, isto não isentaria o clínico de questionamentos quanto ao tratamento, à similitude do que se verifica quando se considera a classificação em 3 graus (Patnaik et al. 1984). Observa-se, portanto, a necessidade de estudos que apresentem uma amostragem

maior, a fim de definir um valor específico para o índice mitótico que seja baseado tanto em cálculos estatísticos quanto em observações clínicas.

Blackwood et al. (2012) sugerem utilização do ponto de corte de até 5 para a associação com a sobrevida e de até 7 para a associação com a recidiva local. Verificou-se, neste estudo, que o ponto de corte 5 foi associado tanto à sobrevida quanto a recidiva local. Comparando os resultados encontrados na literatura disponível com a casuística deste estudo, sugerimos utilização do ponto de corte definido por Romansik et al. (2007) em 2 grupos de até 5 figuras de mitose e maior que cinco figuras de mitose em 10 campos de grande aumento, por estar estatisticamente associado a vários eventos determinantes para o prognóstico e sobrevida destes animais. Além de ser o valor mais conservador, o grupo IM=0 seria incluído no grupo de até 5 figuras de mitose, que possivelmente apresentarão melhor prognóstico e sobrevida.

Neste trabalho, a classificação histológica de Patnaik et al. (1984), assim como a nova classificação sugerida por Kiupel et al. (2011), quando submetidas à análise multifatorial, não foram significativamente correlacionadas com a sobrevida. Comparativamente, o índice mitótico foi considerado o fator prognóstico superior em relação a sobrevida, independente da graduação utilizada, também devido ao fato de estar associado a outros diversos fatores que influenciam o prognóstico, como recidivas locais e à distância e a ocorrência de síndrome paraneoplásica. Esta observação corrobora com Preziosi et al. (2007), que consideraram o índice mitótico um indicador prognóstico confiável, juntamente com a invasão tecidual.

Estudos desta natureza devem ser incentivados, dada a falta de consenso. Há quem afirme que o melhor fator prognóstico continua sendo a classificação do mastocitoma em graus (Cooper et al. 2009, Blackwood et al. 2012, O'Connel & Thomson 2011). A despeito disto, deve-se considerar que, mesmo havendo duas possíveis graduações histológicas e ambas apresentarem valor prognóstico, outros marcadores prognósticos devem ser associados (Vascellari et al. 2013). Estes autores observaram que o índice mitótico, juntamente com a expressão da proteína Ki67, foram os melhores marcadores prognósticos para mastocitomas cutâneos caninos.

Ressalta-se que a observação isolada do índice mitótico requer interpretação cautelosa, já que outros fatores histológicos podem aumentar o risco, como observado neste estudo quanto aos mastocitomas de grau 3, nos quais o índice mitótico não foi prognóstico e a probabilidade de sobrevida a longo prazo foi baixa para ambos os grupos. O ideal é que o IM seja associado a outras classificações, já que nenhum marcador prognóstico isoladamente conseguiu prever o comportamento biológico dos mastocitomas caninos (Vascellari et al. 2013). Deve-se destacar o potencial prognóstico de outras técnicas como Ki-67, o padrão KIT, PCNA e AgNOR, a despeito da necessidade de colorações específicas e técnicas imuno-histoquímicas dificultando sua utilização rotineira (Romansik et al. 2007), além do fato ressaltado por Blackwood et al. (2012) de que a contagem de AgNOR e PCNA não são marcadores prognósticos independentes, ou seja, não conseguem prever o comportamento clínico dos mastocitomas independente da classificação histológica. Devido a fatores externos, estudos imuno-histoquímicos não foram realizados nesta pesquisa, não sendo possível avaliar, para a amostra estudada, o poder prognóstico destas técnicas

promissoras, principalmente em relação ao padrão KIT e a expressão da proteína Ki-67.

Todos os animais utilizados neste estudo foram submetidos à exérese cirúrgica com margens laterais amplas (2-3 centímetros) e plano fascial profundo como parte do tratamento, como é preconizado na literatura. A técnica é considerada eficiente para mastocitomas grau 1 e a maioria dos grau 2 não metastáticos (Seguin et al. 2001, Sfiligoi et al. 2005, Fulcher 2006, Camps-Palau et al. 2007, Dobson & Scase 2007, Costa-Casagrande et al. 2008, Monteiro et al. 2011, Blackwood et al. 2012, Zieckman et al. 2013). Embora seja indicada a radioterapia nos casos que apresentaram exérese cirúrgica incompleta (Blackwood et al. 2012), este tratamento é indisponível na maior parte dos Hospitais Veterinários brasileiros. Neste estudo estes animais foram submetidos a novo procedimento cirúrgico objetivando ampliação de margens, que foram histologicamente atestadas livres de células neoplásicas.

Mastócitos são importantes células envolvidas na defesa do organismo, principalmente em reações de hipersensibilidade e processos inflamatórios. Conseqüentemente, muitas células visibilizadas na periferia dos nódulos podem ser células normais, envolvidas na reação inflamatória local ou, atraídas pelo mastocitoma, podendo não ter sido diferenciadas entre células neoplásicas e células normais da pele, comprometendo uma margem cirúrgica que originalmente estaria livre de células neoplásicas (Murphy et al. 2004, Seguin et al. 2006).

Considera-se, ainda, que vários mastocitomas classificados como grau 2 que são incompletamente excisados não recidivam, sugerindo que mastócitos visibilizados nas margens cirúrgicas podem não ser neoplásicos (Murphy et al. 2004, Blackwood et al. 2012).

A síndrome paraneoplásica foi associada, neste estudo, ao tamanho da neoplasia, ao índice mitótico, à ocorrência de recidivas locais e de metástases. A correlação encontrada pode auxiliar o clínico, sugerindo tratamento mais agressivo em animais com nódulos maiores e com índices mitóticos mais elevados, objetivando prevenir a ocorrência das recidivas e de metástases que também estão associadas nesta síndrome.

A quantificação de eosinófilos não apresentou correlação significativa com nenhuma das variáveis analisadas. Sabe-se que devido a liberação de fatores quimiotáticos e resposta inflamatória local, eosinófilos são comumente observados nos mastocitomas cutâneos (Blackwood et al. 2012), entretanto aparentemente não há correlação com o prognóstico.

Os mastocitomas cutâneos caninos representam grande parte da rotina clínica de médicos veterinários cirurgiões e patologistas. Considerada uma neoplasia maligna com comportamento biológico imprevisível, a tentativa de prever seu comportamento biológico norteia diversas pesquisas no Brasil e no mundo.

Confrontando-se os resultados deste estudo com a literatura existente, verifica-se que o índice mitótico foi o fator prognóstico mais confiável comparativamente às graduações histológicas mais utilizadas. Além disto, é técnica de fácil execução e baixo custo. O índice mitótico associado às técnicas de coloração ou imuno-histoquímicas específicas provavelmente agregariam maior valor prognóstico às mesmas, principalmente no que se refere aos mastocitomas grau 2, cujo comportamento biológico é imprevisível.

Sugere-se que seja utilizado o padrão resultante do Consenso Clínico Cirúrgico e Patológico sobre Mastocitomas Caninos, realizado no Brasil em 2012 (dados não publicados), que preconiza a realização de ambas as classificações (Patnaik et al. 1984, Kiupel et al. 2011) juntamente com o índice mitótico observado naquela neoplasia, facilitando o delineamento do tratamento e provavelmente ressaltando qual o comportamento biológico provável daquele mastocitoma cutâneo canino, principalmente quanto à ocorrência de recidivas e tempo médio de sobrevida.

REFERÊNCIAS

- Blackwood L., Murphy S., Buracco P., De Vos J. P., De Fornel-Thibaud P., Hirschberger J., Kessler M., Pastor J., Ponce F., Savary-Bataille K. & Argyle, D. J. 2012. European consensus document on mast cell tumours in dogs and cats. *Vet Com Onco*, 10:e1–e29.
- Camps-Palau M. A., Leibman N. F., Elmslie R., Lana S. E., Plaza S., McKnight J. A., Risbon R. & Bergman P. J. 2007. Treatment of canine mast cell tumours with vinblastine, cyclophosphamide and prednisone: 35 cases (1997–2004). *Vet Com Onco*, 5:156–167.
- Costa-Casagrande T.A., Elias D.S., Melo S.R. & Matera J.M. 2008. Estudo retrospectivo do mastocitoma canino no serviço de cirurgia de pequenos animais – Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. *Archives of Veterinary Science* 13 (3):176-183.
- Costa-Poggiani S. S. C., Terra E. M., Torres-Neto, R., Tinucci-Costa M. & Amorim, R. L. 2012. Canine Cutaneous Mast Cell Tumor: Biologic Behavior and Its Correlation with Prognostic Indicators. *Open J Vet Med* 02:255-261.
- Cooper M., Tsai X. & Bennett P. 2009. Combination CCNU and vinblastine chemotherapy for canine mast cell tumours: 57 cases. *Vet Com Onco*, 7:196–206.
- De Nardi A.B., Rodaski S., Sousa R.S., Costa T.A., Macedo T.R., Rodigheri S.M., Rios A. & Piekarcz C.H. 2002 Prevalência de neoplasias e modalidades de tratamentos em cães atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal do Paraná. *Archives of Veterinary Science* 7(2):15-26.
- Dobson J. M. & Scase T. J. 2007. Advances in the diagnosis and management of cutaneous mast cell tumours in dogs. *J Small An Prac* 48: 424–431.
- Donnelly L., Mullin C., Balko J., Goldschmidt M., Krick E., Hume C., Brown D. C. & Sorenmo K. 2013. Evaluation of histological grade and histologically tumour-free margins as predictors of local recurrence in completely excised canine mast cell tumours. *Vet Com Onco*. doi: 10.1111/vco.12021.
- Elston L.B., Suerio F.A.R., Cavalcanti J.M. & Meze K. 2009. The importance of the mitotic index as a prognostic factor for survival of canine cutaneous mast cell tumors: a validation study. *Vet Pathol* 46:362–365.
- Fulcher R. P., Ludwog L. L., Bergman P. J., Newman S. J., Simpson, A.M. & Patnaik A. K. 2006. Evaluation of a two-centimeter lateral surgical margin for excision of grade I and grade II cutaneous mast cell tumours in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 228: 210-215.
- Grant I.A., Rodriguez C.O., Kent M.S., Sfilgoi G., Gordon I., Davis G., Lord L. & London C.A. 2008. A Phase II Clinical Trial of Vinorelbine in Dogs with Cutaneous Mast Cell Tumors. *J Vet Inter Med* 22: 388–393.
- Kiupel M., Webster J.D., Bailey K.L., Best S., DeLay J., Detrisac C.J., Fitzgerald S.D., Gamble D., Ginn P.E., Goldschmidt M.H., Hendrick M.J., Howerth E.W., Janovitz E.B., Langohr I., Lenz S.D., Lipscomb T.P., Miller M.A., Misdorp W., Moroff S., Mullaney T.P., Neyens I., O'Toole D., Ramos-Vara J., Scase T.J., Schulman F.Y., Sledge D., Smedley R.C., Smith K., Snyder P.W., Southorn E., Stedman N.L., Steficek B.A., Stromberg P.C., Valli

- V.E., Weisbrode S.E., Yager J., Heller J., Miller R. 2011. Proposal of a 2-Tier Histologic Grading System for Canine Cutaneous Mast Cell Tumors to More Accurately Predict Biological Behavior. *Vet Pathol* 48:147.
- London C.A. & Seguin B. 2003. Mast cell tumors in the dog. *Vet Clin North Am: Small An Pract*; 33:473–489.
- Mahler S. 2012. Mast cell tumour in a young boxer dog *Vet Rec* 171: 182
- Maiolino P., Cataldi M., Paciello O., Restucci B. & De Vico G. 2005. Nucleomorphometric Analysis of Canine Cutaneous Mast Cell Tumours. *J. Comp. Path.* 133: 209–211.
- Monteiro B., Boston S. & Monteith G. 2011. Factors influencing complete tumor excision of mast cell tumors and soft tissue sarcomas: A retrospective study in 100 dogs. *Can Vet J.* 2011 November; 52(11): 1209–1214.
- Murphy S., Sparkes A.H., Smith K.C., Blunden A.S. & Brearley M.J. 2004. Relationships between the histological grade of cutaneous mast cell tumours in dogs, their survival and the efficacy of surgical resection. *Vet Rec*; 154:743–746.
- Murphy S., Sparkes A.H., Blunden A.S., Brearley M.J. & Smith K.C. 2006. Effects of stage and number of tumours on prognosis of dogs with cutaneous MCTs. *Vet Rec*; 158:287–291.
- Neto, R.T., Vidale M.M., Rahal S.C. & Amorim R.L. 2008. Avaliação do índice mitótico e número de células bi e multinucleadas dos mastocitomas cutâneos caninos no exame citopatológico. *Vet. e Zootec. Supl.* 15 (3):25-28.
- O'Connell K. & Thomson, M. 2011. Evaluation of prognostic indicators in dogs with multiple, simultaneously occurring cutaneous mast cell tumours: 63 cases. *Vet Com Onco*, 11: 51–62.
- Patnaik A.K., Ehler W.J. & MacEwen E.G. 1984. Canine cutaneous mast cell tumor: morphologic grading and survival time in 83 dogs. *Vet Pathol* 21:469–474.
- Preziosi R., Sarli G. & Paltrinieri M. 2007. Multivariate survival analysis of histological parameters and clinical presentation in canine cutaneous mast cell tumours. *Vet Res Comm*; 31:287–296.
- Romansik E.M., Reilly C.M., Kass P.H., Moore P.F., London C.A. 2007 Mitotic index is predictive for survival for canine cutaneous mast cell tumors. *Vet Pathol* 44:335–341.
- Scase T.J., Edwards D., Miller J., Henley W., Smith K., Blunden A. & Murphy S. 2006. Canine mast cell tumours: correlation of apoptosis and proliferation markers with prognosis. *J Vet Inter Med* 20: 151–158.
- Seguin B., Leibman N. F., Bregazzi V.S., Ogilvie G.K., Powers B.E., Dernel W.S., Fettman M.J. & Withrow S. 2001. Clinical outcome of dogs with grade-II mast cell tumors treated with surgery alone: 55 cases (1996–1999), *J Am Vet Med Assoc.* 218:1120–1123.
- Seguin B., Besancon M.F., McCallan J.L., Dewe L.L., Tenwolde M.C., Wong E.K. & Kent M.S. 2006. 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 Inter Med* 20:933–940.
- Sfiligoi G., Rassnick K. M., Scarlett J. M., Northrup N. C. & Gieger T. L. 2005. Outcome of dogs with mast cell tumours in the inguinal or perineal region

- versus other cutaneous locations 124 cases (1990 – 2001). J Am Vet Med Assoc 226:1368-1374.
- Simoes J.P.C., Schoning P. & Butine M. 1994. Prognosis of canine mast cell tumors: a comparison of three methods. Vet Pathol, 31:637–647.
- Strefezzi R.F., Kleeb S.R., Xavier J.G. & Catão-Dias J.L. 2010. Avaliação da proliferação celular como indicador prognóstico para mastocitomas cutâneos caninos. Pesq Vet Bras 30(7):559-565.
- Thompson J.J., Yager J.A., Best S.J., Pearl D.L., Coomber B.L., Torres R.N., Kiupel M. & Foster R.A. 2011. Canine Subcutaneous Mast Cell Tumors: Characterization and Prognostic Indices, Vet Pathol 48 (1):156-168.
- Vascellari M., Giantin M., Capello K., Carminato A., Morello E.M., Vercelli A., Granato A., Buracco P., Dacasto M. & Mutinelli F. 2013. Expression of Ki67, BCL-2, and COX-2 in canine cutaneous mast cell tumors: association with grading and prognosis. Vet Pathol 50: 110–121.
- Welle M.M., Rohrer Bley C., Howard J. & Rufenacht S. 2008. Canine mast cell tumours: a review of the pathogenesis, clinical features, pathology and treatment. Vet Dermatol 19:321–339.
- White C.R., Hohenhaus A.E., Kelsey J. & Procter-Gray E. 2011. Cutaneous MCTs: Associations with Spay/Neuter Status, Breed, Body Size, and Phylogenetic Cluster. J Am Anim Hosp Assoc 47:210–216.
- Ziekman P.G., Otter W.D., Tan J.F., Teske E., Kirpensteijn J., Koten J.W. & Jacobs J.J. 2013. Intratumoural interleukin-2 therapy can induce regression of non-resectable mastocytoma in dogs. Anticancer Res. Jan;33(1):161-5

LEGENDAS DAS FIGURAS

Fig. 1. Curva de sobrevida estratificada pelo grau histológico de acordo com Patnaik et al. (1984) de cães com mastocitoma canino. Quando analisada isoladamente houve influência sobre a sobrevida ($P < .0001$).

Fig. 2. Curva de sobrevida pelo índice mitótico (IM) estratificado segundo Romansik et al. (2007) de todos os animais com mastocitoma canino. IM foi fator prognóstico para a sobrevida final ($P < .0001$).

Fig. 3. Correlação significativa do índice mitótico com classificação histológica em graus. Demonstração da distribuição dos índices mitóticos em graus 1, 2 e 3. O índice mitótico aumenta significativamente com o aumento do grau histológico ($P < .0001$).

Fig. 4. Curva de probabilidade de ocorrência de recidiva local em cães com mastocitoma canino. O índice mitótico (IM) foi fator prognóstico para ocorrência de recidiva local ($P < 0,05$).

Fig. 5. Curva de sobrevida pelo índice mitótico (IM) estratificado segundo Romansik et al. (2007) dos animais com mastocitoma canino grau 2. IM foi fator prognóstico para a sobrevida ($P < .0001$).

Fig. 6. Curva de sobrevida pelo índice mitótico (IM) estratificado segundo Romansik et al. (2007) dos animais com mastocitoma canino grau 3. IM não foi fator prognóstico para a sobrevida ($P = 0,9$).

Fig. 7. Curva de sobrevida pelo índice mitótico (IM) estratificado segundo Elston et al. (2009) dos animais com mastocitoma. IM foi fator prognóstico para a sobrevida ($P < .0001$).

Fig. 8. Curva de sobrevida pelo índice mitótico (IM) estratificado segundo Elston et al. (2009) dos animais com mastocitoma canino grau 2. IM foi fator prognóstico para a sobrevida ($P<.0001$).

Fig. 9. Curva de sobrevida estratificada pelo grau histológico de acordo com Kiupel et al. (2011) de cães com mastocitoma canino. Quando analisada isoladamente houve influência sobre a sobrevida ($P<.0001$).

FIGURAS

Figura 1

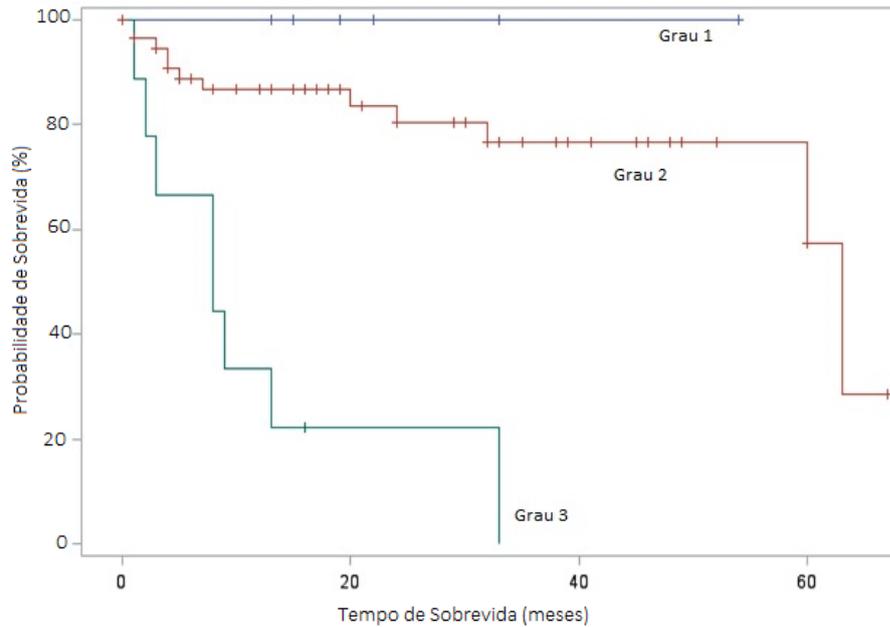


Figura 2

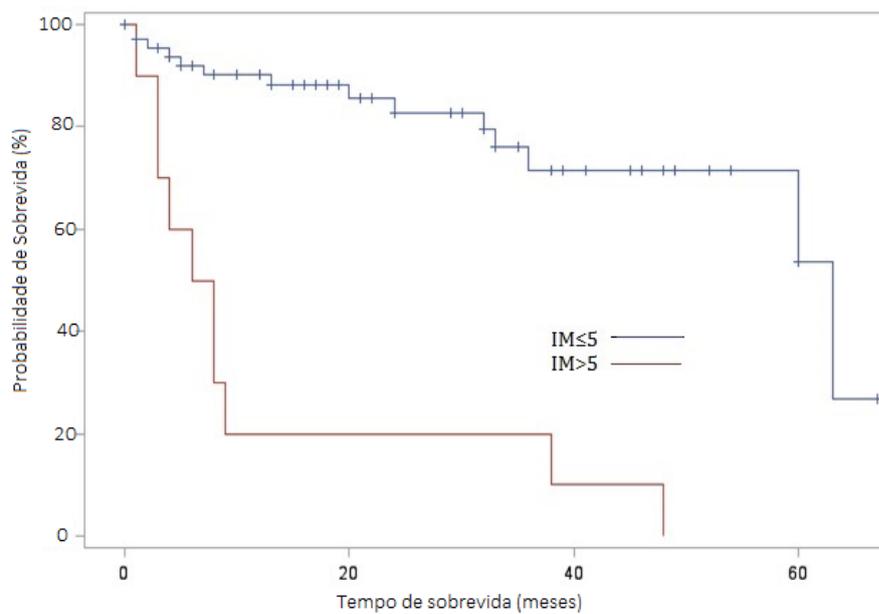


Figura 3

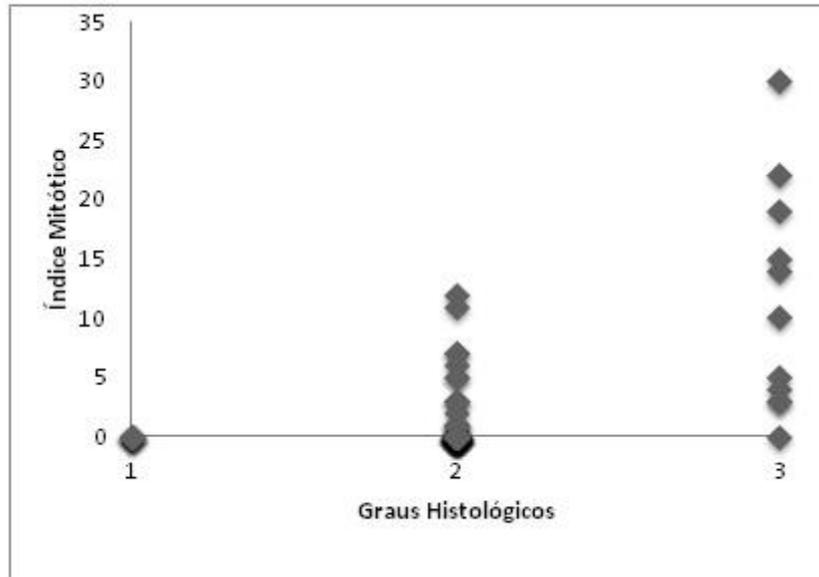


Figura 4

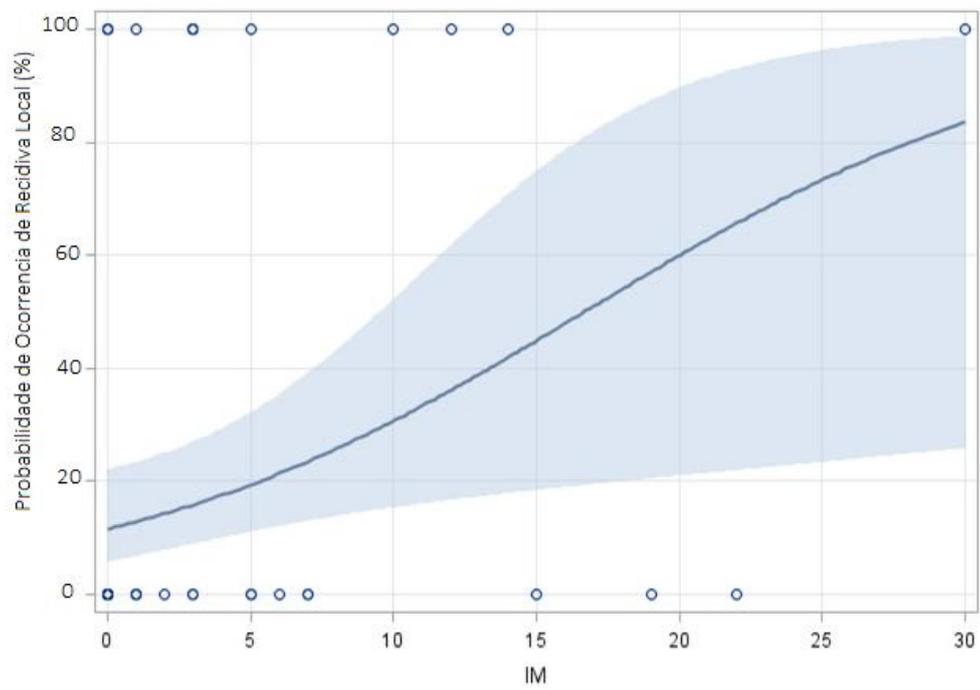


Figura 5

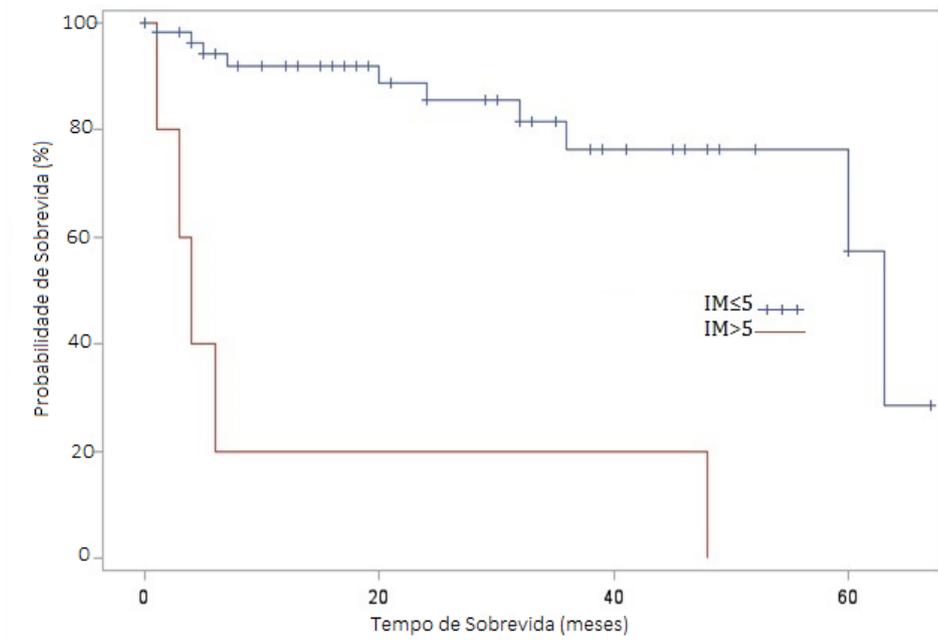


Figura 6

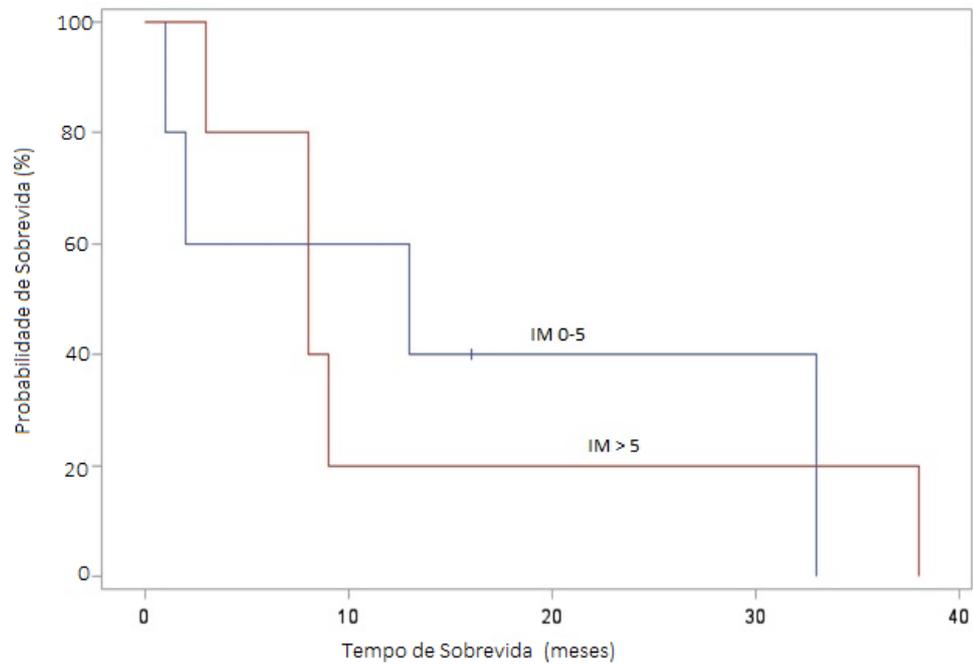


Figura 7

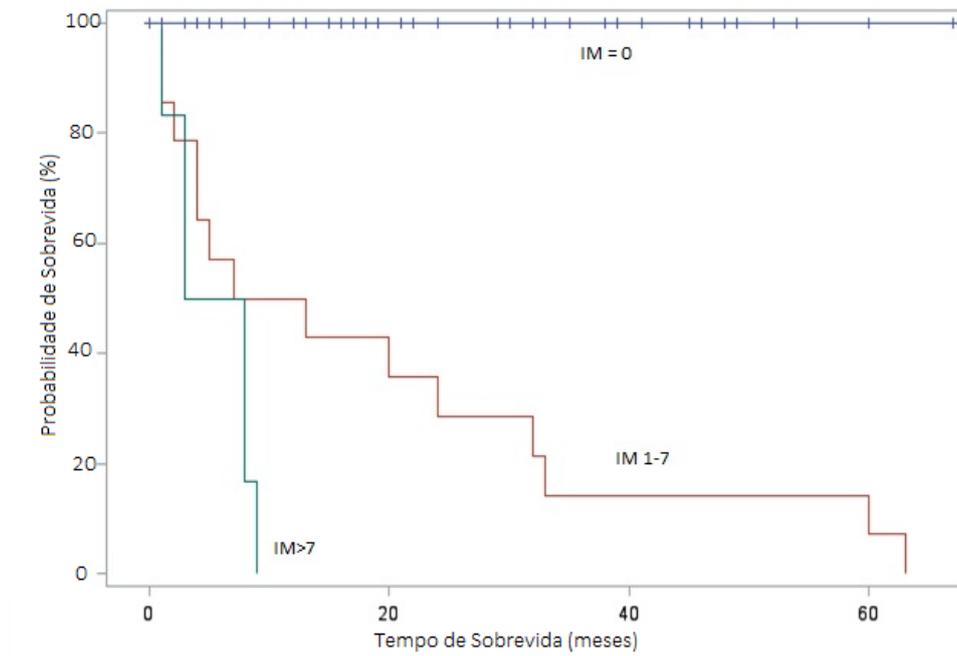


Figura 8

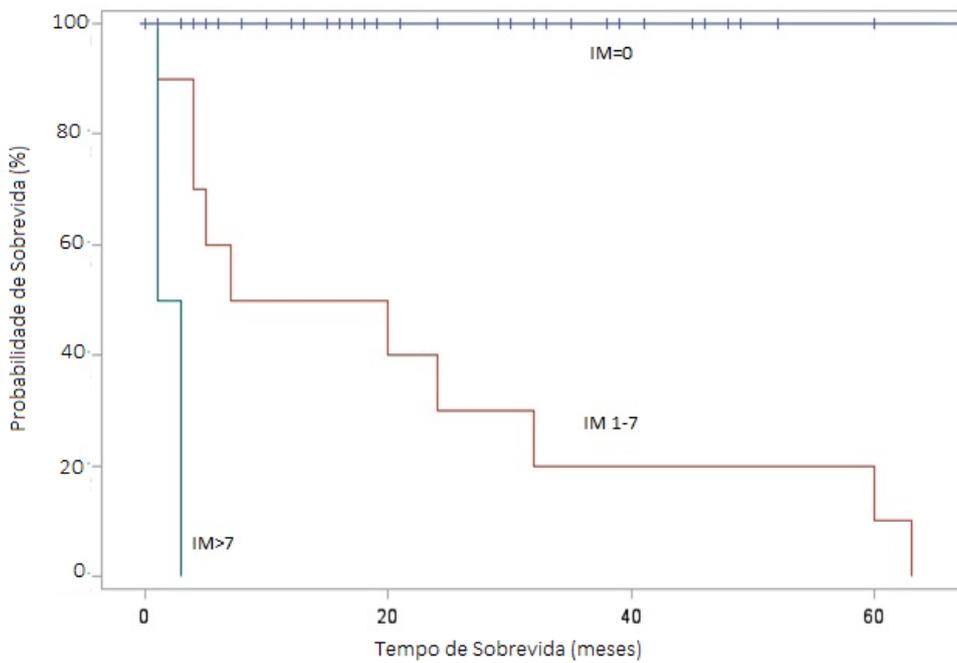
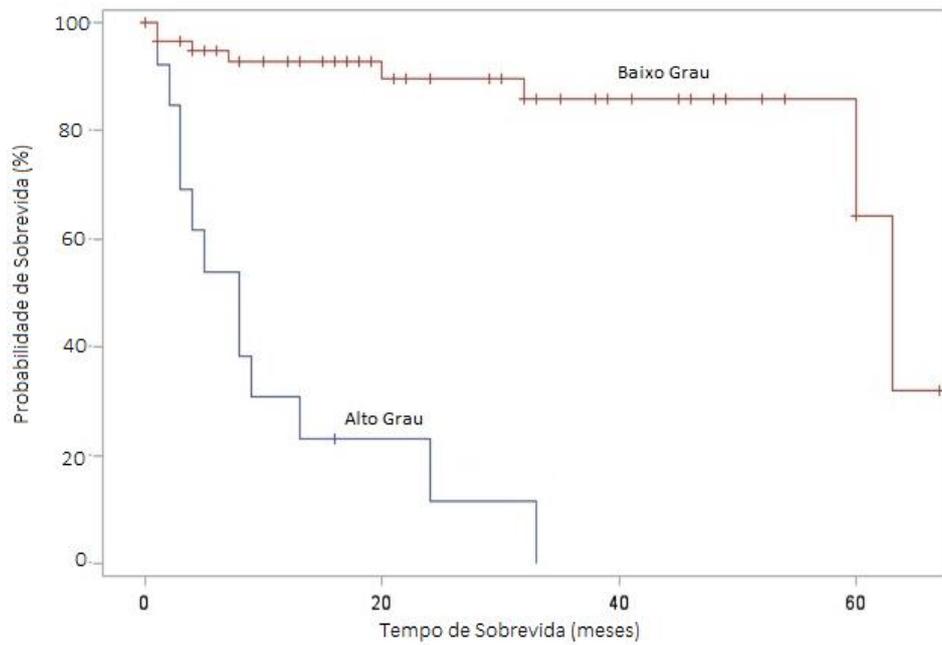


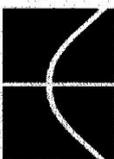
Figura 9



Quadro 1. Distribuição da contagem de eosinófilos em cruzes de acordo com os graus histológicos de Patnaik et al. (1984)*

Eosinófilos	Graus Histológicos			Total
	1	2	3	
0	1	5	1	7
+	4	21	5	30
++	2	26	2	30
+++		18	3	21
Total geral	7	70	11	88

*Não houve associação significativa com sobrevida, recidivas e ocorrência de síndrome paraneoplásica



Universidade de Brasília

Instituto de Ciências Biológicas
Comitê de Ética no Uso Animal

Brasília, 15 de maio de 2013.

DECLARAÇÃO (2ª VIA)

Declaramos que o projeto intitulado "**AValiação DE MÉTODOS PROGNÓSTICOS E ANÁLISE DE SOBREVIDA EM CÃES COM MASTOCITOMA CANINO.**", UnBDOC n.º 15346/2012, sob responsabilidade da Professora Paula Diniz Galera foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.

Prof. José Raimundo Corrêa
Coordenador da CEUA