

NATÁLIA JOANA RAMOS DA SILVA

**GRADUAÇÃO CITOLÓGICA DE MASTOCITOMAS CUTÂNEOS
CANINOS**

Orientadora: Professora Doutora Maria Nazaré Pinto da Cunha

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias
Faculdade de Medicina Veterinária

Lisboa
2017

NATÁLIA JOANA RAMOS DA SILVA

**GRADUAÇÃO CITOLÓGICA DE MASTOCITOMAS CUTANEOS
CANINOS**

**Dissertação apresentada em Provas Públicas na
Universidade Lusófona de Humanidades e
Tecnologias, para a obtenção do Grau de Mestre
em Medicina Veterinária no Curso de Mestrado
Integrado em Medicina Veterinária, no dia 18 de
dezembro de 2017, perante o júri, nomeado pelo
Despacho reitoral nº 439/2017, com a seguinte
composição:**

Presidente: Professora Doutora Laurentina Pedroso

Arguente: Professora Doutora Rute Noiva

Orientadora: Professora Doutora Maria Nazaré Pinto
da Cunha

Vogal: Professora Doutora Maria Margarida Ferreira
Alves

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Faculdade de Medicina Veterinária

Lisboa

2017

Para a minha avó Maria do Céu Ramos

Agradecimentos

Em primeiro lugar tenho mesmo que agradecer à minha orientadora Professora Doutora M^a Nazaré Pinto da Cunha pela amizade, confiança e pelo imenso trabalho e dor de cabeça que teve comigo. De todas as vezes que eu desisti (que foram muitas) a Professora esteve lá para me levantar e nunca deixou de acreditar. Esteve presente em todos os momentos desta dissertação, desde a escolha do tema até às correcções sem fim. É uma pessoa fantástica que se quer ter sempre ao lado e uma fonte de inspiração.

Tenho que agradecer Dra. Vera Pereira que me recebeu no laboratório e me despertou o bichinho da citologia, nem eu nunca sequer me tinha imaginado a ver uma citologia auricular de livre vontade quanto mais querer fazer de laboratório vida.

Ao Professor Dr. Pedro Faísca pela oportunidade de estágio.

A minha querida Professora Ana Lúcia Rodrigues que durante meses lidou comigo diariamente e sempre se mostrou disponível não só como Professora mas também como amiga sempre pronta a ajudar e ensinar.

À Professora Dra. Inês Viegas pela enorme ajuda análise estatística. Muito obrigada pela paciência, por todas as explicações e disponibilidade.

Ao Laboratório CEDIVET por me terem recebido, pela disponibilidade dada e por me terem facultado os meus casos de estudo. Sem eles, este trabalho não tinha sido possível.

À minha mãe que tem aquela maneira muito peculiar de ser, acredito que tenha feito tudo o que achava que estava correcto e da melhor maneira que sabia e que podia. Obrigada pelas noites que não dormias para me fazer companhia no estudo, acho que já tens direito a uma licenciatura por experiência laboral ou coisa que o valha. Toleraste coisas que nunca imaginaste que serias capaz, o Tobias, os corações e a chinchila no frigorífico, os cartões dos parasitas, os filmes de cirurgia, as interpretações de rx (em que eras melhor que eu), as roupas e galochas vindas das saídas de campo e mais uma infinidade de coisas.

Agradeço ao meu Avô Artur por ser ele. Não faz a mínima ideia do quão divertido e amigo é. Tem uma maneira muito característica de ser e está sempre presente em todos os momentos. O meu avô é uma prova de força, nunca pensei que ele fosse capaz de superar tudo o que aconteceu durante estes últimos anos mas aqui está ele a acompanhar mais um fim de ciclo da minha vida. Tudo lhe passa ao lado, talvez seja esse o segredo.

À minha Tia Sandra, que é um mix bem feito de avó com mãe. Fico toda vaidosa quando dizem que sou parecida contigo!!! Desde o 5º ano que és o meu ídolo e sempre quis ser como tu, agora aqui estou igualmente Doutora! Obrigada por me teres dado a minha prima e por permitires que eu faça parte integral da vida dela. É e será sem dúvida o mais próximo que tenho de uma irmã.

Ao meu Tio Alexandre, por me acompanhar e apoiar desde que me lembro de ser gente.

Ao meu Pai, por me ter criado, por estar ao meu lado todo este tempo, pelo amor e carinho incondicionais que sempre me deste sem nenhuma obrigação.

Aos meus eternos amigos de longa data que me acompanham desde a escola, onde tudo era mais fácil mas nem a faculdade e as diferentes perspectivas de futuro nos separou.

Contrariamente ao que dizem, a Universidade trouxe-me grandes amizades. Agradeço às minhas Damas do Pinheiro, em especial à Raquel Batista: sempre dissemos que ia ser “De Besta a Doutora!” e foi mesmo!

Mafalda Santos, dizer que somos amigas é pouco. Contigo sou capaz de rir, de chorar, de gritar. És a pessoa que não quer saber o porquê das coisas, só queres estar lá para ajudar a resolver.

À Nakita por toda a amizade impar e carinho que sempre me dedicou, é um orgulho ser tua amiga!

Devo referir também duas pessoas que surgiram na minha vida na faculdade mas que durante a tese se transformaram em verdadeiras companheiras para todas as horas. Rute Reis muito brigada pela amizade, boa disposição e disponibilidade que sempre demonstraste. Ariana Radar, agradeço imenso todo o apoio, ajuda e força que me dedicaste durante estes últimos dois anos.

E como é óbvio tenho que agradecer à Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias e à Faculdade de Medicina Veterinária pelo seu ensino de excelência e pela oportunidade que me deram de frequentar o curso de Medicina Veterinária que sempre ambicionei.

Resumo

O diagnóstico citológico de mastocitoma cutâneo canino (MCC) é relativamente fácil. No entanto, para a determinação do prognóstico é fundamental conhecer o grau da lesão, classicamente obtido através do exame histopatológico. A graduação histológica criada recentemente por Kiupel classifica os mastocitomas de baixo ou alto grau, baseando-se essencialmente nas características nucleares dos mastócitos.

Os objectivos deste trabalho são: avaliar a acuidade diagnóstica da citologia na graduação de MCC; e identificar quais os parâmetros mais relevantes para este fim.

Foi realizado um estudo retrospectivo de todas as citologias aspirativas cutâneas observadas no laboratório CEDIVET entre Outubro de 2014 e Abril de 2016 com o diagnóstico citológico de mastocitoma (n=173). Foram incluídas apenas as neoplasias que possuíam uma graduação histopatológica de Kiupel, sendo excluídos os mastocitomas subcutâneos e as citologias com escassa celularidade. Todos os casos (n=35) foram revistos por um citologista cego ao diagnóstico histológico, e classificados segundo uma série de parâmetros derivados da classificação de kiupel, à qual se acrescentou a quantidade de granulação citoplasmática.

Histologicamente, 25 (71,4%) e 10 (28,5%) casos foram classificados como baixo e alto grau, respectivamente. A citologia apresentou apenas 1 falso-positivo, obtendo-se uma sensibilidade de 100% e especificidade de 96%, relativamente ao diagnóstico histopatológico.

Parâmetros como a presença de mitoses, células binucleadas, anisocariose, cariomegália e baixa granulação citoplasmática foram os mais fortemente associados a MCC de alto grau ($p < 0,001$).

Os nossos dados concluem que a citologia tem uma acuidade de 97% para a graduação de MCC, podendo constituir uma previsão fiável do prognóstico, útil na rápida decisão do plano terapêutico.

Palavras-chave: cão, mastocitoma, citologia, graduação, histologia

Abstract

The cytological diagnosis of canine cutaneous mast cell tumors (MCTs) is straightforward. However, the tumor grade is essential for prognostic assessment, which is classically performed with an histopathological exam. The recent Kiupel's grading scheme classifies MCTs in low-grade and high-grade, depending essentially on their nuclear characteristics.

The aims of this paper are: evaluate the diagnostic accuracy of the cytologic grading of MCT; and identify the most relevant parameters to do so.

This was a retrospective study of all skin aspiration cytologies observed at CEDIVET between October 2014 and April 2016, diagnosed as MCT, (n=173). Only MCTs with histopathological Kiupel's grading were included. All the subcutaneous mast cell tumors were excluded, as well as low cellularity cytology samples. All the cases (n=35) were reviewed by a cytologist blind to the histological diagnosis. MCTs were classified using parameters derived from Kiupel's MCT grading, plus the amount of cytoplasmic granules.

Histologically, 25 (71,4%) and 10 (28,5%) cases were classified as low and high-grade, respectively. Cytology had only one false-positive, resulting in a 100% sensibility and 96% specificity for the grading of MCTs. The presence of mitosis, binucleation, anisokaryosis, karyomegaly and poor granular cells were strongly associated with high-grade MCTs ($p<0,001$).

It can be concluded that the cytological grading of MCTs has an overall accuracy of 97%, when compared with histopathology. This data suggests that cytology can be a reliable predictor of prognosis for MCTs, useful for the quicker establishment of the therapeutic plan.

Keywords: dog, mast cell tumor, cytology, grading, histology

O trabalho e os resultados desenvolvidos durante a elaboração desta Dissertação de Mestrado foram apresentados na seguinte comunicação livre:

Silva, N. Carvalho, H. Viegas, I. Gil da Costa, R. Pinto da Cunha, N. “Graduação citológica de mastocitomas cutâneos caninos”. XXII Encontro da Sociedade Portuguesa de Patologia Animal. Porto, 19-20 Maio, 2017

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

AgNO_r- Argyrophilic Nucleolar Organizer Regions

DNA- Ácido Desoxirribonucleíco

Fig.- Figura

FMV- Faculdade de Medicina Veterinária

HE- Hematoxilina-Eosina

HFP- High power field

IgE – Imunoglobulina E

Ig G- Imunoglobulina G

IL- Interleucinas

IM- Índice mitótico

LACH – Laboratório de análises clínicas e histopatologia

MCC- Mastocitoma cutâneo canino

MCT- Mast Cell Tumor

NGF- Factor de crescimento nervoso

PAAF- Punção aspirativa por agulha fina

PCNA - Proliferating cell nuclear antigen~

RX- Radiografia

SCF- Stem factor

TNF- α – Factor de necrose tumoral

TLR- Toll-like

ULHT- Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

VPN- Valor preditivo negativo

VPP- Valor preditivo positivo

Índice

Agradecimentos	4
Resumo	6
Abstract.....	7
Lista de abreviaturas, siglas e símbolos	9
Índice de Figuras.....	12
Índice de Tabelas.....	13
Índice de gráficos.....	13
1. Descrição do estágio curricular.....	14
2. Revisão bibliográfica.....	17
2.1. A Citologia como meio de diagnóstico.....	17
2.2. Mastócito: origem, morfologia e função.....	18
2.3. Mastocitoma.....	20
2.3.1. Cutâneo.....	20
2.3.1.1. Etiologia.....	20
2.3.1.2. Epidemiologia	21
2.3.1.3. Características clínicas	22
2.3.1.4. Abordagem ao Diagnóstico	23
2.3.1.5. Sinais clínicos	24
2.3.1.6. Corantes	24
2.3.1.7. Diagnóstico citológico	25
2.3.1.7.1. Graduação citológica	26
2.3.1.8. Diagnóstico histopatológico	27
2.3.1.8.1. Graduação histológica	28
2.3.1.9. Estadiamento.....	30
2.3.1.10 Prognóstico.....	31
2.3.1.11. Outros marcadores de prognóstico	32
2.3.1.12. Síndrome paraneoplásica	34

2.3.1.13. Tratamento	34
2.3.2. Mastocitoma subcutâneo	36
2.3.3. Mastocitoma visceral	37
3. Objectivo do estudo	38
4. Materiais e Métodos	38
4.1. Tratamento das amostras.....	40
4.2. Análise Estatística	41
5. Resultados	42
5.1. Caracterização da amostra	42
5.2. Validade do teste	48
5.3. Acompanhamento pós-cirúrgico.....	48
6. Discussão	49
7. Conclusão	54
Referências bibliográficas	55
Apêndices.....	I
Apêndice I.....	I

Índice de Figuras

Figura 1- Esfregaço de sangue periférico: gametócito de <i>Hepatozoon canis</i>	15
Figura 2- PAAF de gânglio linfático: Imagem citológica compatível com linfoma	15
Figura 3- Amostra de urina: Sedimento	15
Figura 4- PAAF de nódulo cutâneo: mastócitos bem diferenciados e fibras de colagénio	19
Figura 5- Aspecto macroscópico de mastocitoma cutâneo canino	22
Figura 6- Aspecto macroscópico de mastocitoma cutâneo canino	23
Figura 7- PAAF de nódulo cutâneo: mastócitos com elevada granulação	25
Figura 8- Algoritmo para ser aplicado na graduação citológica de MCC	27
Figura 9- PAAF de nódulo cutâneo: apresentando mastócitos muito granulares e mínima anisocitose	45
Figura 10- PAAF de nódulo cutâneo onde são visíveis mastócitos pouco granulares, várias mitoses e grânulos em posição polarizada	46
Figura 11- PAAF de nódulo cutâneo apresentando evidente binucleação	46
Figura 12- PAAF de nódulo cutâneo: dois grupos distintos de mastócitos	47
Figura 13- Método de graduação citológica de mastocitomas cutâneos caninos criado e aplicado na presente dissertação.	52

Índice de Tabelas

Tabela 1- Tabela representativa dos vários sistemas de graduação histológicos mais utilizados	29
Tabela 2- Estadiamento clínico para cães com mastocitomas cutâneo.....	31
Tabela 3- Tabela representativa das fases de estudo aplicadas neste trabalho.	40
Tabela 4- Tabela representativa dos resultados obtidos utilizando a nossa proposta de graduação citológica de MCC comparando com o resultado histopatológico	42
Tabela 5- Representação dos resultados, distribuição dos critérios citológicos observados em relação à graduação histopatológica atribuída.	44
Tabela 6- Tabela representativa dos resultados da validação do teste	48
Tabela 7- Tabela representativa dos resultados obtidos do cruzamento de dados entre o Follow Up e o grau histopatológico.	48
Tabela 8- Tabela comparativa dos diferentes métodos de graduação citológica de MCC	50

Índice de gráficos

Gráfico 1- Representação dos resultados. Relação dos critérios citológicos observados com a graduação histopatológica atribuída.	44
---	----

1. Descrição do estágio curricular

O estágio curricular efectuado no âmbito do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária pela Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias foi realizado no Laboratório de Análises Clínicas e Histopatologia (LACH) da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias (FMV-ULHT) que se localiza em Lisboa. Este teve a duração de 5 meses, tendo decorrido durante o período de Fevereiro a Julho de 2015.

O LACH serve de apoio ao Hospital Escolar Veterinário da FMV-ULHT. Deste modo, para além de me ser possível fazer parte do funcionamento normal do laboratório tive também a oportunidade em alguns momentos, acompanhar os trabalhos desenvolvidos no hospital. Como estagiária o facto de o laboratório ser parte integrante do hospital foi uma mais-valia uma vez que para além de poder desenvolver a componente laboratorial foi-me possível melhorar também o raciocínio clínico.

As principais funções que me foram designadas passaram pela realização, observação e elaboração de relatórios de exames laboratoriais na área da Patologia Clínica sendo estes: hemogramas completos, diversas bioquímicas sanguíneas, observação de esfregaços sanguíneos (Figura 1), citologia diagnóstica (Fig. 2), urianálises (Fig. 3), ionogramas, testes endocrinológicos, análises bacteriológicas, microbiologia, pesquisa de parasitas e serologias. Foi também possível a elaboração de algumas análises de carácter molecular como a imunofluorescência.

Um dos benefícios que encontrei ao estagiar num laboratório enquadrado num Hospital Veterinário foi a proximidade que tive com os casos clínicos. Para além de realizar as análises laboratoriais tinha também, na maioria dos casos, a possibilidade de dialogar com o clínico e fazer a ponte entre a sintomatologia do paciente, os exames complementares requisitados, os resultados e saber qual o tratamento realizado. Não só me era possível acompanhar o processo de diagnóstico mas também tinha a hipótese de fazer o seguimento do paciente através do contacto com os clínicos ou verificando as fichas no programa informático do Hospital.

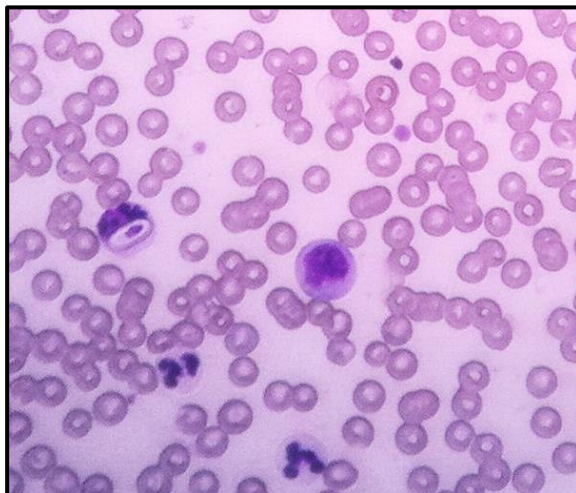


Figura 1- Esfregaço de sangue periférico, onde é possível observar a presença de um gametócito de Hepatozoon canis no interior de um neutrófilo. Giemsa x 1000

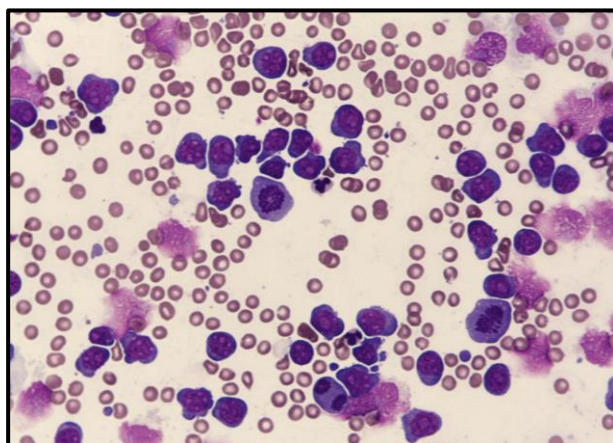


Figura 2- PAAF de linfonodo, onde é possível observar uma população de células linfóides imaturas de grande dimensão com moderada quantidade de citoplasma de cor basófila. É possível observar também várias figuras de mitose. A presente imagem é compatível com linfoma. Giemsa x400



Figura 3- Amostra de urina após centrifugação, é possível observar a presença de sedimento.

2. Revisão bibliográfica

2.1. A Citologia como meio de diagnóstico

Em medicina veterinária, a citologia é considerada um dos exames complementares de diagnóstico mais versátil. É acessível, de fácil execução e de baixo custo, com uma excelente relação qualidade-preço (Pedraza et al., 2011; Sabattini et al., 2014). É um exame pouco invasivo e oferece um rápido diagnóstico. Uma boa análise citológica permite encontrar uma lista de diagnósticos diferenciais ou até mesmo obter o diagnóstico final podendo evitar assim a necessidade de realização de biópsia cirúrgica e todos os riscos associados (Marcos & Santos, 2011; Meyer, 2016).

Apesar de poder ser um exame acessível a qualquer clínico com formação básica em citologia, antes da avaliação do prognóstico e delineamento do plano terapêutico, as amostras devem ser sempre analisadas por um patologista veterinário (Couto, 2006).

Para uma avaliação citológica mais precisa é fundamental que a amostra seja representativa da lesão, a técnica de esfregaço deve ser bem executada com uma coloração adequada e a observação deve ser feita utilizando um microscópio de alta qualidade. Contudo, apesar da fiabilidade do diagnóstico estar intimamente relacionada com a qualidade da amostra, a comunicação clínico-patologista também não deve ser descurada. Informações como: duração da lesão, ritmo de crescimento e resposta a tratamentos prévios podem ser relevantes. A caracterização macroscópica é também de extrema importância. Aquando da avaliação citológica, o patologista deve estar informado da localização anatómica do nódulo, dimensão, aparência, consistência, bordos e mobilidade. Também é importante o patologista ser informado que material espera observar, de que tipo de lesão, que técnicas foram utilizadas, dados e estado clínico do animal (Peleteiro, 2011, Meyer, 2016).

Comparando o exame citológico com a histopatologia compreende-se que a Citologia tem algumas limitações como a impossibilidade de avaliar a arquitectura dos tecidos e a sua relação com as estruturas, a possibilidade de a amostra ser de baixa celularidade e os falsos negativos e positivos. Idealmente tanto a citologia como a histopatologia devem estar ao dispor do clínico, para este poder escolher qual o exame a aplicar consoante o tecido e a lesão em causa (Sharkey et al., 2007).

2.2. Mastócito: origem, morfologia e função

Os mastócitos pertencem ao grupo das células do sistema imunitário. Têm origem nas células precursoras hematopoiéticas na medula óssea, onde se encontram em estado imaturo até se diferenciarem nos tecidos vascularizados como o tecido conjuntivo e mucosas (Cardoso, 2007). A sua diferenciação é influenciada por dois mecanismos: um dependente do factor de crescimento derivado dos fibroblastos, stem factor (SCF) e outro dependente de interleucinas (IL) que são produzidas pelos linfócitos T e pelo factor de crescimento nervoso (NGF) (Theoharides & Cochrane, 2004; Lin & London, 2006).

De um modo geral, estas células fazem parte de todos os tecidos do corpo. No entanto, no cão são particularmente abundantes na pele, trato digestivo e respiratório (Dean, 1988; O'Keefe, 1990; Jukeira & Carneiro, 2013).

Morfológicamente o mastócito bem diferenciado caracteriza-se como sendo uma célula de 10 a 20µm de diâmetro, o seu núcleo pode variar de redondo a ligeiramente oval com cromatina agregada e sem nucléolo evidente. O citoplasma das células está maioritariamente preenchido por grânulos metacromáticos e com vacúolos citoplasmáticos frequentemente presentes, mas normalmente encontram-se obscurecidos pelos grânulos. O núcleo pode-se apresentar pouco corado e de difícil observação devido à sobreposição dos grânulos (Duncan & Prasse, 1979) (Fig. 4).

Já as células pouco diferenciadas podem ser maiores medindo entre 12 a 35µm de diâmetro, podendo apresentar binucleação e mitoses. Nestes mastócitos os grânulos citoplasmáticos são em menor quantidade podendo mesmo em alguns casos estarem ausentes (Duncan & Prasse, 1979).

Sendo os mastócitos células do sistema imunitário, estes atuam como sentinela dos processos inflamatórios, resposta imunológica inata, adquirida e nas reacções auto-imunes (Misdorp, 2004; Withrow et al., 2013, Jukeira & Carneiro, 2013). Após a sua diferenciação, uma das principais características do mastócito é a presença de grânulos citoplasmáticos de cor magenta. Esses grânulos contêm uma panóplia de substâncias bioactivas como a heparina, histamina, TNF- α , fator activador plaquetário, fator quimiotático de eosinófilos, várias proteases e leucotrienos. A origem e composição dos grânulos são influenciadas pelo ambiente em que os mastócitos se diferenciam e é a partir da libertação destes grânulos que é desencadeada uma resposta imunológica e inflamatória (Cardoso, 2007; Hedlund, 2008; Misdorp, 2004; Withrow et al., 2013).

Estas células, apesar da sua capacidade efectora nas respostas alérgicas também são muito importantes para a imunidade inata. São capazes de fagocitar microrganismos

invasores e produzir grandes quantidades de mediadores inflamatórios que têm um papel fundamental no recrutamento de leucócitos para o centro inflamatório.(Cardoso, 2007)

Na sua membrana externa, os mastócitos contêm receptores de elevada afinidade para a imunoglobina E (IgE) e G (IgG), receptores Toll-like 1-9 (TLR), proteínas do complemento, neuropeptídeos e opióides e c-kit. (Cardoso, 2007)

A IgE constitui o principal mecanismo de desgranulação, sendo responsável pela libertação de histamina e outras aminas vasoactivas que dão origem a uma reacção alérgica. (Cardoso, 2007)

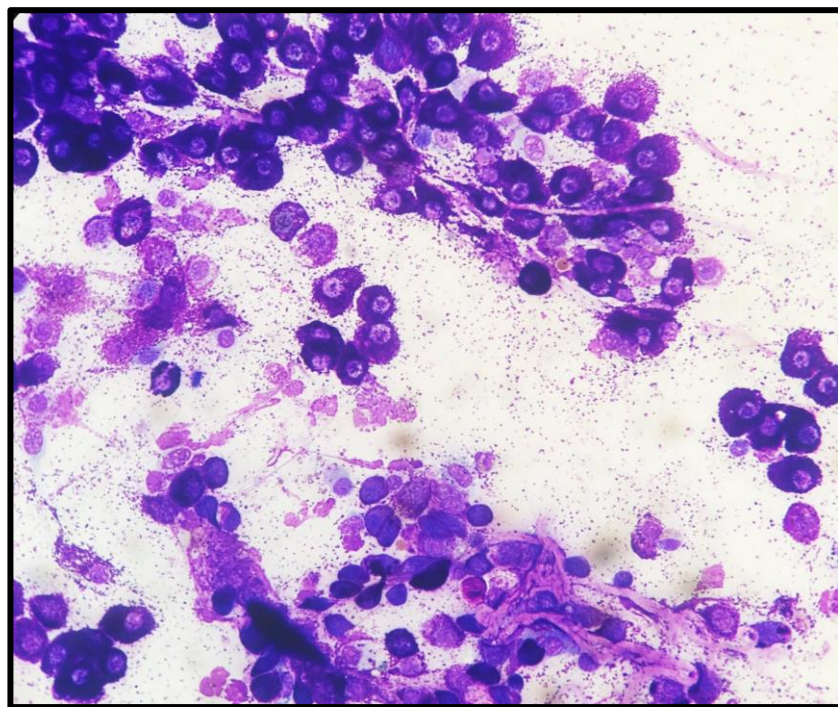


Figura 4- PAAF de nódulo cutâneo: é possível observar mastócitos neoplásicos bem diferenciados apresentado baixo grau de pleomorfismo. São visíveis também fibras de colagénio, comuns neste tipo de neoplasia. A imagem é compatível com o diagnóstico de mastocitoma de baixo grau, Giemsa 400x

2.3. Mastocitoma

Os tumores originários nos mastócitos são maioritariamente provenientes da derme (Misdorp, 2004). Todavia, podem também ter origem subcutânea ou visceral e podem ser encontrados em qualquer localização anatômica sendo que as áreas mais afectadas são os membros, tronco, zona perineal e prepúcio (Misdorp, 2004; Takahashi et al., 2000; Raskin, 2016).

2.3.1. Cutâneo

2.3.1.1. Etiologia

Ao longo dos anos têm sido realizados vários estudos para tentar compreender qual a etiologia do mastocitoma canino que no entanto, ainda não está totalmente esclarecida (Macy, 1986; Withrow et al., 2013).

Têm sido propostas várias teorias sendo uma delas a hipótese de uma etiologia vírica contudo não foram encontradas evidências nessa linha (Madewell et al., 1984; Withrow et al., 2013). Porém ainda existe quem defenda esta teoria tendo como base a presença ocasional de partículas víricas durante o exame ultra-estrutural dos mastócitos. Outra das teorias para uma possível etiologia é a presença de uma mutação genética ao nível do gene que expressa o receptor membranar c-kit (Madewell et al., 1984; London et al., 1996; Kiupel et al., 2004;). A mutação de maior relevância encontrada foi a duplicação que causa fosforilação constitutiva do receptor, sem a necessidade da ligação com SCF. Desta forma justificando o crescimento descontrolado dos tumores e a relação positiva das duplicações com a malignidade dos mastocitomas (Zemke et al., 2002). Teoriza-se também que o Boxer e o Boston Terrier possuam oncogenes transmitidos à descendência, oncogene este que pode levar a uma maior incidência de mastocitomas nessas raças (Miller et al., 2013).

Para além das mutações genéticas, alguns autores têm sugerido que inflamações cutâneas crónicas podem ter um papel no desenvolvimento do mastocitoma canino, ainda que tenham sido reportados poucos casos de mastocitomas associados a locais de dermatites crónicas, cicatrizes de queimaduras ou agentes irritantes da pele (Hottendorf & Nielsen, 1966; Couto, 2006; Marcos et al., 2011).

2.3.1.2. Epidemiologia

O MCT está descrito como sendo o tumor cutâneo mais comum em cães e o segundo em gatos. Estima-se que 7 – 14% (Bostock, 1973), 7-21% (Kiupel et al., 2011), 7-25% (Misdorp, 2004) dos tumores de pele em canídeos sejam mastocitomas. Apesar de ser muito comum nestas duas espécies, mais raramente pode ocorrer em bovinos, cavalos, porcos, ovelhas, furões e também em humanos (Goldschmidt & Hendrick, 2002; He et al., 2009; Withrow et al., 2013).

Sabe-se que algumas raças como o Labrador Retriever, Golden Retriever, Boxer, Pug, Boston Terrier, Bulldog Inglês e Weimaraner, tendem a apresentar esta neoplasia com mais frequência (Meuten, 2002; Nelson & Couto, 2006; Peleteiro et al., 2011; Withrow et al., 2013). Raças descendentes do Bulldog, como por exemplo o Pug, têm-se mostrado mais susceptíveis ao aparecimento de mastocitomas. Curiosamente, é nestas raças também que se verifica uma maior taxa de tumores que se comportam de forma benigna (Goldschmidt & Hendrick, 2002). Os cães da raça Shar-Pei apresentam uma particularidade, pois nestes animais este tumor pode tornar-se muito agressivo e disseminar-se cutaneamente (Miller, 1995; Peleteiro et al., 2011; Withrow et al., 2013).

O aumento da incidência em determinadas raças aponta para a possibilidade da existência de um factor genético subjacente. (Goldschmidt & Hendrick, 2002) A idade não é um factor tendencioso para o aparecimento de mastocitomas, podendo manifestar-se tanto em animais jovens como em idosos. (Raskin, 2016) No entanto, animais de meia-idade com aproximadamente oito anos apresentam uma maior predisposição, sendo que, com o avançar da idade aumentam também os riscos do desenvolvimento desta neoplasia. (Misdorp, 2004; Couto, 2006; Strefezzi et al., 2010) Os cães da raça Shar-Pei são mais uma vez excepção sendo que a idade média nestes animais desce para os 4 anos de idade. (Miller, 1995; Misdorp, 2004; Couto, 2006; Strefezzi et al., 2010)

Em 1994, Simões refere que pode existir um ligeiro aumento da ocorrência em cadelas. (Simoes e al., 1994) No entanto, a maioria dos trabalhos consultados para esta pesquisa ou não fazem qualquer referência a este factor ou, como no caso de Hottendorf em 1966, Patnaik em 1984 e Strefezzi em 2010, nos seus trabalhos referem não ter sido encontrada qualquer associação com o sexo do animal. (Hottendorf & Nielsen, 1966; Patnaik, Ehler, & MacEwen, 1984; Strefezzi et al., 2010)

2.3.1.3. Características clínicas

Os mastocitomas cutâneos caninos podem surgir na derme ou no tecido subcutâneo em qualquer localização anatômica. No entanto, o tronco e os membros (Fig. 5 e 6) são as regiões mais afectadas. Podem ser encontrados em zonas de inflamação crónica como cicatrizes ou queimaduras (Couto, 2006; Hedlund, 2008; Strefezzi et al., 2010).

Estas neoplasias não têm um aspecto morfológico típico, sendo bastante conhecidas pelo seu comportamento imprevisível. Macroscopicamente podem apresentar-se como lesões alopecicas e eritematosas, solitários ou múltiplos, de tamanho variável entre poucos milímetros a vários centímetros, e com variável capacidade infiltrativa (Gross et al., 2005; Couto, 2006; Hedlund, 2008).

Um aspecto clínico que pode colaborar com o diagnóstico de mastocitomas é o facto de aquando da punção se verificar um aumento significativo do tamanho da lesão, este fenómeno denomina-se por sinal de Darrier (Couto, 2006; Withrow, Vail, & Page, 2013). O facto de não possuírem uma aparência típica dificulta ou pode mesmo impossibilitar fazer uma especulação clínica acerca de um possível diagnóstico (Couto, 2006; Strefezzi et al., 2010).

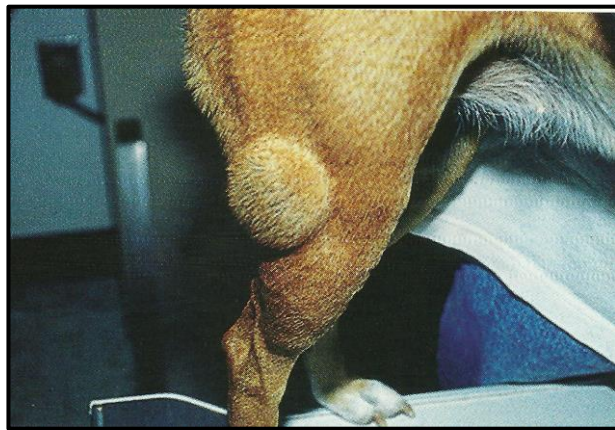


Figura 5- Mastocitoma cutâneo num membro posterior de um cão. (Raskin, 2016)

2.3.1.4. Abordagem ao Diagnóstico

Em qualquer situação clínica, um exame físico completo é sempre de extrema importância. Contudo, uma vez que os mastocitomas são de fácil metastização, é crucial uma cuidada avaliação de todo o animal, quantificação das massas e ter especial atenção aos linfonodos, principalmente os que drenam a região do nódulo (Cian & Freeman, 2007).

De um modo geral em qualquer animal que seja suspeito de ser portador de uma neoplasia é recomendada a realização de um perfil completo de análises hematológicas e bioquímicas. No caso dos mastocitomas estes cães podem apresentar anemia devido a uma ulceração gastrointestinal e pode também detectar-se eosinofilia devido aos factores quimiotácticos e IL-5 produzidos pelos mastócitos (Couto, 2006; Cheryl A. London & Seguin, 2003; Hedlund, 2008; Withrow et al., 2013). A avaliação destes parâmetros pode ser útil uma vez que pode ser detectada a existência de envolvimento hepático ou renal, o que pode comprometer o tratamento do animal (Couto, 2006).

É de salientar que a manipulação destas massas pode acarretar alguns riscos para o animal. Caso exista uma desgranulação dos mastócitos, a histamina existente no interior dos grânulos é libertada, o que pode provocar hipotensão ou choque (Cian & Freeman, 2007). A nível local, pode observar-se eritema e um aumento considerável do tamanho do nódulo. Este fenómeno está relacionado com a libertação das substâncias bioactivas intragranulares, que pode levar a formação de edema. Assim, a administração prévia de anti-histamínicos é recomendada (Hedlund, 2008).



Figura 6- Mastocitoma cutâneo de conformação pouco habitual dispendo-se sob a forma de banda ou manga, em torno do membro. (Peleteiro, et al., 2011)

2.3.1.5. Sinais clínicos

Na sua maioria os mastocitomas podem ser assintomáticos e o que leva o cuidador a levar o animal ao veterinário é a presença de nódulos. No entanto, devido à libertação de histamina, a ulceração gastrointestinal está presente em mais de 80% dos cães (Hedlund, 2008). Por conseguinte, a presença de vômitos, anorexia, diarreia ou melena são sintomas sistémicos que podem estar igualmente associados. (Ozaki et al., 2002; Hedlund, 2008;).

Quando os nódulos são acompanhados de sintomatologia sistémica, normalmente, estão associados a estadios clínicos mais avançados da doença, ou seja, a uma esperança média de vida menor (O'Keefe, 1990; Mullins et al., 2006).

2.3.1.6. Corantes

Devido à elevada concentração de radicais ácidos presentes nos glicosaminoglicanos no interior dos grânulos, estes são metacromáticos. O que significa que têm a capacidade de apresentar uma cor diferente do corante que o corou, como por exemplo a coloração utilizada na histopatologia púrpura/vermelha que é dada pelo corante azul de toluidina (Marcos & Santos, 2011; Jukeira & Carneiro, 2013).

As amostras citológicas suspeitas de mastocitoma devem ser preferencialmente coradas com Giemsa ou May-Grunwald Giemsa, deste modo os grânulos característicos destas neoplasias são evidenciados (Meuten, 2002). No entanto por vezes a quantidade de grânulos pode dificultar a observação dos critérios nucleares. Sendo nestes casos a coloração mais adequada a HE (Ressel & Finotello, 2017).

Em clínica a coloração mais utilizada é o Diff-Quik. Neste tipo de coloração os grânulos podem não ser corados, o que dificulta a identificação correcta da célula, podendo ser confundida com outra neoplasia de células redondas como: linfoma, plasmocitoma ou histiocitoma. No entanto, esta situação pode ser ultrapassada aumentando o tempo de fixação para 1 minuto (Meuten, 2002; Valenciano & Cowell, 2013; Withrow et al., 2013).

2.3.1.7. Diagnóstico citológico

Citologicamente, os mastocitomas são tumores de células redondas geralmente muito esfoliativos, dando normalmente origem a amostras de moderada a elevada celularidade (Valenciano & Cowell, 2013). É possível observar um número elevado de mastócitos com quantidades moderadas de citoplasma contendo grânulos magenta. A quantidade de grânulos pode variar consoante o grau de diferenciação tumoral (Fig. 7) (Marcos et al., 2011).

Presentes no esfregaço estão também fibras de colagénio e eosinófilos, sendo que estes últimos podem até ultrapassar o número de mastócitos. O pano de fundo pode apresentar grânulos livres, provenientes do rompimento dos mastócitos (Marcos et al., 2011; Valenciano & Cowell, 2013; Withrow et al., 2013; Raskin, 2016).

O número e o tipo de grânulos que se encontram nos mastocitomas estão associados ao grau de diferenciação celular destas neoplasias. Os tumores bem diferenciados contêm grânulos citoplasmáticos mais ricos em heparina. Por sua vez, os menos os menos diferenciados, ou indiferenciados, têm mais histamina nas suas granulações (Hedlund, 2008).

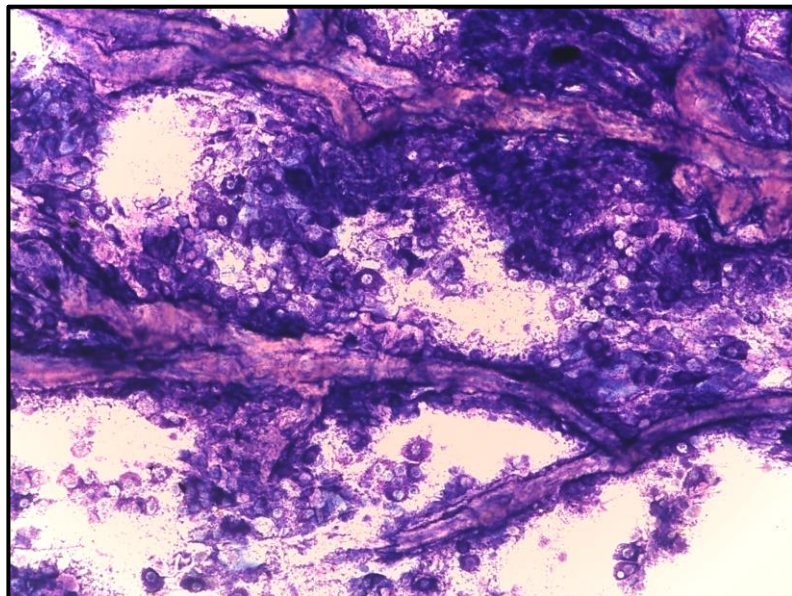


Figura 7- PAAF de nódulo cutâneo: podem ser observados mastócitos neoplásicos bem diferenciados com baixo grau de pleomorfismo. Ocasionais fibras de colagénio. A imagem é compatível com o diagnóstico de mastocitoma. Giemsa 400x

2.3.1.7.1. Graduação citológica

Em medicina veterinária, a citologia por agulha fina (PAAF) é o método mais utilizado para a obtenção do diagnóstico de mastocitomas (Pedraza, Grandi, & Rocha, 2011). A elaboração de um sólido plano de graduação, actualmente efectuado apenas com histopatologia, teria um enorme interesse clínico se pudesse ser efectuada através da citologia pois no momento do diagnóstico o médico veterinário poderia também ter uma ideia do prognóstico (Scarpa et al., 2016).

Tanto o sistema de Patnaik como o de Kiupel foram desenhados para serem aplicados à histologia, no entanto o novo sistema de graduação histológico proposto por Kiupel é mais objectivo e fácil de utilizar, baseando-se essencialmente em critérios celulares possíveis de serem avaliados em citologia (Patnaik et al., 1984; Kiupel et al., 2011; Scarpa et al., 2016). Os critérios utilizados por Kiupel incluem: avaliação da presença de cariomegalia, IM, presença de células multinucleadas, binucleadas e com núcleos bizarros (Kiupel et al., 2011).

Muito recentemente foram publicados três artigos que descrevem a implementação de um protocolo de graduação citológica com base no sistema de Kiupel, tendo sido obtidas conclusões discordantes (Scarpa et al., 2014; Camus et al., 2016; Hergt et al., 2016).

Em 2014, Scarpa procurou avaliar a aplicabilidade do sistema de graduação de Kiupel na citologia de mastocitomas cutâneos caninos e a sua correlação com o grau histológico. Dessa forma, verificou-se que de facto a graduação citológica tendo como base os parâmetros de Kiupel é factível (Scarpa et al., 2014).

Entretanto no ano de 2016 foram publicados outros dois trabalhos dentro do género (Camus et al., 2016; Hergt et al., 2016).

Segundo Camus, como é possível observar na Figura 8, estas neoplasias devem ser consideradas como sendo de alto grau sempre que forem pouco granulares ou que apresentem no mínimo dois dos quatro critérios de atípia, sendo eles: figuras de mitose, pleomorfismo nuclear, células binucleadas ou multinucleadas e >50% de anisocariose (Camus et al., 2016).

Já no estudo realizado por Hergt as amostras foram citologicamente avaliadas de duas formas. Numa primeira abordagem foram aplicados exactamente os critérios de Kiupel, ou seja, ± 7 mitoses em 10 campos de observação (HPF- 400x), ± 3 células multinucleadas em 10 HPF's, ± 3 núcleos bizarros presentes em 10 HPF's e presença ou ausência de cariomegalia. A cariomegalia foi considerada presente quando as células neoplásicas na sua maioria apresentam um núcleo 2 vezes maior do que seria considerado o normal. Num segundo momento, os autores avaliaram a presença de critérios singulares, ou seja, bastava

ser observada uma figura de mitose para ser considerado como presente, e assim adiante. A avaliação da citologia nestas duas perspectivas mostrou-se útil na medida em que não foram verificadas grandes discrepâncias de resultados (Hergt, von Bomhard, Kent, & Hirschberger, 2016).

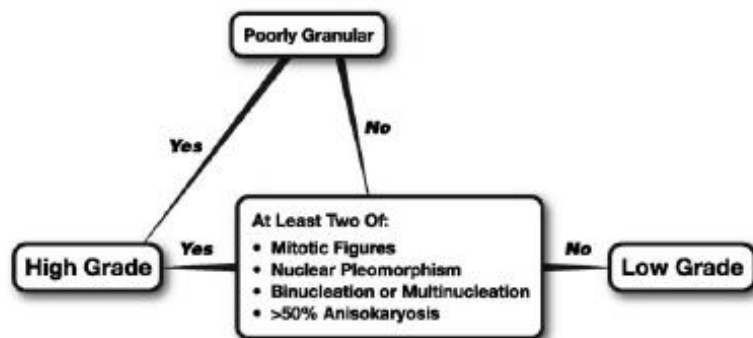


Figura 8- Algoritmo para ser aplicado na graduação citológica de MCC. (Camus et al., 2016)

2.3.1.8. Diagnóstico histopatológico

Apesar do exame citológico ser suficiente para chegar a um diagnóstico de mastocitoma, a sua confirmação e respectiva graduação ainda depende da realização da análise histopatológica (Misdorp, 2004).

A graduação histológica foi a primeira ferramenta que os patologistas tiveram para prever qual o comportamento destes tumores em cães e neste momento é a forma mais fidedigna de delinear um plano terapêutico adequado (Northrup et al., 2005; Kiupel et al., 2011; Scarpa et al., 2014). O fato do histopatologista graduar um tumor, oferece ao clínico a percepção de que a avaliação histopatológica é objectiva e absoluta (Northrup et al., 2005).

Na tentativa de obtenção de um prognóstico mais fidedigno, ao longo dos últimos 50 anos, vários sistemas de graduação têm sido elaborados, melhorados e alterados. No entanto, a existência de diferentes estudos publicados, a heterogeneidade da amostra e a subjectividade da aplicação dos métodos de graduação, levam a que exista numa grande variabilidade na aplicação dos sistemas de graduação destes tumores (Northrup et al., 2005).

2.3.1.8.1. Graduação histológica

O primeiro sistema de classificação foi publicado em 1966 por Hottendorf & Nielsen (Hottendorf & Nielsen, 1966). Este sistema tinha como critérios de diferenciação: existência de mitoses, núcleos bizarros, pleomorfismo celular e quantidade de grânulos citoplasmáticos presentes. Segundo Hottendorf, tumores com células uniformemente bem diferenciadas, com ausência de mitoses e com muitos grânulos eram classificados como maduros. Já os tumores que se apresentavam como sendo pouco granulares, com frequentes mitoses e formas celulares estranhas seriam denominados como sendo tumores anaplásicos. Todos os outros, que não se enquadravam numa classificação ou noutra eram dados como intermédios (Hottendorf & Nielsen, 1966) (Tabela 1).

Pouco tempo depois, muito semelhante ao sistema pioneiro, Bostock et al., em 1973, e Patnaik et al., em 1984 desenvolveram os principais sistemas de classificação (Bostock, 1973; Patnaik et al., 1984). Em ambos os sistemas os mastocitomas são classificados em 3 graus, no entanto, Bostock considerava que os tumores de grau I correspondiam a neoplasias indiferenciadas, e contrariamente, Patnaik atribuía este grau a tumores bem diferenciados. Por sua vez, no que dizia respeito à atribuição do grau intermédio, os autores estavam em concordância (Bostock, 1973; Patnaik et al., 1984).

Tanto no sistema de Bostock como no de Patnaik, as neoplasias consideradas pouco diferenciadas são associadas a uma taxa de sobrevivência mais baixa (Bostock, 1973; Patnaik et al., 1984). Em 1973, Bostock verificou que os cães em que eram diagnosticados tumores de grau I tinham uma taxa de sobrevivência 6 vezes maior que os que tinham tumores de Grau II e 2 vezes maior que os de Grau III. Dos critérios histológicos utilizados por Bostock fazem parte: rácio núcleo:citoplasma, IM, pleomorfismo celular e metacromasia dos grânulos (Bostock, 1973).

Por sua vez, segundo Patnaik, os mastocitomas classificados como grau I correspondem a neoplasias bem diferenciadas, com excelente prognóstico e em que a excisão cirúrgica da massa e avaliação das respectivas margens é suficiente para o tratamento; Grau III a tumores pouco diferenciados, mais agressivos, invasivos e em que para além da excisão da massa também a terapia adjuvante é aconselhada (Patnaik et al., 1984; Schultheiss et al., 2011; Scarpa et al., 2014). Patnaik, avalia critérios como: celularidade, morfologia celular, índice mitótico, invasão tecidual, reacção do estroma e necrose (Tabela 1) (Patnaik et al., 1984).

Até há poucos anos, o sistema de graduação mais utilizado pela comunidade científica era o de Patnaik (Misdorp, 2004). Contudo, a utilização de vários sistemas e respectivas modificações por parte dos patologistas e instituições levou a que o valor do

prognóstico histológico fosse questionável (Kiupel et al., 2011). Tem-se verificado que a aplicação do grau intermédio, grau II de Patnaik, tem baixo valor prognóstico, sendo difícil prever o tempo de sobrevivência. Adicionalmente, o fato de Patnaik se basear em critérios subjetivos e não quantitativos no seu método de graduação histológica promove alguma discordância entre os patologistas (Northrup et al., 2005; Kiupel et al., 2011).

Tabela 1- Tabela representativa dos vários sistemas de graduação histológicos mais utilizados, Adaptado de Hottendorf & Nielsen 1967; Painaik et al., 1984; Kiupel et al., 2011.

Hottendorf & Nielsen 1967	
Maturos	Ausência de mitoses ▪ Muitos grânulos
Anaplásicos	Presença de: mitoses, pleoformismo celular, núcleos bizarros e poucos grânulos
Patnaik et al., 1984	
Grau I	Mastócitos bem diferenciados ▪ Dispostos em grupos
Grau II	Mastócitos ligeiramente pleomórficos ▪ Moderada invasão tecidual Raras células binucleadas ▪ Possíveis nucléolos visíveis Raras mitoses ▪ Possível edema e necrose
Grau III	Mastócitos pleomórficos dispostos em tapetes ▪ Elevada invasão tecidual Células com um ou mais nucléolos ▪ Mitoses frequentes ▪ Células multinucleadas ▪ Edema, hemorragia e necrose frequentes
Kiupel et al., 2011	
Grau Baixo	< 7 Figuras de mitose < 3 Células multinucleadas < 3 Núcleos bizarros Presença de cariomegália
Grau Alto	≥ 7 figuras de mitose ≥ 3 células multinucleadas ≥ 3 núcleos bizarros Presença de cariomegália

Assim, Kiupel em 2011 propôs um novo método de graduação histológica. Nesta nova graduação são considerados apenas dois graus: grau I (baixo) e grau II (alto), sendo que os MCT de baixo grau bem diferenciados, e os de alto grau pouco diferenciados, com melhor e pior prognóstico, respectivamente. Segundo Kiupel, os mastocitomas graduados como sendo de alto grau apresentam uma evolução mais rápida no que diz respeito ao aparecimento de metástases ou ao surgimento de novas massas, logo, menor tempo de

vida, sendo este de aproximadamente 4 meses (Kiupel et al., 2011). Já os classificados como sendo de baixo grau apresentam uma maior esperança média de vida, aproximadamente 2 anos. Um total de 90% dos cães diagnosticados com MCC de alto grau morre de causas relacionadas com esta doença, sendo que 70% tendem a desenvolver metástases. Por sua vez, os de baixo grau apresentam uma mortalidade de apenas 5%, tendo 20% dos animais tendência a desenvolver novas massas (Kiupel et al., 2011).

Com esta nova escala de graduação são considerados tumores de alto grau quando após a avaliação de 10 campos se observam pelo menos 7 figuras de mitose, 3 células multinucleadas, 3 núcleos bizarros e cariomegália (Tabela1).

Comparativamente ao modelo de Patnaik, não só a aplicação da classificação em 2 graus tem-se mostrado mais consistente como também no que diz respeito à mortalidade e aparecimento de metástases têm sido obtidos prognósticos mais assertivos (Kiupel et al., 2011; Sabattini, Scarpa, Berlato, & Bettini, 2014; Sledge, Webster, & Kiupel, 2016)

2.3.1.9. Estadiamento

Para a elaboração de um plano terapêutico correto e adequado é fundamental classificar / determinar qual a extensão e gravidade da doença (Manuila et al., 2000; Couto, 2006).

Uma vez que os MCC são de fácil metastização, é de extrema importância verificar a presença ou ausência de células neoplásicas noutras localizações distantes como resultado de disseminação do tumor primário. É também muito importante avaliar o estado geral do animal, assim, pode-se afirmar que o estadiamento está assente em 3 pontos:

1. Obtenção de um diagnóstico definitivo da lesão
2. Documentação da presença ou ausência de metástases
3. Avaliação do estado geral do paciente (incluindo despiste de doença paraneoplásica (Rogers, 1996).

Para a avaliação do estado clínico do animal é também aconselhável a realização de um painel bioquímico geral, hemograma completo, análise de urina, ecografia ou radiografia dos possíveis locais de metastização e claro, avaliação citológica dos linfonodos regionais e de eventuais organomegalias (Cian & Freeman, 2007; Stefanello et al., 2009).

Tabela 2- Estadiamento clínico para cães com mastocitomas cutâneo (Adaptado de Couto, 2006 pp.1111)

Estadio	Descrição
I	Tumor restrito à derme sem envolvimento do linfonodo regional 2.4. Sem sinais sistémicos 2.5. Com sinais sistémicos
II	Tumor restrito à derme com envolvimento do linfonodo regional a. Sem sinais sistémicos b. Com sinais sistémicos
III	Tumores dérmicos múltiplos ou tumor grande infiltrativo com ou sem envolvimento do linfonodo regional a. Sem sinais sistémicos b. Com sinais sistémicos
IV	Qualquer tumor com metástases distantes ou recidivas com metástases a. Sem sinais sistémicos b. Com sinais sistémicos

2.3.1.10 Prognóstico

Uma vez que o comportamento biológico dos MCC é muito variável, o seu prognóstico é inconstante. Contudo, existem alguns factores que podem ajudar os clínicos a elaborar uma previsão. Actualmente, o método mais assertivo é o grau atribuído pela avaliação histopatológica da lesão (Kiupel et al., 2011; Scarpa, Sabattini, & Bettini, 2014). Vários autores referem a discrepância da esperança média de vida atribuída ao animal consoante o grau da lesão. Segundo Camus, os cães que apresentam um mastocitoma de grau alto têm 38 vezes mais probabilidade de morrer que animais em que foi diagnosticado uma neoplasia de baixo grau (Camus et al., 2016). Numa publicação recente, Kiupel refere que o tempo médio de vida de um paciente com MCC de alto grau é inferior a 4 meses, já nos casos de baixo grau esse tempo pode ser superior a 2 anos (Sledge et al., 2016).

Outro factor que pode ser associado a um melhor prognóstico passa por um cuidado controlo da região do nódulo. Teoriza-se também que tumores com diâmetro inferior a 3cm podem estar relacionados a um melhor prognóstico. Sendo que, a ausência de infiltração no linfonodo regional e índice mitótico inferior ou igual a cinco são igualmente factores indicatórios de uma maior esperança média de vida do animal (Mullins et al., 2006).

No caso dos MCC a localização da lesão também pode ser um dado indicativo de malignidade. Neoplasias situadas na região do prepúcio, inguinal e perineal estão descritas como sendo tendencialmente mais malignas (Hedlund, 2008).

2.3.1.11. Outros marcadores de prognóstico

A escala de graduação de Kiupel tem-se mostrado um método seguro para o delineamento do plano terapêutico e cirúrgico do animal. Contudo, apesar de existir uma forte correlação citológica e histológica tanto Scarpa et al 2014, como Camus et al., 2016 nos seus trabalhos reportam casos em que MCT de alto grau foram classificados como sendo de baixo (Scarpa et al., 2014; Camus et al., 2016).

Apesar dos avanços científicos, a classificação histológica não deve ser considerada como exacta. A avaliação histológica por si só não é capaz de prever o comportamento de cada mastocitoma especificamente, recomendando-se assim a elaboração de outros exames laboratoriais. Como tal, métodos adicionais para prever a evolução da doença e resposta à quimioterapia têm sido estudados (Strefezzi et al., 2010; Gil da Costa, 2015).

Vários índices de proliferação celular têm sido associados ao tempo de sobrevida (Simoes et al., 1994; Webster et al., 2007; Strefezzi et al., 2010). O IM tem sido desde sempre um dos critérios mais utilizado pelos patologistas para estimar a progressão das neoplasias e é um importante critério de classificação histológica dos MCT sendo parte integrante dos sistemas de classificação histológica mais utilizados (Bostock, 1973; Patnaik et al., 1984; Strefezzi et al., 2010; Kiupel et al., 2011; Sledge et al., 2016). Porém, o valor do IM revela apenas que existem células na fase M do ciclo de crescimento celular (Strefezzi et al., 2010; Sledge et al., 2016).

O PCNA é uma proteína que actua na síntese e reparação do DNA como tal, esta proteína pode ser detectada nas fases G1, S, G2 e M. Já na fase G0 do ciclo, esta proteína esta ausente. Por outro lado, uma vez que esta proteína tem um tempo de semi-vida longo, as fracções proliferativas muitas vezes podem ser sobre-estimadas (Madewell, 2001; Hedlund, 2008; Strefezzi et al., 2010; Natividade et al., 2014).

A marcação imuno-histoquímica de Ki- 67 é actualmente o método mais utilizado para avaliar a actividade proliferativa de uma população celular. Teoriza-se que este antigénio está relacionado com o RNA nucleolar, assim, tal como o PCNA está presente em todas as fases do ciclo. Porém, o Ki-67 tem uma meia-vida curta, cerca de 1h pós mitose, o que permite que mesmo com uma marcação leve possam ser consideradas positivas. (Madewell, 2001) Em 2001, Strefezzi publicou um estudo onde conclui que a avaliação da

actividade proliferativa tumoral pela detecção imuno-histoquímica de Ki-67 pode incrementar a previsão da mortalidade e período de sobrevivência pós cirúrgico dado pela graduação histopatológica de MCC (Strefezzi et al., 2010).

A combinação dos resultados obtidos pela avaliação do Ki-67 e do PCNA são considerados como método de prognóstico para recidiva local (Webster et al., 2007)

Outro método que tem sido aplicado para prevenir a evolução da doença é a contagem das AgNORs. Através da avaliação destas zonas é possível saber se existe proliferação celular. Segundo alguns estudos, verificou-se que as neoplasias com contagens mais elevadas de AgNORs são menos diferenciadas (Simoes et al., 1994; Sledge et al., 2016). Paralelamente, contagens menores são associadas a neoplasias menos agressivas, com uma esperança média de vida maior (Blackwood et al., 2012). O valor prognóstico da contagem de AgNORs não é independente do grau histológico, porém pode contribuir para a decisão da abordagem terapêutica (Blackwood et al., 2012). Enquanto que o estudo dos AgNORs indica a taxa de proliferação, o Ki-67 diz-nos quais células estão de facto a progredir no ciclo. Assim, considera-se que o índice AgNOR x Ki-67 é o melhor método de avaliar o comportamento tumoral (Webster et al., 2007; Sledge et al., 2016).

No que diz respeito à oncogénese dos MCT, a proteína c-kit tem-se mostrado uma ferramenta bastante útil não só como meio de diagnóstico mas também como marcador terapêutico (Gil da Costa, 2015). As mutações do ckit são mais comuns no exão 11. Segundo Downing em 2002 as suas mutações são mais frequentes nos MCT de alto grau (30-50%) (Downing et al., 2002). Sendo que estas mutações foram identificadas tanto nos tumores primários como nas metástases (Giantin et al., 2014). Tanto Zemke em 2002, como Webster em 2006 encontraram uma forte correlação entre as mutações do ckit no exão 11 e um fenótipo mais agressivo do mastocitomas (Zemke et al., 2002; Webster et al., 2006). As mutações do gene ckit levam à expressão de uma proteína activa. Esta proteína vai acumular-se no citoplasma dos mastócitos modificando o seu padrão de expressão e essa alteração pode ser detectada através de técnicas imuno-histoquímicas (Kiupel et al., 2004; Gil da Costa, 2015; Sledge et al., 2016). Aplicando a imunohistoquímica são considerados 3 padrões de marcação: membranar (I), peri-nuclear focal (II) e citoplasmático difuso (III). Sendo que os padrões II e III estão fortemente associados a uma diminuição da esperança média de vida do paciente, ou seja, a uma neoplasia mais agressiva (Webster et al., 2006; Poggiani, 2012).

2.3.1.12. Síndrome paraneoplásica

Muitas vezes a síndrome paraneoplásica pode estar associada ao MCT. As substâncias bioativas presentes nos grânulos citoplasmáticos dos mastócitos, podem libertar-se na corrente sanguínea e provocar os mais variados sintomas podendo, nos casos mais graves, conduzir à morte do animal (Macy, 1986; Dean, 1988; Misdorp, 2004). Recorrentemente descrita nos casos destes tumores é a ulceração gastrointestinal. Sinais clínicos como: anorexia, vômitos, hematoquécia, melena, anemia, dor abdominal, podem estar presentes (Hedlund, 2008; Withrow et al., 2013). A perfuração gastrointestinal e peritonite também não estão descartadas. Normalmente estas ocorrências estão associadas a MCT mais agressivos, de alto grau (Thamm et al., 2006; Dobson & Scase, 2007; Hedlund, 2008).

Outro aspecto que se verifica também com alguma frequência é a eosinofilia, esta alteração tendencialmente é mais comum em casos disseminados, e que pode estar relacionada a uma resposta inflamatória (Cardoso, 2007; Withrow, Vail, & Page, 2013).

Após a manipulação do tumor, sendo por meio da realização da PAAF ou durante a cirurgia aquando da sua remoção podem ser ocorrer hemorragias locais e atrasos na cicatrização. Isto deve-se à libertação da histamina e à sua capacidade de bloquear os receptores dos macrófagos, o que irá induzir a libertação do factor supressor dos fibroblastos levando a uma diminuição da síntese de colagénio provocando assim um atraso na cicatrização (Thamm et al., 2006).

Outro fenómeno que pode ocorrer é o aumento do tempo de coagulação, alteração relacionada com a libertação da heparina contida no interior dos grânulos (Hedlund, 2008).

2.3.1.13. Tratamento

Uma vez que as opções terapêuticas diferem consoante a agressividade da neoplasia, para a elaboração de um plano terapêutico mais eficaz é fundamental o clínico ter um correto diagnóstico e respectiva graduação (Couto, 2006).

No caso de se tratar de um mastocitoma bem diferenciado a excisão cirúrgica da massa é suficiente. Contudo, caso se trate de uma massa pouco diferenciada o tratamento cirúrgico pode ter que ser complementado com radioterapia, corticoesteróides, quimioterapia, ou uma combinação destes, consoante o estado clínico do paciente (Misdorp, 2004; Northrup et al., 2005; Couto, 2006; Cian & Freeman, 2007). Durante a manipulação da

neoplasia pode haver libertação de heparina e enzimas proteolíticas, o que pode levar a um aumento do tempo de coagulação e retardar a cicatrização da ferida cirúrgica (Hedlund, 2008).

Independentemente do seu grau de malignidade, aquando da sua remoção cirúrgica devem ser deixadas amplas margens de segurança. Segundo alguns trabalhos publicados, as neoplasias deveriam ser excisadas com margens de 3cm (O'Keefe, 1990; Misdorp, 2004). Todavia, trabalhos mais actuais sugerem que neoplasias de baixo grau podem ser removidas lateralmente com 2 cm de margem e pelo menos uma camada de tecido muscular em profundidade (Fulcher et al., 2006).

Após excisão, as margens devem ser analisadas por histopatologia, para determinar se estão efectivamente livres de células tumorais (Camus et al., 2016; Hedlund, 2008; Sledge et al., 2016).

Os MCT que não possam ser retirados na totalidade ou que não tenham margens seguras devem ser remetidos para a radioterapia e ou quimioterapia conforme o grau do tumor (Hedlund, 2008).

2.3.2. Mastocitoma subcutâneo

Na sua maioria, os mastocitomas têm origem cutânea, podendo estender-se até ao tecido subcutâneo. No entanto, apesar de raros, existem mastocitomas cuja origem primária ocorre no tecido subcutâneo (Thompson et al., 2011). Thompson refere que apesar da graduação não se aplicar aos mastocitomas subcutâneos, é nestas neoplasias que se tem verificado uma maior ocorrência de tumores que se comportam de forma menos agressiva, ou seja, o animal tem uma esperança média de vida maior (Thompson et al., 2011). No mesmo estudo, Thompson relata a possibilidade de por vezes as neoplasias originárias nos mastócitos serem erradamente classificadas como subcutâneas, visto que em alguns casos basta realizar uma secção oblíqua nas amostras para que estas percam a sua componente cutânea, fazendo parecer assim uma massa exclusivamente subcutânea (Ozaki et al., 2002; Kiupel et al., 2004; Thompson et al., 2011). A escala de graduação histológica elaborada por Patnaik em 1984 não abrange este tipo de mastocitoma, todavia, dada a localização subcutânea das lesões, alguns patologistas classificam estas neoplasias como sendo de Grau II, considerando uma suposta invasão cutânea (Patnaik et al., 1984; Kiupel et al., 2004; Thompson et al., 2011).

Dado o comportamento biológico dos mastocitomas subcutâneos, na maioria das vezes a excisão cirúrgica da massa é suficiente para o tratamento do animal (Thompson et al., 2011).

Não é conhecida qualquer predisposição para o aparecimento destas neoplasias, contudo, verificou-se que animais da raça Labrador Retriever e Boxer podem ser mais afectados (Thompson et al., 2011).

2.3.3. Mastocitoma visceral

O mastocitoma visceral é mais comum em gatos. Quando ocorre em cães, apesar de raros, são mais comuns na cavidade torácica e abdominal, sendo que, o trato digestivo superior parece ser o mais afectado (Patnaik et al., 1980; Patnaik et al., 1984; Takahashi et al., 2000; Ozaki et al., 2002; Grano et al., 2012). Em cães, as raças miniatura como o Maltês, Yorkshire Terrier, Chihuahua, e Spitz Anão estão mais predispostas (Takahashi et al., 2000; Ozaki et al., 2002).

O seu comportamento biológico pode ser diferente dos de origem cutânea (Takahashi et al., 2000). Normalmente os animais chegam à consulta com queixas de vômitos, diarreia, dor abdominal, letargia e anemia o que leva a que inicialmente os pacientes sejam medicados para problemas de ulceração gastrointestinal (Ozaki et al., 2002; Takahashi et al., 2000; Grano et al., 2012).

A ausência de sintomatologia específica pode dificultar a obtenção de um diagnóstico rápido e preciso e a rápida progressão da doença contribui para uma curta esperança média de vida (Takahashi et al., 2000).

Geralmente, a identificação destas neoplasias acontece através da realização de uma laparotomia exploratória, mas o Rx e a ecografia também têm mostrado alguns resultados (Patnaik et al., 1980; Takahashi et al., 2000).

No estudo publicado por Ozaki em 2002, verificou-se que a graduação histopatológica existente para a classificação dos mastocitomas cutâneos não é extensível aos viscerais. No mesmo trabalho não foi encontrada relação entre o pleomorfismo celular e o prognóstico bem como também não foi encontrada qualquer relação entre o pleomorfismo celular e a expressão do C-kit (Ozaki et al., 2002).

3. Objectivo do estudo

Os mastocitomas cutâneos caninos têm sido assunto em inúmeras publicações. Classicamente, a graduação dos MCT é apenas feita por histopatologia. Tendo em conta o novo sistema de graduação histológica de Kiupel e o facto deste se basear nos critérios citomorfológicos, têm sido realizados estudos onde são propostos alguns métodos de classificação dos mastocitomas cutâneos através da citologia, e até então têm sido obtidos resultados discordantes. (Scarpa et al., 2014; Camus et al., 2016; Hergt et al., 2016)

Deste modo, com este trabalho pretende-se avaliar a acuidade da citologia na graduação de MCC tendo como gold standard a graduação histopatológica de Kiupel. Pretendeu-se também identificar os parâmetros mais úteis para este fim.

4. Materiais e Métodos

A realização deste estudo deu-se em sete fases. (Tabela 3)

1ª Fase – Inicialmente foi realizado o levantamento de todos os mastocitomas diagnosticados através da análise citológica no Laboratório CEDIVET no período compreendido entre Outubro de 2014 e Abril de 2016, recolhendo assim 173 casos. Todavia, enquanto estagiária do Laboratório de Análises Clínicas e Histopatologia (LACH) tive acesso a outras 4 amostras citológicas perfazendo assim um total de 177 amostras neoplásicas recolhidas.

2ª Fase – Nesta etapa do processo foi efectuada uma selecção das amostras onde foram incluídas apenas as neoplasias que possuíam uma graduação histopatológica de Kiupel, sendo excluídos os mastocitomas subcutâneos e as citologias com escassa celularidade e/ou qualidade ficando assim para estudo 33 neoplasias provenientes do laboratório CEDIVET e 2 do LACH, fazendo assim um total de 35 neoplasias para o desenvolvimento deste trabalho.

Neste mesmo período, foi desenvolvida uma base de dados onde constam todos os dados disponibilizados nos formulários de análise dos respectivos laboratórios dos animais presentes no estudo. Nesta base de dados é possível aceder ao número e ano da análise, sexo, idade, raça, características e local da lesão, nome do animal, do seu tutor e do centro veterinário de onde provem a amostra.

3ª Fase – Para a determinação de quais os parâmetros a avaliar foi tido como base a graduação histológica de Kiupel, contudo, após um período de pesquisa e reflexão verificou-se que poderiam existir outras características citológicas que poderiam ou não vir a

ser relevantes para a graduação citológica destas neoplasias. Posto isto, as 35 citologias onde foram classificadas/quantificadas as seguintes características: colagenólise (ausente/presente), eosinófilos (Poucos/Muitos), células fusiformes (ausentes/presentes), Necrose (ausente/presente), macrocariose (ausente/presente), anisocariose e anisocitose (ligeira/marcada se >50% de variação de tamanho), mitoses, células multinucleadas, binucleadas e núcleos bizarros foram classificadas como (ausente/presente), cariomegália (ausente/presente aquando aumento >2x), células com poucos grânulos e células com muitos grânulos (poucas/muitas), variação do tamanho dos grânulos (não varia/varia), posição dos grânulos no citoplasma (dispersos/periféricos/mistos) sendo que mistos englobavam dispersos e periféricos), presença de grânulos polarizados (ausentes/presentes). Durante este processo de estudo das lâminas, todos os 35 casos foram avaliados sempre pelo mesmo patologista, cego ao diagnóstico histológico (Apêndice I)

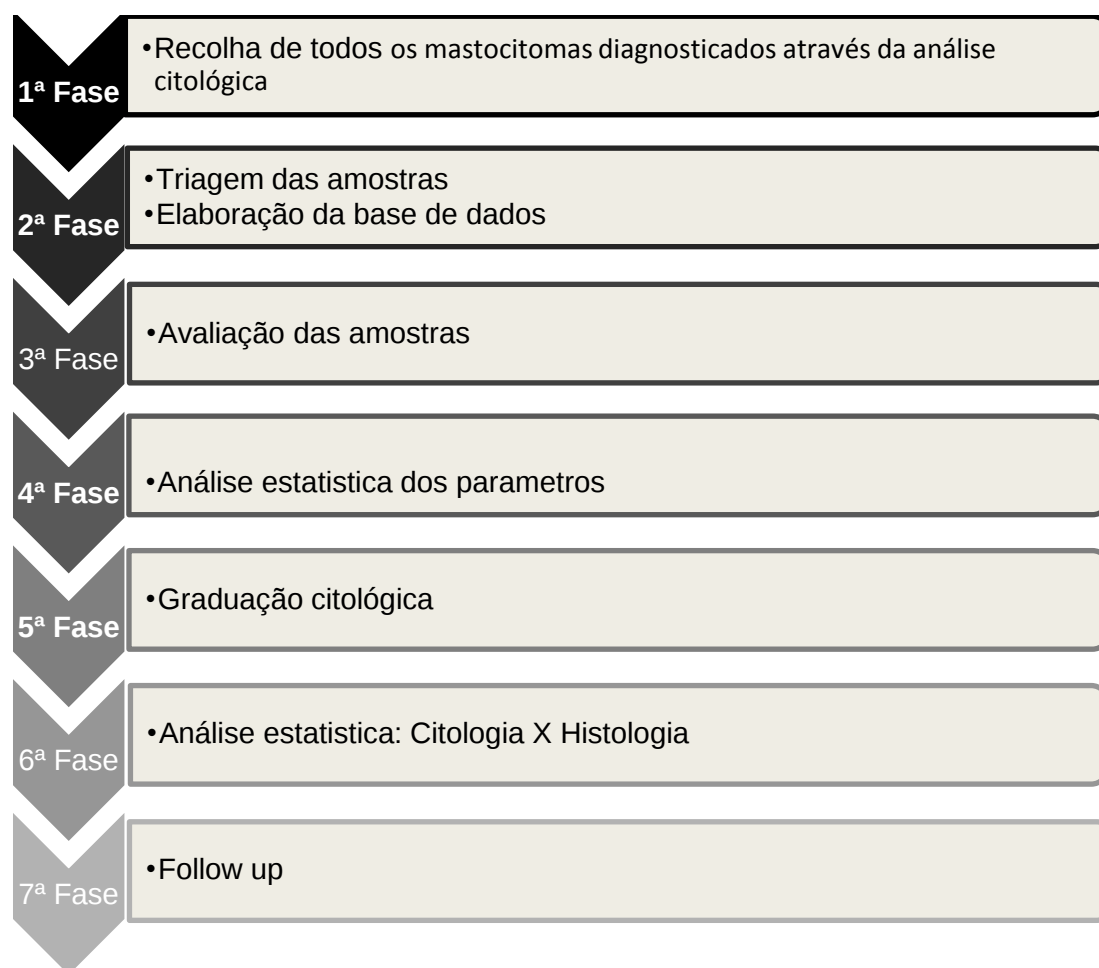
4ª Fase – Foram avaliados quais destes parâmetros se mostraram estatisticamente mais significativos para a graduação citológica, aproveitou-se para verificar se existe algum grupo de parâmetros que sejam indicativos de se tratar de um MCT de baixo ou alto grau e também se utilizou este trabalho para descartar a utilidade de outras características celulares.

5ª Fase - Todos os casos foram classificadas como alto grau se tivessem pelo menos dois dos parâmetros previamente identificados como estatisticamente significativos para a graduação citológica dos MCT.

6ª Fase – Nesta fase do trabalho foi realizada a análise estatística onde foram calculados os graus de concordância entre os resultados obtidos através da citologia e a histopatologia utilizando o método de Kappa, o teste exacto de Fisher (Chi-quadrado) e todos os testes que promovem a validade do estudo.

7ª Fase - A última etapa do desenvolvimento desta obra passou pela realização do seguimento dos animais estudados. Esta fase foi desenvolvida em Abril de 2017, logo foi obtido o follow up dos animais com pelo menos 1 ano. O seguimento foi realizado através do contacto telefónico com os respectivos centros médico-veterinários responsáveis pela obtenção das amostras. Foram colocadas algumas questões como: estado geral do paciente, presença de novas neoplasias ou recidiva e formas de tratamento efetuadas.

Tabela 3- Tabela representativa das fases de estudo aplicadas neste trabalho.



4.1. Tratamento das amostras

Todas as amostras foram colhidas por PAF durante o exame clínico. Ainda no Centro Médico Veterinário foi feito o esfregaço em lâminas de vidro, secagem ao ar e identificação das respectivas do material aspirado. As amostras foram enviadas para o laboratório devidamente acondicionadas, onde foram coradas com Diff-Quick.

Contudo, uma vez que esta coloração está descrita como não sendo a mais indicada para o estudo dos grânulos citoplasmáticos presentes nos mastócitos, duas amostras foram também com May-Grünwald Giemsa.

4.2. Análise Estatística

A análise estatística foi realizada com recurso ao programa Microsoft Office Excel 2007 e ao software estatístico Statistical Package for Social Sciences (IBM SPSS, versão 22). Inicialmente foi realizada uma abordagem de estatística descritiva com a análise de frequências, para a caracterização da amostra em estudo quanto às várias variáveis.

Com recurso ao teste exacto de Fisher e qui-quadrado, foi avaliada qual a significância de cada parâmetro bem como procurou-se verificar a existência de eventuais relações entre os critérios estudados e o grau de malignidade da neoplasia.

A correlação entre a citologia e a histologia foi calculada utilizando o Chi-quadrado e coeficiente de Kappa.

5. Resultados

5.1. Caracterização da amostra

Foram incluídas no estudo um total de 35 citologias de MCT pertencentes a 31 animais, ou seja, a unidade estatística é a neoplasia e não o animal.

De acordo com a análise histopatológica 26 (74,3%) e 9 (25,7%) dos casos foram classificados como sendo de baixo e alto grau, por sua vez pelo método citológico foram contabilizadas 25 (71,4%) e 10 (28,5%), respectivamente. Assim, verificou-se a existência de uma relação significativa entre a classificação citológica e a histológica, bem como uma forte correlação entre ambas (chi-quadrado (1, N=35) = 30,288, $p = 0,000$; $R^2 = 0,930$, $p = 0,000$) ($K = 0,928$) (Tabela 4).

Tabela 4- Tabela de contingência 2x2 representativa dos resultados obtidos utilizando a nossa proposta de graduação citológica de MCC e comparando com o diagnóstico obtido pela histopatologia usando a escala de Kiupel.

		Grau Citológico		
Grau Histológico		Baixo	Alto	Total
	Baixo	25	1	26
	Alto	0	9	9
	Total	25	10	35

A colagenólise esteve ausente em 18 (51,4%) e presente em 17 (48,6%) dos casos, os eosinófilos foram contabilizados como poucos em 27 (77,1%) e como muitos em 8 (22,9%) dos casos, células fusiformes foram consideradas ausentes 5 (14,3%) poucas 26 (74,3%) e muitas 4 (11,4%) vezes, a necrose esteve ausente em 34 (97,1%) e presente em 1 (2,9%) das citologias, macrocitose ausente em 24 (68,6%) e presente 11 (31,4%) vezes, anisocariose ausente 24 (68,6%) e presente 11 (31,4%), anisocitose ligeira 30 (85,7%) e marcada 5 (14,3%), mitoses ausentes 30 (85,7%) e presentes 5 (14,3%), células multinucleadas estiveram presentes 32 (91,4%) e ausentes 3 (8,6%), células binucleadas 22 (62,9%) e ausentes 13 (37,1%), células com núcleos bizarros ausentes 32 (91,4%) e presentes 3 (8,6%), cariomegália presente 30 (85,7%) e ausente 5 (14,3%), células com

pouca granulação ausentes 22 (62,9%) e presentes 13 (37,1%) células com elevada granulação citoplasmática foram contabilizadas ausentes em 12 (34,3) e presentes em 23 (65,7%) dos casos, a variação dos grânulos citoplasmáticos esteve ausente 27 (77,1) e presente em 8 (22,9%) das amostras, a posição dos grânulos foi classificada como dispersos 20 (57,1%) e misto (disperso e periférico) em 15 (42,9) dos casos e por fim a presença de grânulos polarizados esteve ausente 24 (77,1) e presente 8 (22,9%) das amostras.

Conforme é possível observar na tabela 5, a colagenólise foi classificada como presente 13x em mastocitomas de baixo grau e 4x nos de alto, os eosinófilos foram classificados como presentes 5x em mastocitomas de baixo grau e 3x nos de alto, as células fusiformes foram classificadas como presentes 23x em baixo grau e 7x em alto, a necrose foi classificada como presente em 0 casos de baixo grau e 1x em alto, a macrocitose foi classificada como presente 4x em baixo grau e 7x em alto, a anisocariose foi classificada como presente 2x em baixo grau e 9x em alto, anisocitose foi classificada como presente 2x em baixo e 3x em alto, as mitoses foram classificadas como presentes em 0 casos de baixo grau e presentes 5x em alto, as células multinucleadas foram consideradas presentes em 0 casos de baixo grau e presentes 3x em alto, a presença de células binucleadas foram classificadas como presentes 5x nos mastocitomas de baixo grau e 8x em alto, os núcleos bizarros foram classificados em 0 mastocitomas de baixo grau e 3 de alto, a cariomegália foi classificada como presente 0x nos casos de baixo grau e 5x nos de alto, a baixa granulação citoplasmática foi classificada 4x em baixo grau e 9x em alto, a elevada granulação citoplasmática foi classificada como presente 23x nos mastocitomas de baixo grau e 0x em alto, a variação do tamanho dos grânulos esteve presente 5x nos casos de baixo grau e 3x nos de alto, os grânulos polarizados foram classificados como presentes 7x quando de grau baixo e 1x em grau alto (Gráfico 1) (Tabela 5).

Gráfico 1- Representação dos resultados. Relação dos critérios citológicos observados com a graduação histopatológica atribuída.

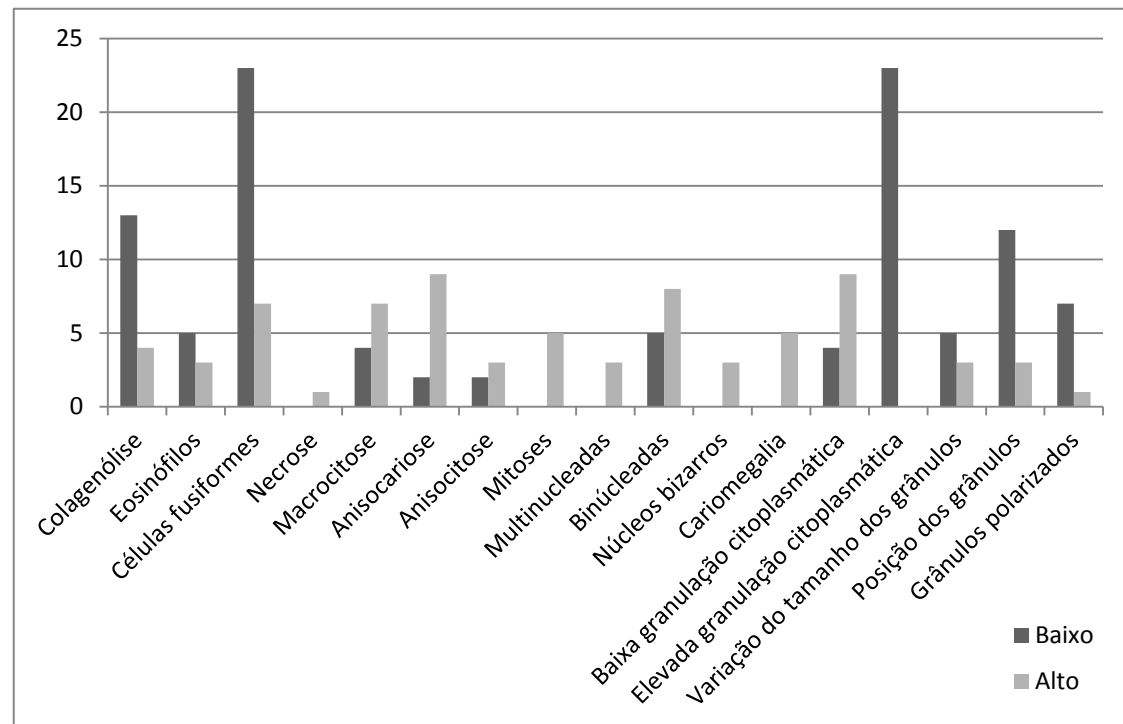


Tabela 5- Representação dos resultados, distribuição dos critérios citológicos observados em relação à graduação histopatológica atribuída.

Parâmetro	Baixo	Alto	N total
Colagenólise	13 (76.47%)	4 (23.53%)	17
Eosinófilos	5 (62.5%)	3 (37.55%)	8
Células fusiformes	2 (50%)	2 (50%)	4
Necrose	0	1 (100%)	1
Macrocitose	4 (36%)	7 (64%)	11
Anisocariose	2 (18%)	9 (82%)	11
Anisocitose	2 (40%)	3 (60%)	5
Mitoses	0	5 (100%)	5
Multinucleadas	0	3 (100%)	3
Binucleadas	5 (38%)	8 (62%)	13
Núcleos bizarros	0	3 (100%)	3
Cariomegalia	0	5 (100%)	5
Baixa granulação citoplasmática	4 (31%)	9 (69%)	13
Elevada granulação citoplasmática	23 (100%)	0	23
Variação do tamanho dos grânulos	5 (62,5%)	3 (37,5%)	8
Posição dos grânulos	12 (80%)	3 (20%)	15
Grânulos polarizados	7 (87,5%)	1 (12,5%)	8

Fazendo uma correlação com a graduação dada pela histopatologia os parâmetros avaliados que se mostraram estatisticamente mais significativos para a graduação citológica foram: anisocariose ($p<0,001$), mitoses ($p<0,001$), células binucleadas ($p<0,001$), cariomegália ($p<0,001$) e células com pouca granulação citoplasmática ($p<0,001$) .

Os critérios que se mostraram moderadamente significativos foram: macrocitose ($p=0,001$), células multinucleadas ($p=0,002$) e núcleos bizarros ($p=0,002$).

Outros parâmetros que apesar de não apresentarem uma correlação significativa mas que mesmo assim ainda podem sugerir estarem relacionados com a classificação de MCC: necrose ($p=0,085$), e anisocitose ($p=0,058$).

Por último os que não se mostraram de todo significantes para a graduação foram: colagenólise, eosinófilos, células fusiformes, tamanho e posição dos grânulos.

Assim sendo, neste estudo a graduação citológica de todos os casos foi efectuada com base nos seguintes parâmetros: mitoses, células binucleadas, cariomegália, anisocariose ou pouca granulação citoplasmática. Sendo que para uma amostra ser classificada como de alto grau é necessária a observação de mais de dois destes critérios. (Fig.9-11)

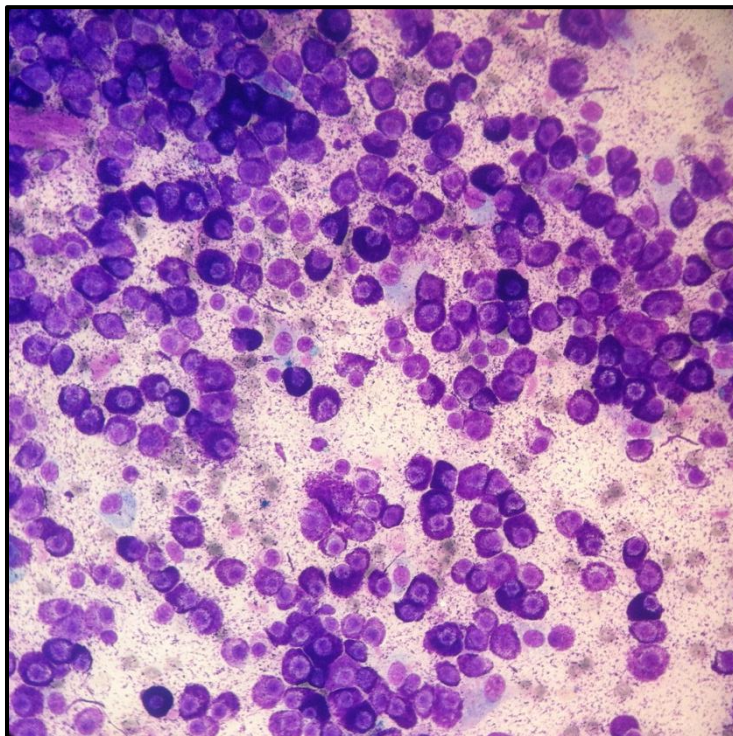


Figura 9- PAAF de nódulo cutâneo: Amostra citológica bastante celular com frequentes mastócitos muito granulares e mínima anisocitose. Mastocitoma de baixo grau. Giemsa 400x

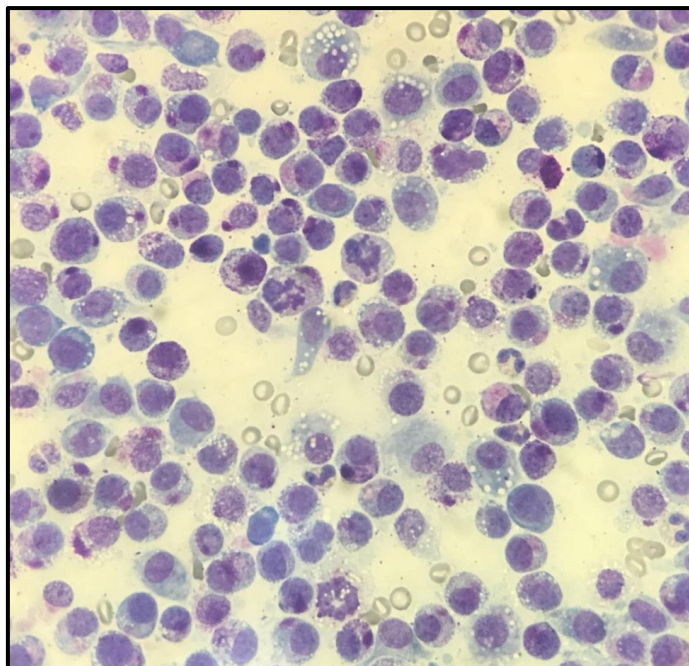


Figura 10- PAAF de nódulo cutâneo: Frequentes mastócitos pouco granulares, várias mitoses e grânulos em posição polarizada. Mastocitoma de alto grau. Giemsa 400x

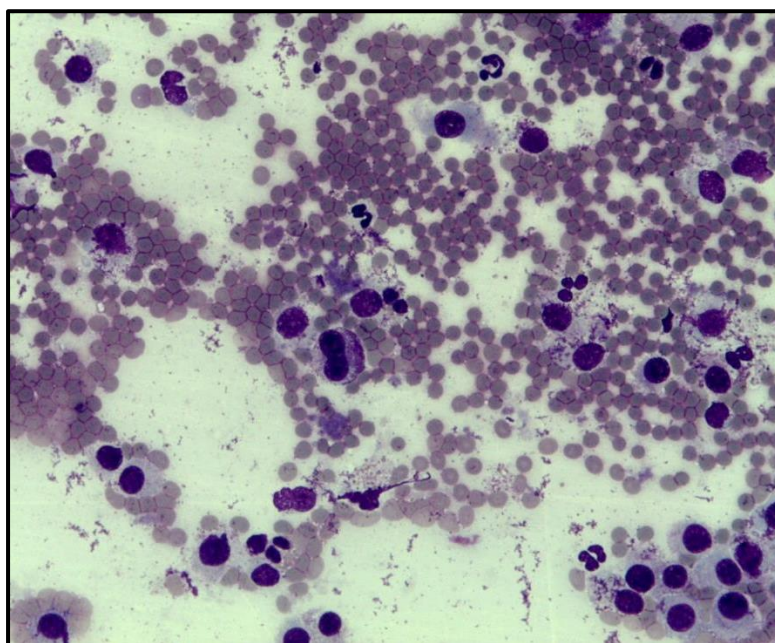


Figura 11- PAAF de nódulo cutâneo: As células neoplásicas apresentam fraca granulação citoplasmática. Note-se a presença de uma célula binucleada. Mastocitoma de alto grau. Giemsa 400x

Tal como reportado no estudo de Camus, no nosso trabalho também foram observadas duas amostras que apresentavam duas populações de mastócitos: uma população de mastócitos com muitos e outra com poucos grânulos (Fig. 12) (Camus et al., 2016). Nestes dois casos, como não apresentavam outros sinais de atipia, as amostras foram graduadas como sendo de baixo grau. Esta graduação foi confirmada pela histopatologia.

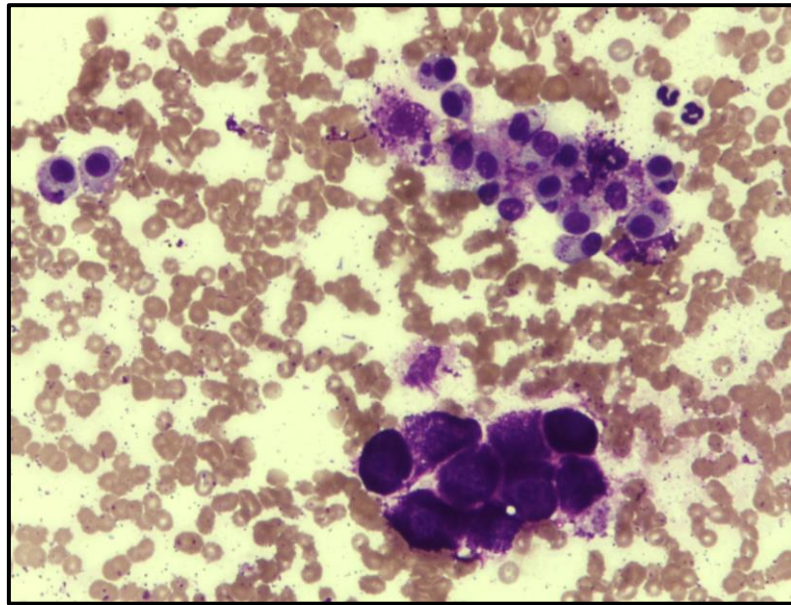


Figura 12- Imagem citológica de MCC: são visíveis dois grupos distintos de mastócitos: um grupo com elevada granulação e outro pobre em grânulos citoplasmáticos. Giemsa 400x

5.2. Validade do teste

Os resultados dos cálculos da sensibilidade, especificidade, acuidade, valor preditivo positivo e negativo são apresentados na tabela 6.

Tabela 6- Tabela de contingência 2x2 com os resultados da validação do teste utilizando o método sugerido neste trabalho para a graduação citológica de mastocitomas cutâneos caninos tendo a graduação histológica de Kiupel como gold standard.

Sensibilidade	100%
Especificidade	96%
Acuidade	97%
Valor Preditivo Positivo	90%
Valor Preditivo Negativo	100%

5.3. Acompanhamento pós-cirúrgico

Das 35 neoplasias avaliadas neste estudo foi possível obter o seguimento de 32.

Destes 32 casos, 9 faleceram ou foram eutanasiados devido a causas relacionadas com o mastocitoma e os restantes 23 até à data encontram-se vivos e sem sinais de recidiva e/ou metástases. Dos 9 animais que morreram, 8 tinham sido diagnosticados tanto na citologia como na histologia com MCT de alto grau (tabela 7).

Tabela 7- Tabela representativa dos resultados obtidos do cruzamento de dados entre o Follow Up e o grau histopatológico.

	Baixo	Alto	N Total
Vivo	23	0	23
Morto	1	8	9
N Total	24	8	32

6. Discussão

Este estudo, apesar de incidir sobre um número limitado de casos, apoia os dados recentemente publicados onde se afirma que a citologia pode e deve ser utilizada não só como meio de diagnóstico mas também como método de graduação dos mastocitomas cutâneos caninos (Camus et al., 2016; Scarpa et al., 2014).

No início deste trabalho existia apenas um artigo publicado referente ao tema (Scarpa et al., 2014). Em 2014 Scarpa elaborou um estudo onde se pôde concluir que os critérios utilizados por Kiupel na sua escala de graduação histológica poderiam vir a ser aplicáveis à citologia. Porém, seria necessário realizar mais estudos com mais dados e maior follow-up (Kiupel et al., 2011; Scarpa et al., 2014). Scarpa, avaliou apenas os parâmetros de Kiupel, deixando de fora um dos parâmetros desde sempre utilizado pelos patologistas para identificar um mastocitoma mais agressivo: a quantidade de grânulos citoplasmáticos. Para a elaboração desta dissertação, foram avaliados não só os parâmetros de Kiupel: figuras de mitose, células multinucleadas, núcleos bizarros, presença e cariomegália; como também outros parâmetros que se pensou serem também relevantes, adicionando assim informação ao único artigo publicado até então como: colagenólise, eosinófilos, células fusiformes, necrose, macrocitose, anisocariose, anisocitose, células binucleadas, granulação citoplasmática, tamanho e posição dos grânulos citoplasmáticos (Kiupel et al., 2011; Scarpa, Sabattini, & Bettini, 2014) (Tabela 8).

No decorrer do ano de 2016 surgiram duas novas publicações sobre este tema. O trabalho de Camus, tal como a presente dissertação, não avaliou apenas os parâmetros de Kiupel mas também outros critérios que os autores pensaram ser pertinentes, como a granulação citoplasmática, colagenólise, macrocitose e anisocariose (tabela 8) (Camus et al., 2016).

Neste trabalho, os autores afirmam que de facto a graduação citológica pode ser um método bastante útil tanto no delineamento do plano terapêutico como no prognóstico. Estabeleceram assim um algoritmo para ser aplicado na classificação dos mastocitomas cutâneos em cães, permitindo a classificação dos tumores em alto ou baixo grau. Segundo estes autores, para um tumor ser classificado como alto grau basta apresentar poucos grânulos citoplasmáticos, porém, se a amostra for muito granular, pode ser igualmente classificada como alto grau se apresentar pelo menos dois dos seguintes critérios: figuras de mitose, pleomorfismo nuclear, binucleação ou multinucleação e presença de pelo menos 50% de anisocariose (Camus et al., 2016).

A presente obra assemelha-se ao trabalho de Camus em muitos pontos. Contudo, para este estudo tivemos como critério de comparação o resultado da histopatologia, enquanto Camus comparou os seus resultados quer com a histopatologia, quer com o tempo de sobrevivência do animal (Tabela 8).

Tabela 8- Tabela comparativa dos diferentes métodos de graduação citológica de MCC. (Camus et al., 2016; Hergt et al., 2016; Scarpa et al., 2014)

	Scarpa et al., 2014	Camus et al., 2016	Hergt et al., 2016	Esta dissertação
Parâmetros de Kiupel	Mitoses Células Multinucleadas Binucleadas Núcleos Bizarros Cariomegália	Mioses Células multinucleadas Binucleadas Núcleos Bizarros Cariomegália	Mitoses Células multinucleadas Núcleos Bizarros Cariomegália	Mitoses Células multinucleadas Binucleadas Núcleos Bizarros Cariomegália
Outros Parâmetros		Colagenólise Macrocitose Anisocariose Granulação citoplasmática		Colagenólise Eosinófilos Células fusiformes Necrose Macrocitose Anisocariose Anisocitose Granulação citoplasmática Variação do tamanho dos grânulos Posição dos grânulos
Gold standart	Escala de graduação de Kiupel	Tempo de sobrevivência E escala de graduação Kiupel	Escala de graduação de Kiupel	Escala de graduação de Kiupel

Neste trabalho foram classificados como alto grau os mastocitomas que apresentavam 2 ou mais critérios de atípia, sendo eles: mitoses, cariomegália, anisocariose ou pouca granulação citoplasmática (Fig.13). Este sistema de classificação citológica mostrou uma boa acuidade diagnóstica (97%), sendo de salientar o elevado VPN (100%). Isto significa que a probabilidade deste método graduar citologicamente uma amostra como sendo de baixo grau e este resultado ser confirmado pela histopatologia é elevadíssima.

Outro valor que nos mostra que este método pode ser aplicado é o facto da correlação citologia- histologia ser quase perfeita, apresentando um valor de $K = 0,928$ (tabela 6).

Das 35 amostras presentes no estudo, 26 foram histopatologicamente diagnosticadas como tratando-se de uma neoplasia de baixo grau e 9 de alto. Por outro lado, a citologia identificou 25 dos casos como sendo de baixo e 10 de alto, ou seja, aplicando o método de graduação citológica encontrada neste trabalho obteve-se 1 falso positivo (tabela 4). Este caso tinha menos grânulos citoplasmáticos e moderada anisocitose, o que nos levou a considera-lo como de alto grau. A histopatologia, contudo, não confirmou esta classificação.

Para a elaboração desta dissertação de mestrado, foram avaliados no total 15 parâmetros citológicos. Relativamente à presença de mitoses, células com núcleos bizarros, binucleação e multinucleação bastava a observação de uma célula com características atípicas para um desses parâmetros ser considerado como presente. No estudo elaborado por Hergt não foram encontradas diferenças consideráveis aplicando rigorosamente os critérios de Kiupel ou considerando como presente quando a observação de uma célula atípica (Hergt, von Bomhard, Kent, & Hirschberger, 2016). Após a análise estatística, tal como o esperado, nem todos os parâmetros estudados se mostraram significativos para a classificação destas neoplasias. Entre estes últimos temos a observação de colagenólise, eosinófilos, células fusiformes, tamanho e posição dos grânulos citoplasmáticos dos mastócitos. Todos estes parâmetros referidos apresentaram valores incompatíveis com uma correlação cito–histopatologia. Apesar destes critérios não se terem mostrado úteis para esta graduação, a nível académico o seu estudo foi relevante na medida que já se sabe que não estão correlacionados. Camus no seu estudo, procurou também estabelecer uma ligação entre a colagenólise e o grau tumoral no entanto, tal como no nosso trabalho a correlação foi baixa (Camus et al., 2016).

No presente trabalho existem critérios que podem sugerir tratar-se de um mastocitoma de alto grau, contudo, os resultados estatísticos não são suficientemente fortes para o afirmar. Entre eles está a presença de necrose e anisocitose. A necrose apenas foi observada em 1 caso e esse caso tratava-se de um tumor de alto grau. Nenhum dos outros estudos consultados para a elaboração deste trabalho avaliou estes parâmetros (tabela 8).

A presença de macrocitose, células multinucleadas e núcleos bizarros mostrou-se altamente significativa para a classificação destes tumores, porém a sua observação isolada não é suficiente para fazer um diagnóstico. No algoritmo de Camus pode ler-se que é necessária uma combinação de pelo menos 2 critérios para as amostras serem classificadas como sendo de alto grau (Camus et al., 2016).

No grupo dos parâmetros que se mostraram estatisticamente mais significantivos para a graduação citológica encontram-se: anisocariose, figuras de mitose, células binucleadas, cariomegália, e quantidade de granulação citoplasmática. Assim, tendo como base estes resultados estatísticos dos parâmetros individuais, procedeu-se à criação de um critério de classificação citológica: o MCC é graduado como sendo de alto grau quando estão presentes mais de 2 critérios entre os seguintes: mitoses, células binucleadas, cariomegália, anisocariose ou pouca granulação citoplasmática (Fig. 13).

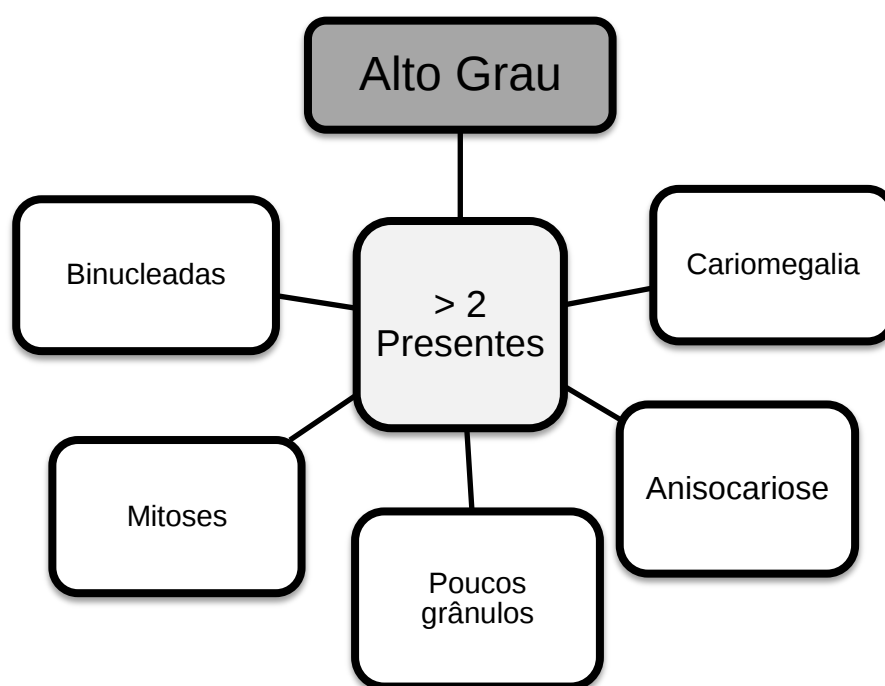


Figura 13- Método de graduação citológica de mastocitomas cutâneos caninos criado e aplicado na presente dissertação.

Um aspecto bastante relevante que foi possível observar com este trabalho foi a existência de alguns parâmetros que têm uma especificidade muito elevada para neoplasias de alto grau, apesar de não estarem presentes em todos os casos. De facto, verificou-se que a necrose, mitoses, núcleos bizarros e cariomegália só foram observados em casos de alto grau.

Com o intuito de complementar este trabalho, foi feito um seguimento de no mínimo 1 ano dos casos presentes no estudo. Assim, com o follow up dos animais foi-nos possível saber que 10 animais morreram, porém, destes 10 apenas 9 apresentavam tumores de alto grau sendo que 1 deles tinha sido diagnosticado histopatologicamente como baixo grau. Ao rever as lâminas, observou-se que nesse caso os mastócitos apresentavam poucos grânulos citoplasmáticos sem quaisquer outros sinais de atipia. Segundo Camus, o facto de

um mastocitoma ser pouco granular é suficiente para ser considerado de alto grau. Logo, seguindo o algoritmo de Camus, este caso teria sido graduado como alto grau (Camus et al., 2016). Por outro lado, se este caso tivesse sido classificado como sendo de alto iríamos ter uma incompatibilidade com a histopatologia.

Em citologia, a coloração mais recomendada para uma correta observação dos mastócitos é o May-Grünwald Giemsa (Meuten, 2002; Peleteiro et al., 2011). Porém, na altura da recolha dos casos a coloração utilizada no laboratório era o Diff-Quik. Para confirmar que este corante não influenciou a detecção dos grânulos citoplasmáticos, alguns casos foram corados duplamente com Diff-Quik e com May Grünwald Giemsa, tendo-se verificado que não existiam diferenças na coloração dos grânulos com ambos os corantes

Por vezes o estudo dos critérios nucleares e granulares é dificultado ou mesmo impossibilitado devido à quantidade de grânulos sobrepostos ao núcleo. Nestes casos, é recomendável descorar a lâmina e voltar a corá-la com azul de toluidina. Contrariamente ao que acontece com o Diff-Quik, esta coloração realça a metacromasia dos grânulos deste tipo de células. Assim, os grânulos dos mastócitos coram de vermelho púrpura, tanto mais intenso quanto mais próximos e maiores forem os grânulos, sendo diferenciar o núcleo (Ressel & Finotello, 2017).

Outro aspecto deste estudo que deve ser referido está relacionado com o método utilizado para proceder à caracterização das lâminas. Todas as amostras foram avaliadas por um único patologista especialista cego ao diagnóstico histopatológico. Desta forma foi garantida a imparcialidade durante o desenvolvimento do trabalho, contudo não foi possível avaliar a variabilidade inter-observador. Pode-se salientar também que apesar de não ter sido aplicada qualquer análise estatística nem ter sido um trabalho realizado intencionalmente, durante a observação das lâminas a variabilidade intraobservador foi avaliada. Após o estudo de todas as lâminas, foram dadas ao patologista amostras repetidas, de forma aleatória, que este as voltou a graduar sem ter conhecimento de que já o tinha feito. Desta forma, foi possível verificar a existência de consistência na caracterização das amostras.

7. Conclusão

O mastocitoma cutâneo está descrito como sendo uma das neoplasias malignas mais frequentes no cão (Bostock, 1973; Kiupel et al., 2011; Misdorp, 2004). Tendo como base os procedimentos padrão, após o diagnóstico de mastocitoma é recomendada a excisão cirúrgica da neoplasia e respectiva avaliação histopatológica para a atribuição do grau e verificação das margens de segurança, ficando a conhecer qual o prognóstico do animal (Kiupel et al., 2011; Scarpa, Sabattini, & Bettini, 2014).

O facto de ser possível determinar o grau do tumor atempadamente, através de uma simples análise citológica, pode ser uma ferramenta bastante útil e atempada para a discussão do prognóstico e possíveis tratamentos com o proprietário do animal (Hergt, von Bomhard, Kent, & Hirschberger, 2016). Apesar da amostragem deste estudo ser bastante reduzida para se poder afirmar que os mastocitomas cutâneos em cães podem ser graduados através da realização de uma citologia, a verdade é que os resultados encontrados parecem apoiar essa possibilidade.

Os resultados deste estudo revelam que a presença de mais de 2 critérios de atipia - mitoses, cariomegália, anisocariose, células binucleadas ou pouca granulação citoplasmática - é um indicador de MCC de alto grau.

Com a aplicação deste método, verificou-se a ausência de falsos negativos. Deste modo, é possível afirmar que se a citologia classifica uma amostra como sendo de baixo grau a probabilidade de ser de facto de baixo grau é muito elevada. Os erros falsos positivos são potencialmente mais histopatologia graves, pois podem levar à aplicação de uma terapia mais agressiva ou no pior dos casos, pode levar à eutanásia do animal. Por outro lado, a presença de falsos negativos pode levar a que uma neoplasia mais agressiva não seja correctamente tratada (Camus et al., 2016). Em todo o modo, seguindo-se o normal protocolo, um caso falso negativo seria posteriormente diagnosticado com o exame histopatológico.

Comparativamente à histologia uma das várias limitações na graduação citológica é o número de células avaliado, que não é equiparável ao exame histológico. Como tal, na citologia para uma melhor precisão recomenda-se que a quantidade de campos a observar sejam em maior número (Hergt et al., 2016). Para trabalhos futuros seria interessante aplicar o mesmo método de classificação com outros observadores, avaliando assim a variabilidade interobservador bem como expandir o estudo e avaliar simultaneamente outros métodos como a expressão de c-kit, pesquisa de AgNORs e avaliação de Ki67 de modo a complementar o diagnóstico dado pela citologia e histopatologia.

Referências bibliográficas

- Amy Valenciano, & Cowell, R. (2013). *Diagnostic Cytology and Hematology of the Dog and Cat* (4th ed.). Elsevier Mosby.
- Blackwood, L., Murphy, S., Buracco, P., De Vos, J. P., De Fornel-Thibaud, P., Hirschberger, J., ... Argyle, D. J. (2012). European consensus document on mast cell tumours in dogs and cats. *Veterinary and Comparative Oncology*, 10(3), 1–29. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5829.2012.00341.x>
- Bostock, D. E. (1973). The prognosis following surgical removal of mastocytomas in dogs. *The Journal of small animal practice*, 14(1), 27–41. <https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.1973.tb06891.x>
- Camus, M. S., Priest, H. L., Koehler, J. W., Driskell, E. A., Rakich, P. M., Ilha, M. R., & Krimer, P. M. (2016). Cytologic Criteria for Mast Cell Tumor Grading in Dogs With Evaluation of Clinical Outcome. *Veterinary Pathology*, 1–7. <https://doi.org/10.1177/0300985816638721>
- Cardoso, E. M. (2007). Células e Órgãos do Sistema imunológico. Em F. A. Arosa, E. M. Cardoso, & F. C. Pacheco (Eds.), *Fundamentos de Imunologia* (1ª, pp. 19–34). Lisboa: Lidel.
- Cian, F., & Freeman, K. (2007). *Veterinary Cytology - Dog, Cat, Horse and Cow*. (F. Cian & K. Freeman, Eds.). UK: Manson Publishing.
- Couto, C. G. (2006). Neoplasias selecionadas em cães e gatos. Em R. W. Nelson & C. G. Couto (Eds.), *Medicina Interna de Pequenos Animais* (3ª). Rio de Janeiro: Elsevier Mosby.
- Dean, P. W. (1988). Mast cell tumors in dogs: diagnosis, treatment, and prognosis. *Veterinary Medicine*, 83, 185–188–192.
- Dobson, J. M., & Scase, T. J. (2007). Advances in the diagnosis and management of cutaneous mast cell tumours in dogs. *Journal of Small Animal Practice*, 48(8), 424–431. <https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.2007.00366.x>
- dos Santos Costa Poggiani, S. (2012). Canine Cutaneous Mast Cell Tumor: Biologic Behavior and Its Correlation with Prognostic Indicators. *Open Journal of Veterinary Medicine*, 2(4), 255–261. <https://doi.org/10.4236/ojvm.2012.24041>
- Downing, S., Chien, M. B., Kass, P. H., Moore, P. F., & London, C. A. (2002). Prevalence and importance of internal tandem duplications in exons 11 and 12 of c-kit in mast cell tumors of dogs. *American Journal of Veterinary Research*, 63(12), 1718–1723. <https://doi.org/10.2460/ajvr.2002.63.1718>
- Duncan, J. R., & Prasse, K. W. (1979). Cytology of Canine Cutaneous Round Cell Tumors. *Veterinary Pathology*, 16(6), 673–679. <https://doi.org/10.1177/030098587901600605>
- Fulcher, R. P., Ludwig, 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 tumors in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 228(2), 210–215. <https://doi.org/10.2460/javma.228.2.210>

- Giantin, M., Granato, A., Baratto, C., Marconato, L., Vascellari, M., Morello, E. M., ... Dacasto, M. (2014). Global gene expression analysis of Canine cutaneous mast cell tumor: Could molecular profiling be useful for subtype classification and prognostication? *PLoS ONE*, 9(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095481>
- Gil da Costa, R. M. (2015). C-kit as a prognostic and therapeutic marker in canine cutaneous mast cell tumours: From laboratory to clinic. *Veterinary Journal*, 205(1), 5–10. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2015.05.002>
- Goldschmidt, M. H., & Hendrick, M. H. (2002). Tumors of the skin and soft tissues. Em D. J. Meuten (Ed.), *Tumors in Domestic Animals* (4th ed., pp. 45–118). Iowa: Iowa State Press. <https://doi.org/10.1139/W07-062>
- Grano, F. G., Silva, J. E. S., Melo, G. D., Schweigert, A., Ciarlini, P. C., & Machado, G. F. (2012). Visceral mast cell tumor and mastocytomia in a dog. *Brazilian Journal of Veterinary Pathology*, 5(3), 142–145.
- Gross, T. L., lee Gross, T., J. Ihrke, P., J. Walder, E., & K. Affolter, V. (2005). Mast cell Tumors. Em T. L. Gross, T. lee Gross, P. J. Ihrke, E. J. Walder, & V. K. Affolter (Eds.), *Skin diseases of the dog and cat* (2nd ed., pp. 853–865). Blackwell Science.
- He, X. J., Uchida, K., Tochitani, T., Uetsuka, K., Miwa, Y., & Nakayama, H. (2009). Spontaneous Cutaneous Mast Cell Tumor with Lymph Node Metastasis in a Richardson's Ground Squirrel (*Spermophilus Richardsonii*). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 21(1), 156–159. <https://doi.org/10.1177/104063870902100128>
- Hedlund, C. S. (2008). Cirurgia dos sistemas Reprodutivo e Genital. Em C. S. Hedlund, A. L. Johnson, K. S. Schulz, H. B. Seim, M. D. Willard, A. Bahr, & G. L. Carroll (Eds.), *Cirurgia de Pequenos Animais* (3.^a ed., pp. 702–774). Elsevier Mosby.
- Hergt, F., von Bomhard, W., Kent, M. S., & Hirschberger, J. (2016). Use of a 2-tier histologic grading system for canine cutaneous mast cell tumors on cytology specimens. *Veterinary Clinical Pathology*, 45(3), 477–483. <https://doi.org/10.1111/vcp.12387>
- Hottendorf, G. H., & Nielsen, S. W. (1966). *Pathologic Survey of 300 extirpated canine mastocytomas*. Connecticut.
- Junqueira, L. C., & Carneiro, J. (2013). *Histologia Básica*. (J. Carneiro & L. C. Junqueira, Eds.), *Histologia Básica* (12^a). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Kiupel, M., Webster, J. D., Bailey, K. L., Best, S., DeLay, J., Detrisac, C. J., ... Miller, R. (2011). Proposal of a 2-Tier Histologic Grading System for Canine Cutaneous Mast Cell Tumors to More Accurately Predict Biological Behavior. *Veterinary Pathology*, 48(1), 147–155. <https://doi.org/10.1177/0300985810386469>
- Kiupel, M., Webster, J. D., Kaneene, J. B., Miller, R., & Yuzbasiyan-Gurkan, V. (2004). The Use of KIT and Tryptase Expression Patterns as Prognostic Tools for Canine Cutaneous Mast Cell Tumors. *Veterinary Pathology*, 41(4), 371–377. <https://doi.org/10.1354/vp.41-4-371>
- L. Manuila, Manuila, A., Lewalle, P., & Nicoulin, M. (2000). *Dicionário Médico* (1^o). Lisboa: Climepsi Editores.
- Lin, T.-Y., & London, C. A. (2006). A functional comparison of canine and murine bone marrow derived cultured mast cells. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 114(3–4), 320–334. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2006.09.001>

- London, C. A., Kisseberth, W. C., Galli, S. J., Geissler, E. N., & Helfand, S. C. (1996). Expression of stem cell factor receptor (c-kit) by the malignant mast cells from spontaneous canine mast cell tumours. *Journal of Comparative Pathology*, 115(4), 399–414. [https://doi.org/10.1016/S0021-9975\(96\)80074-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9975(96)80074-0)
- London, C. A., & Seguin, B. (2003). Mast cell tumors in the dog. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*, 33(3), 473–489. [https://doi.org/10.1016/S0195-5616\(03\)00003-2](https://doi.org/10.1016/S0195-5616(03)00003-2)
- Macy, D. (1986). Canine and feline mast cell tumors: biologic behavior, diagnosis, and therapy. *Seminars in Veterinary Medicine and Surgery Small Animal*, (1), 72–83.
- Madewell, B. R. (2001). Cellular proliferation in tumors: a review of methods, interpretation, and clinical applications. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 15(4), 334–340. Obtido de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11467590>
- Madewell, B. R., Munn, R. J., & Phillips, L. K. (1984). Ultrastructure of canine, feline, and bovine mast cell neoplasms. *American Journal of Veterinary Research*, 45(10), 2066–2073.
- Marcos, R., & Santos, M. (2011). Técnicas e coloração de esfregaços. Em M. C. Peleteiro, R. Marcos, M. Santos, J. Correia, H. Pissarra, & T. Carvalho (Eds.), *Atlas de Citologia Veterinária* (1^a). Lisboa: Lidel.
- Marcos, R., Santos, M., Pissarra, H., & Peleteiro, M. C. (2011). Pele, seus Anexos e Tecido Subcutâneo. Em M. C. Peleteiro, R. Marcos, M. Santos, J. Correia, H. Pissarra, & T. Carvalho (Eds.), *Atlas de Citologia Veterinária* (1.^a ed., pp. 45–100). Lisboa: Lidel.
- Meyer, D. J. (2016). The Acquisition and Management of Cytology Specimens. Em Raskin, Rose E. & D. J. Meyer (Eds.), *Canine and Feline Cytology* (3.^a ed., pp. 1–15). Elsevier.
- Miller, D. M. (1995). The occurrence of mast cell tumors in young Shar-Peis. *Journal of veterinary diagnostic investigation: official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, 7(3), 360–363. <https://doi.org/10.1177/104063879500700311>
- Miller, W. H., Griffin, C. E., Campbell, K. L., & Muller, G. H. (2013). *Muller and Kirk's Small Animal Dermatology* (7nd ed.). Elsevier Mosby.
- Misdorp, W. (2004). Mast cells and canine mast cell tumours. A review. *The Veterinary quarterly*, 26(4), 156–69. <https://doi.org/10.1080/01652176.2004.9695178>
- Mullins, M. N., Dernell, W. S., Withrow, S. J., Ehrhart, E. J., Thamm, D. H., & Lana, S. E. (2006). Evaluation of prognostic factors associated with outcome in dogs with multiple cutaneous mast cell tumors treated with surgery with and without adjuvant treatment: 54 cases (1998-2004). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 228(1), 91–95. <https://doi.org/10.2460/javma.228.1.91>
- Natividade, F. S., Castro, M. B., Silva, A. S., de Oliveira, L. B., McManus, C. M., & Galera, P. D. (2014). Análise de sobrevida e fatores prognósticos de cães com mastocitoma cutâneo. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 34(9), 874–884. <https://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2>
- Northrup, N. C., Harmon, B. G., Gieger, T. L., Brown, C. A., Carmichael, K. P., Garcia, A., ... Howerth, E. W. (2005). Variation among pathologists in histologic grading of canine cutaneous mast cell tumors. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 17, 245–248. <https://doi.org/10.1177/104063870501700305>

- O'Keefe, D. (1990). Canine mast cell tumors. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*, 20, 1105–1115.
- Ozaki, K., Yamagami, T., Nomura, K., & Narama, I. (2002). Mast Cell Tumors of the Gastrointestinal Tract in 39 Dogs. *Veterinary Pathology*, 39(5), 557–564. <https://doi.org/10.1354/vp.39-5-557>
- Patnaik, A. K., Ehler, W. J., & MacEwen, E. G. (1984). Canine cutaneous mast cell tumor: morphologic grading and survival time in 83 dogs. *Veterinary pathology*, 21(5), 469–474. <https://doi.org/10.1177/030098588402100503>
- Patnaik, A. K., Twedt, D. ., & Marretta, S. M. (1980). Intestinal mast cell tumour in a dog. *Veterinary Record*, 207–212. <https://doi.org/10.1136/vr.e5024>
- Pedraza, F., Grandi, F., & Rocha, N. S. (2011). The need for cytologic/histologic correlation studies to establish a cytologic grading system for canine mast cell tumors in veterinary medicine. *Veterinary Clinical Pathology*, 40(3), 280–281. <https://doi.org/10.1111/j.1939-165X.2011.00352.x>
- Peleteiro, M. C. (2011). Princípios Gerais de Interpretação em Diagnóstico Citológico. Em M. C. Peleteiro, R. Marcos, M. Santos, J. Correia, H. Pissarra, & T. Carvalho (Eds.), *Atlas de Citologia Veterinária* (1.^a ed., pp. 29–43). Lisboa: Lidel.
- Raskin, R. E. (2016). Skin and Subcutaneous Tissues. Em R. E. Raskin & D. J. Meyer (Eds.), *Canine and Feline Cytology* (3rd ed., pp. 34–90). Elsevier.
- Ressel, L., & Finotello, R. (2017). Cytological grading of canine cutaneous mast cell tumours: is haematoxylin and eosin staining better than May-Grünwald–Giemsa? *Veterinary and Comparative Oncology*, 15(3), 667–668. <https://doi.org/10.1111/vco.12234>
- Rogers, K. S. (1996). Mast Cell Tumors. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 26(1), 87–102. [https://doi.org/10.1016/S0195-5616\(96\)50008-2](https://doi.org/10.1016/S0195-5616(96)50008-2)
- Sabattini, S., Scarpa, F., Berlato, D., & Bettini, G. (2014). Histologic Grading of Canine Mast Cell Tumor: Is 2 Better Than 3? *Veterinary Pathology*, 52(1), 70–73. <https://doi.org/10.1177/0300985814521638>
- Scarpa, F., Sabattini, S., & Bettini, G. (2014). Cytological grading of canine cutaneous mast cell tumours. *Veterinary and Comparative Oncology*, 14(3), 245–251. <https://doi.org/10.1111/vco.12090>
- Schultheiss, P. C., Gardiner, D. W., Rao, S., Olea-Popelka, F., & Tuohy, J. L. (2011). Association of histologic tumor characteristics & size of surgical margins w/ clinical outcome after surgical removal of cutaneous MCTs in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 238(11), 1464–1469. <https://doi.org/10.2460/javma.238.11.1464>
- Sharkey, L. C., Dial, S. M., & Matz, M. E. (2007). Maximizing the Diagnostic Value of Cytology in Small Animal Practice. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*, 37(2), 351–372. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2006.11.004>
- Simoës, J. P. C., Schoning, P., & Butine, M. (1994). Prognosis of Canine Mast Cell Tumors: A Comparison of Three Methods. *Veterinary Pathology*, 31(6), 637–647. <https://doi.org/10.1177/030098589403100602>

- Sledge, D. G., Webster, J., & Kiupel, M. (2016). Canine cutaneous mast cell tumors: A combined clinical and pathologic approach to diagnosis, prognosis, and treatment selection. *The Veterinary Journal*, 215, 43–54. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2016.06.003>
- Stefanello, D., Valenti, P., Faverzani, S., Bronzo, V., Fiorbianco, V., Pinto da cunha, N., ... Caniatti, M. (2009). Ultrasound-guided cytology of spleen and liver: A prognostic tool in canine cutaneous mast cell tumor. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 23(5), 1051–1057. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2009.0354.x>
- Strefezzi, R. D. F., Kleeb, S. R., Xavier, J. G., & Dias, J. L. C. (2010). Avaliação da proliferação celular como indicador prognóstico para mastocitomas cutâneos caninos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 30(7), 559–565. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2010000700009>
- Takahashi, T., Kadosawa, T., Nagase, M., Matsunaga, S., Mochizuki, M., Nishimura, R., & Sasaki, N. (2000). Visceral mast cell tumors in dogs: 10 cases (1982–1997). *JAVMA*, 216(2), 222–226.
- Thamm, D. H., Turek, M. M., & Vail, D. M. (2006). Outcome and prognostic factors following adjuvant prednisone/vinblastine chemotherapy for high-risk canine mast cell tumour: 61 cases. *The Journal of veterinary medical science*, 68, 581–587. <https://doi.org/10.1292/jvms.68.581>
- Theoharides, T. C., & Cochrane, D. E. (2004). Critical role of mast cells in inflammatory diseases and the effect of acute stress. *Journal of Neuroimmunology*, 146(1–2), 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2003.10.041>
- Thompson, J. J., Yager, J. A., Best, S. J., Pearl, D. L., Coomber, B. L., Torres, R. N., ... Foster, R. A. (2011). Canine Subcutaneous Mast Cell Tumors. *Veterinary Pathology*, 48(1), 169–181. <https://doi.org/10.1177/0300985810390716>
- Webster, J. D., Yuzbasiyan-Gurkan, V., Kaneene, J. B., Miller, R., Resau, J. H., & Kiupel, M. (2006). The Role of c-KIT in Tumorigenesis: Evaluation in Canine Cutaneous Mast Cell Tumors. *Neoplasia*, 8(2), 104–111. <https://doi.org/10.1593/neo.05622>
- Webster, J. D., Yuzbasiyan-Gurkan, V., Miller, R. A., Kaneene, J. B., & Kiupel, M. (2007). Cellular Proliferation in Canine Cutaneous Mast Cell Tumors: Associations with c-KIT and Its Role in Prognostication. *Veterinary Pathology*, 44(3), 298–308. <https://doi.org/10.1354/vp.44-3-298>
- Withrow, S. J., Vail, D. M., & Page, R. L. (2013). *Small Animal Clinical Oncology* (5th ed.). Elsevier.
- Zemke, D., Yamini, B., & Yuzbasiyan-Gurkan, V. (2002). Mutations in the juxtamembrane domain of c-KIT are associated with higher grade mast cell tumors in dogs. *Veterinary Pathology Online*, 39(5), 529–535. <https://doi.org/10.1354/vp.39-5-529>

Apêndices

Tabela 1- Classificação aplicada na avaliação dos parâmetros avaliados para a graduação citológica de MCC nesta dissertação.

Parâmetro	Classificação
Colagenólise	Ausente / Presente
Eosinófilos	Poucos / Muitos
Células fusiformes	Poucas / Muitas
Necrose	Ausente / Presente
Macrocitose	Ausente / Presente
Anisocariose	Ligeira / Moderada
Anisocitose	Ligeira / Moderada
Mitoses	Ausentes / Presentes
Células multinucleadas	Ausentes / Presentes
Células binucleadas	Ausentes / Presentes
Núcleos bizarros	Ausentes / Presentes
Cariomegália	Ausente / Presente
Quantidade de grânulos	Poucos / Muitos
Tamanho dos grânulos	Variável / Não variável
Posição dos grânulos	Dispersos/ Periféricos/ Mistos
Grânulos polarizados	Ausentes / Presentes

