

JOAQUIM PEDRO MARQUES FERNANDES DOS SANTOS

**MASTOCITOMA CUTÂNEO CANINO:
INFLAMAÇÃO CUTÂNEA CRÓNICA VS
DESENVOLVIMENTO DE MASTOCITOMAS**

Orientador: Professora Doutora Joana Tavares de Oliveira

Coorientador: Doutor Luís C. Chambel

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Faculdade de Medicina Veterinária

Lisboa

2017

JOAQUIM PEDRO MARQUES FERNANDES DOS SANTOS

**MASTOCITOMA CUTÂNEO CANINO:
INFLAMAÇÃO CUTÂNEA CRÓNICA VS
DESENVOLVIMENTO DE MASTOCITOMAS**

Dissertação apresentada para a obtenção do Grau de Mestre em Medicina Veterinária no Curso de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária conferido pela Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias.

Membros do Júri:

Presidente: Professora Doutora Laurentina Pedroso

Arguente: Professora Doutora Felisbina Queiroga

Orientadora: Professora Doutora Joana T. de Oliveira

Coorientador: Doutor Luís C. Chambel

Vogal: Professora Doutora Margarida Alves

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Faculdade de Medicina Veterinária

Lisboa

2017

Agradecimentos

Em primeiro lugar gostaria de agradecer à minha orientadora, Prof. Doutora Joana Tavares de Oliveira, pela incansável ajuda na elaboração desta tese. Desde a escolha do tema ao acompanhamento durante toda a escrita, recolha de dados e desenvolvimento da parte estatística da tese. Vai sem dúvida ser uma grande fonte de inspiração para a minha vida profissional por tudo o que ensinou durante as aulas e toda a metodologia e *modus operandi* que me transmitiu durante estes anos em que tive o prazer de a acompanhar.

Gostaria de agradecer ao meu co-orientador, Dr. Luís Chambel, por todo o apoio e amizade que me proporcionou durante o estágio curricular e não só. Sem duvida que, como meu tutor de estágio, marcou-me muito significativamente e vai me ajudar a ser um melhor profissional por ter sempre em mente o seu excelente profissionalismo, simpatia e dedicação à medicina veterinária.

Ao Dr. Joaquim Henriques pela simpatia e hospitalidade em me receber no seu hospital veterinário, sem o qual não teria uma grande parte dos casos presentes nesta tese.

Ao Dr. Mauro Bragança pela ajuda na elaboração da análise estatística desta tese.

Um grande obrigado a todos os médicos veterinários, enfermeiros, auxiliares e colegas de estágio da VetOeiras. Todos me marcaram muito positivamente e sem dúvida que me ajudaram a crescer como pessoa e profissional.

A todos os meus colegas e amigos de faculdade. Sem eles estes anos de curso tinham sido muito difíceis de ultrapassar. Com toda a camaradagem que tínhamos e temos todos os obstáculos que nos foram impostos durante o curso quase que se tornaram fáceis e sem dúvida muito menos penosos de ultrapassar.

Aos meus amigos da secundária de Miraflores que sempre tiveram presentes nos momentos melhores e piores. São quase 10 anos de uma amizade exemplar, cheia de bons momentos e grande companheirismo.

Gostaria fazer um especial agradecimento a uma das pessoas que mais me marcou durante a minha vida de estudante, a minha professora de Biologia, Graça Silva. Sempre me orientou no caminho certo e ajudou-me a perseguir o sonho de me tornar um veterinário.

Como não podia deixar de ser o maior agradecimento vai para a minha família. Um grande obrigado à minha mãe que me proporcionou todo o meu percurso académico e que sempre me apoiou em todas as minhas escolhas e decisões. Um grande obrigado à minha irmã por todo o apoio e ajuda ao longo destes anos. Um grande obrigado a minha querida avó, estejas onde estiveres sei que vais estar sempre a olhar por mim em todos os momentos.

Continuando a falar em “família” um grande obrigado aos meus “irmãos” Gonçalo Correia Pinto e João Pedro Palma. Estiveram sempre presentes em todos, mesmo todos, os momentos mais marcantes do todo o meu percurso universitário. São 7 anos de irmandade que mais parecem 70. Pode ser consigamos atingir os 70 anos de amizade e possamos lembrar tudo o que passamos nestes áureos anos de faculdade.

RESUMO

Os mastocitomas são umas das neoplasias cutâneas mais comuns nos cães, representando entre 16 e 21% dos tumores cutâneos caninos. Neste estudo foram avaliados 40 casos de cães diagnosticados com mastocitoma cutâneo, por histopatologia pós excisão cirúrgica.

Os objetivos específicos deste estudo foram a descrição estatística de variáveis epidemiológicas, clínicas e histopatológicas, estudar a possível associação entre inflamação cutânea crónica com características intrínsecas ao cão e à doença e finalmente a avaliação da relação entre o grau histológico do mastocitoma e a sobrevivência. Os casos foram recolhidos do Hospital Veterinário Central da Linha de Cascais (VetOeiras) e do Centro Veterinário Berna e datam de um período entre Março de 2011 e Maio de 2015. Foram incluídos 40 relatórios histopatológicos e as respetivas fichas clínicas dos cães diagnosticados com mastocitoma cutâneo e foram analisados estatisticamente as variáveis, estando os resultados apresentados com base no nível de significância de 5%.

Quanto à localização esta ocorreu sobretudo nas extremidades e na região torácica. O grau histológico mais predominante foi o grau II (52,7%), seguido do grau III (25%) e por fim o grau I (17,5%). De destacar também foram as taxas de metastização ganglionar que se ficou pelos 16,7%, justificado em parte também por uma taxa relativamente elevada de casos onde esta não foi estudada (25%). Relativamente a avaliar a possível relação entre a inflamação cutânea crónica e o desenvolvimento dos mastocitomas e a avaliação da relação entre o grau histológico do tumor e a sobrevivência devido ao baixo número de casos e reduzida descrição da sintomatologia cutânea nas fichas clínicas poucos resultados com relevância estatística foram alcançados. No entanto verificou-se que: 1) Mais de metade dos cães com mastocitoma tinham história clínica inflamação cutânea; 2) Pacientes com história prévia e inflamação cutânea crónica pareciam estar associados ao desenvolvimento de mastocitomas de grau histológico mais baixo; e 3) Animais com mastocitoma cutâneo e que tinham história prévia de inflamação cutânea crónica pareciam conseguir atingir uma sobrevivência mais longa.

Concluindo, serão necessários estudos adicionais dado que a presente série retrospectiva era pequena. As tendências observadas poderão ser ainda valorizadas como um estudo piloto com resultados preliminares que nos indicam que os mastocitomas possam estar associados em muitos casos a história de distúrbios dermatológicos crónicos e que aqueles que surgem nesta conjuntura parecem ser melhor diferenciados (menor grau histológico), consequentemente com melhor prognóstico que aqueles que surgem num contexto não relacionado.

Palavras chave: Cão, mastocitoma cutâneo, tumores cutâneos, estudo retrospectivo, inflamação cutânea crónica, oncologia

ABSTRACT

Mast cell tumours are one of the most common type of skin tumours in dogs, representing 16 to 21% of all skin tumours. In this study forty cases of dogs diagnosed with cutaneous mast cell tumour were selected, after surgical extirpation and following histopathological analysis. All the 40 cases were collected in Hospital Veterinário Central da Linha de Cascais (VetOeiras) and Centro Veterinário Berna between March 2011 and May 2015. The objectives of this study were the descriptive analysis of epidemiologic, clinical and histological variables, try to study the possible relation between chronic skin inflammation and intrinsic variables of the dog and the disease, and finally the evaluation between the histological grade and the surviving.

After the examination of the forty histopathological report and respective clinical records of the dogs diagnosed with cutaneous mast cell tumour, all the data was sent to statistic analysis, with all the results displayed with 5% confidence level.

The tumours were located mostly in the limbs and in the thorax region. The predominant histological grade was grade II (52,7%), followed by grade III (25%) and last grade I (17,5%). The most atypical found was the lymph node metastasis with only 5 confirmed cases (16,7%), justified by the high percentage of non studied cases (25%).

In the other two objectives of this study (relation between chronic skin inflammation and intrinsic variables of the dog and the disease, and the evaluation between the histological grade and the surviving). Due to the low number of cases and the lack of details on the clinical records (especially in terms of cutaneous affections) it was impossible to take conclusions with statistic relevance.

However there were some interesting findings: 1) More than half of the dogs with mast cell cutaneous tumour had an history of chronic skin inflammation; 2) Dogs with history of chronic skin inflammation may be associated with lower histological grade mast cell tumours; 3) Animals with cutaneous mast cell tumour and who had a history of chronic skin inflammation seem to be able to achieve a longer survival.

In conclusion, further studies will be needed given that this retrospective series was too small. The observed trends may be seen as a pilot study with the preliminary results indicating that mast cell tumours might associated, in many cases, with history of chronic skin disorders and those that arise in this fortuity appear to have a lower histological grade, consequently with a better prognosis than those that arise in an unrelated context.

Keywords: Dog, cutaneous mast cell tumour, skin tumours, retrospective study, chronic cutaneous inflammation, oncology

ACRÓNIMOS E ABREVIATURAS

ADN – Ácido desoxirribonucleico

AgNOR - *Argyrophilic Nucleolar Organizer Region*

ATP - Adenosine triphosphate

CD34 - *Cluster of differentiation 34*

cm - Centímetro

COX-2 - *Cyclooxygenase-2*

ECF-A - *Eosinophil chemotactic factor of anaphylaxis*

FcεRI - *High-affinity IgE receptor*

FcγRI - *High-affinity IgG receptor*

GM-CSF - *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*

GR - *Glucocorticoid receptor*

I.C. - Intervalo de confiança

IgE - *Immunoglobulin E*

IL - *Interleukin*

IM - Índice mitótico

kg - Quilograma

LPS - *Lipopolysaccharides*

LT-B4 - *Leukotriene B4*

LT-C4 - *Leukotriene C4*

mg - Miligrama

NGF - *Nerve growth factor*

OMS – Organização Mundial de Saúde

PAF - *Platelet-activating factor*

PAAF - Punção aspirativa por agulha fina

PAMP - *Pathogen-associated molecular patterns*

PCNA - *Proliferating cell nuclear antigen*

PCSDD - Patologias cutâneas sem diagnóstico definitivo

PDGFR - *Platelet-derived growth factor receptors*

PGD2 - *Prostaglandin D2*

SCF - *Stem Cell Factor*

SRS-A - *Slow reacting substance of anaphylaxis*

TKR - *Tyrosine kinase receptor*

TMS - *Tempo médio de sobrevivência*

TNF - *Tumour necrosis factor*

x - vezes

% - *Porcentagem*

ÍNDICE

1. Descrição do estágio curricular	12
2. Introdução	14
2.1 Mastócitos	14
2.1.1 Origem dos mastócitos	15
2.1.2 Recetores de superfície.....	16
2.1.3 Mediadores de inflamação	17
2.1.4 Funções biológicas.....	18
2.2 Mastocitoma.....	20
2.2.1 Etiologia	20
2.2.2 Fisiopatologia e sinais paraneoplásicos	20
2.2.3 Epidemiologia: incidências e fatores de risco	22
2.2.4 Apresentação clínica	24
2.2.5 Diagnóstico	25
2.2.6 Tratamento.....	33
2.2.7 Factores de prognóstico	45
2.2.8 Relação entre a inflamação cutânea crónica e o desenvolvimento de mastocitomas.....	56
2.2.8 Acompanhamento	57
3. Estudo Retrospectivo	58
3.1 Objectivos	58
3.2 Material e métodos	58
3.3 Análise estatística.....	60
3.4. Resultados	61
3.4.1. Caracterização dos pacientes	61
3.4.2. Caracterização clínica dos tumores.....	64
3.4.3. Caracterização histológica dos tumores	65
3.4.4. Acompanhamento pós cirúrgico e sobrevida.....	67
4. Associações entre a inflamação cutânea crónica, determinantes intrínsecos e história progressa em pacientes com mastocitoma	67
4.1. Avaliação da relação entre a história de inflamação cutânea crónica e a sobrevida em pacientes com mastocitomas	69
4.2 Avaliação da relação entre a história de inflamação cutânea crónica e o grau histológico dos mastocitomas.....	70
5. Avaliação do grau histológico	71

5.1 Avaliação entre o grau histológico e a sobrevida.....	72
5. Modelo de sobrevida.....	73
7. Discussão.....	73
8. Conclusão.....	80
9. Limitações do estudo e perspectivas futuras.....	81
Bibliografia.....	82

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela I - Estadiamento de mastocitomas segundo a OMS, adaptado de O'Keefe, 1990	29
Tabela II - Sistema de classificação tumoral proposto por London, 2010, adaptado de London,2010	29
Tabela III - Variáveis e respectivas categorias	60
Tabela IV - Distribuição das raças no grupo de estudo	62
Tabela V - História clínica dermatológica progressiva dos pacientes com mastocitoma	63
Tabela VI - Caracterização da distribuição.....	64
Tabela VII - Caracterização histopatológica dos tumores	66
Tabela VIII - Terapia adjuvante.....	67
Tabela IX - Associação entre inflamação cutânea crônica e variáveis categóricas	69
Tabela X - Associação entre a história clínica de inflamação cutânea crônica e a sobrevida .	70
Tabela XI - Relação entre o grau histológico e a história clínica de inflamação cutânea crônica	70
Tabela XII - Avaliação do grau histológico.....	71
Tabela XIII - Avaliação entre o grau histológico e a sobrevida	72
Tabela XIV - Modelo de sobrevida comparando o grau histológico e a história clinica de inflamação cutânea crônica.....	73

ÍNDICE DE IMAGENS

Figura 1 – Distribuição de idades dos pacientes.....	59
Figura 2 – Tamanho dos tumores. A) Distribuição do diâmetro maior das massas. B) Distribuição do diâmetro menor das massas	63
Figura 3 – Associação entre a história clínica de inflamação cutânea crónica e a idade	65

1. Descrição do estágio curricular

O estágio curricular foi realizado na área da medicina interna e cirurgia de animais de companhia. As atividades decorreram no Hospital Veterinário VetOeiras- Hospital Central da Linha de Cascais (HVCLC), sob a orientação do Doutor Luís Chambel.

A duração do estágio foi de seis meses, correspondendo a um total de cerca de 1200 horas. O estágio teve início no dia 15 de Setembro de 2014 e prolongou-se até ao dia 15 de Março de 2015.

Durante o período de estágio foi possível seguir todos os tipos de casos clínicos, desde consultas de rotina e acompanhamento, cirurgias eletivas e de urgência, emergências, consultas de especialidade, entre outros.

Durante o período de estágio o aluno teve a oportunidade de acompanhar os casos clínicos e desta forma adquirir mais conhecimentos práticos e teóricos e por em prática as faculdades adquiridas durante todo o curso, quer a nível teórico como prático.

As áreas acompanhadas durante este estágio foram as seguintes: oftalmologia, ortopedia, oncologia, dermatologia, cardiologia, imagiologia, comportamento, medicina interna, cirurgia, dentisteria, reprodução, internamento, medicina preventiva, medicina felina, medicina de animais exóticos, anestesiologia e fisioterapia.

Na área da cirurgia, foram despendidas cerca de 350 horas do período de estágio. Em cirurgia as tarefas executadas pelo estagiário consistiram na preparação prévia das cirurgias em termos de conhecimentos teóricos, na realização de uma avaliação pré cirúrgica do animal de modo a garantir a sua aptidão para o ato cirúrgico (execução de exame físico geral e um painel de análises pré cirúrgicas), seguido dos procedimentos de preparação do animal para a cirurgia (tricotomia, lavagem e desinfeção das áreas a serem intervencionadas). As cirurgias mais acompanhadas foram nas áreas de ortopedia e cirurgia de tecidos moles. Algumas das cirurgias observadas foram: cirurgias eletivas do trato reprodutivo (ovariohisterectomias e orquiectomias) e destarizações, cirurgias ortopédicas como resolução de fraturas e luxações, ressecção da cabeça do fémur, osteotomia tripla da anca, artroscopias, resolução de rotura do ligamento cruzado, cirurgias de tecidos moles como excisão de nódulos, mastectomias, esplenectomias, piloropexia, gastrotomia e enterotomia para remoção de corpo estranho.

No internamento, onde foram despendidas cerca de 350 horas, foi possível realizar o acompanhamento e discussão da progressão dos casos clínicos, bem como monitorizar os animais no período pós-cirúrgico. Foram também realizados procedimentos como a colocação de cateteres, algáliação, recolha de sangue para análises, realização de exames de diagnóstico como hemogramas, análises bioquímicas, cálculo de doses de fármacos e administração de fármacos por várias vias de administração.

Os vários casos clínicos de animais internados eram objeto de discussão numa ronda com a presença dos médicos, estagiários e enfermeiros. Diariamente eram realizados pelo menos três exames físicos aos animais internados nos quais se monitorizavam os seguintes aspetos: estado de alerta do animal, temperatura corporal, pressões arteriais, níveis de hidratação, frequência cardíaca e respiratória, tempo de repleção capilar, capacidade de ingestão alimentar e de água do animal, entre outros exames caso fosse necessário.

Na área de imagiologia foram realizados exames radiográficos e foi possível assistir a exames ecográficos e endoscópicos. Foi possível adquirir muitos conhecimentos na área de diagnóstico e prognóstico de doenças com base em dados imagiológicos. Nesta área foram executadas tarefas como a contenção dos animais e posicionamento correto dos mesmos para estes procedimentos, quando necessário eram realizadas sedações e com a respetiva monitorização, realizando-se posteriormente uma avaliação fisiológica e patológica do exame. Esta área dispôs de aproximadamente 100 horas.

A área da medicina interna consistiu em assistir a consultas prestando auxílio na contenção dos animais, recolha da história clínica, realização de exames físicos, recolha de sangue para análises, realização de exames complementares, discussão dos casos assistidos após a consulta e administração de medicações, sendo que nesta área foram despendidas cerca 400 horas.

2. Introdução

2.1 Mastócitos

O mastócito foi descrito pela primeira vez em 1877 por Paul Ehrlich durante a sua tese de mestrado. Sendo a primeira pessoa a descrever o mastócito, chamou-lhe de “Mastzellen”, e propôs a sua contribuição na nutrição dos tecidos devido à observação dos diversos grânulos citoplasmáticos (“*mastzellen*” do alemão “*mast*” e “*zellen*”, respetivamente alimento e célula) (Beaven, 2009). Apenas em 1905 é que os mastócitos foram descritos em cães por Bashford *et al.*. Por sua vez o conceito de mastocitoma apareceu apenas em 1952 por Bloom (Strefezzi *et al.*, 2009).

O mastócito maduro é uma célula globulosa, grande e com citoplasma repleto de grânulos que coram intensamente com azul de Toluidina. O núcleo é pequeno, esférico e central e de difícil observação por estar frequentemente coberto pelos grânulos citoplasmáticos (Junqueira & Carneiro, 2008).

Ao nível da derme, os mastócitos, são a terceira célula mais comum podendo ser encontrados ao redor das vénulas pós capilares. As suas concentrações são variáveis mas o aceite é entre 0 e 60 por campo de grande ampliação, variando muito conforme a zona do corpo de onde é proveniente a pele (Souza *et al.*, 2009).

Em 1953 Riley e West demonstraram que os mastócitos caninos tinham a maior concentração de histamina descrita até então, comparando mastócitos de varias espécies. Demonstraram também que os mastócitos estavam intimamente ligados a reações alérgicas e à presença de histamina e heparina nos tecidos (Riley & West, 1953), colaboram também nas reações imunes, têm um papel fundamental na inflamação e no combate a parasitoses (Junqueira & Carneiro, 2008).

Devido à alta concentração de radicais ácidos nos glicosaminoglicanos (heparina), os grânulos são metacromáticos (capacidade de algumas moléculas de alterar a cor de alguns corantes básicos). Outro constituinte dos grânulos é a histamina, que promove um aumento da permeabilidade vascular, protéases neutras e o fator quimiotático dos eosinófilos na anafilaxia, mais conhecido pela sigla ECF-A (*eosinophil chemotactic factor of anaphylaxis*). Nos grânulos existem também alguns leucotrienos (C4, D4, E4) ou SRS-A (*slow reacting substance of anaphylaxis*). As moléculas produzidas pelos mastócitos atuam localmente com

uma ação do tipo parácrina. Estas moléculas podem ter efeitos sistémicos acabando por ter uma função endócrina (Junqueira & Carneiro, 2008; Theoharides & Conti, 2004).

2.1.1 Origem dos mastócitos

Os mastócitos originam-se a partir de células precursoras hematopoéticas situadas na medula óssea, mais especificamente de células estaminais CD34+. Os mastócitos imaturos circulam no sangue, extravasam a parede de vénulas e capilares e penetram nos tecidos, onde vão proliferar e diferenciar-se até finalmente expressarem o recetor FcεRI, que vai permitir a ligação com a imunoglobulina E, e, por conseguinte, a sua função efectora. Este processo é mediado pelo complexo SCF (*Stem Cell Factor*), interleucinas (IL)-3, IL-4, IL-5 IL-9, fator de crescimento nervoso (NGF) e possivelmente outros fatores (Brown *et al.*, 2008; Kitamura *et al.*, 1993).

O sinal mais importante de diferenciação e de viabilidade dos mastócitos é a interação entre o recetor membranar c-kit e o seu ligando SCF (Huang *et al.*, 1990), um fator de crescimento expresso pelas células endoteliais e fibroblastos. O SCF para além de contribuir para a diferenciação e maturação dos mastócitos também ajuda na sobrevivência e proliferação dos mesmos (Irani *et al.*, 1992; Nilsson *et al.*, 1994; Yee, 1994).

Como já referido, nos mastócitos o recetor para o complexo SCF é o c-kit, este é expresso desde de que a célula é uma célula estaminal hematopoética e é mantido durante o seu desenvolvimento e diferenciação, ao contrário do que acontece durante a diferenciação de outras células derivadas da medula óssea (vai diminuindo a sua expressão durante a diferenciação) (Beaven, 2009).

Os mastócitos têm a capacidade de se diferenciar consoante o local para onde migraram atingindo uma diversidade fenotípica apelidada de heterogeneidade dos mastócitos. Em ratos conseguimos diferenciar dois tipos principais de mastócitos, os do tecido conjuntivo que podem ser encontrados na submucosa intestinal, peritoneu, olho e pele e os mastócitos das mucosas que se encontram no epitélio dos pulmões e trato gastrointestinal (Beaven, 2009; Kalesnikoff & Galli, 2008).

2.1.2 Recetores de superfície

Os mastócitos estão sujeitos a múltiplas funções biológicas e de elevada relevância. Estes dispõem de recetores de superfície tanto estimuladores como inibidores, o que lhes permite responder uma grande variedade de estímulos (Tizard, 2009).

Os recetores de estimulação mais importantes nos mastócitos incluem o recetor de afinidade da IgE (FcεRI), recetores de SCF (c-kit), recetores de IgG (FcγRI ou CD64 e FcγRIII ou CD16), recetores *toll-like* (TLR) (1,2,3,4,6,7 e 9), recetores para neuropéptidos, opióides e proteínas do complemento. Consoante a estimulação dos seus TLR são libertados diferentes mediadores. Assim sendo peptidoglicanos bacterianos estimulam os TLR2 e provocam a libertação de histamina, enquanto que os LPS que estimulam os TLR4 não o fazem. Deste modo os mastócitos podem diferenciar os diferentes agentes patogénicos e gerar combinações altamente específicas de citocinas, quimiocinas e outros mediadores de inflamação dependendo do estímulo recebido (Tizard, 2009).

O c-kit, ou CD117, é o produto proteico do proto-oncogene c-kit (Yarden *et al.*, 1987). É uma proteína transmembranar constituída por um domínio extracelular contendo 5 pontes semelhantes a imunoglobulinas (às quais se liga o SCF), um domínio transmembranar com função fixadora do c-kit à membrana celular, um domínio justamembranar negativo regulador e um domínio citoplasmático cinase, com regiões que permitem a ligação de ATP e fosfotransferases (Huizinga *et al.*, 1995; Lennartsson *et al.*, 2005; Pardanani, Akin & Valent, 2006; Roskoski, 2005; Webster, Kiupel & Yuzbasiyan-Gurkan, 2006).

A função do c-kit é ligação ao *Stem Cell Factor* também conhecido por factor de crescimento dos mastócitos ou por *Steel Factor* (Kitayama *et al.*, 1995; Williams *et al.*, 1990). O SCF é uma citocina e pode ser produzida como duas isoformas distintas (Longley *et al.*, 1997).

No cão o c-kit é expresso, para além dos mastócitos, pelas células de Purkinje do cerebelo (marcação citoplasmática paranuclear), nas células intersticiais de Cajal do tubo digestivo (marcação citoplasmática), nas células endometriais uterinas e nas células epiteliais luminiais da glândula mamária (Morini *et al.*, 2004).

Os mastócitos possuem recetores de alta afinidade para IgE (FcεRI) e recetores IgE de baixa afinidade (FcεRII), estando este último presente também nos eosinófilos, monócitos,

linfócitos e plaquetas. O FcεRI é composto por uma cadeia α , a qual se liga a IgE, uma cadeia β e duas γ . A sinalização intracelular dá-se após a ligação dos antígenos à IgE que por sua vez se vão ligar à cadeia α do FcεRI. Após a ativação dos recetores FcεRI ocorre libertação de mediadores pré-formados altamente específicos e síntese de citocinas e quimiocinas (Galli, Tsai & Wershil, 1993).

Os mastócitos expressam também recetores para catecolaminas que regulam a sua atividade. Estes recetores dividem-se em adrenoreceptores α e β com efeitos opostos. Moléculas como a norepinefrina e a fenilefrina estimulam os recetores α e moléculas como o propanolol bloqueiam os recetores β induzindo deste modo a desgranulação dos mastócitos. Por outro lado o isoproterenol, epinefrina ou salbutamol inibem a desgranulação dos mastócitos e por isso são muito utilizadas no tratamento de reações alérgicas (Tizard, 2009).

2.1.3 Mediadores de inflamação

Os mediadores inflamatórios dos mastócitos estão normalmente confinados aos grânulos e são libertadas quando ocorre desgranulação celular. Vários mecanismos estimulam a desgranulação dos mastócitos. De longe o mecanismo mais conhecido implica a presença de uma IgE. A IgE e o antígeno unidos podem estimular a desgranulação dos mastócitos e assim causar inflamação. Outros mecanismos de ativação mastocitária são exercidos através de citocinas, quimiocinas, agentes químicos, estímulos físicos, vários péptidos, incluindo neuropéptidos, toxinas de insetos ou animais, bactérias ou produtos bacterianos e vírus (Tizard, 2009).

Num processo inflamatório normal os mastócitos libertam mediadores inflamatórios de uma forma lenta, num processo chamado de desgranulação por etapas. Também podem segregar alguns fatores vasoativos sem que ocorra desgranulação. Por exemplo, as bactérias e os produtos bacterianos podem estimular os mastócitos à produção de TNF-alfa, IL-1beta e IL-6 sem desgranulação. Algumas moléculas podem funcionar como alarminas, como por exemplo as defensas, neuropéptidos, adenosina e endotelinas (pequenos péptidos das células endoteliais), também estimulam a desgranulação dos mastócitos (Tizard, 2009).

Em contraste, os mastócitos, também segregam mediadores lipídicos neoformados, que são produtos metabólicos do ácido araquidónico endógeno, como as prostaglandinas de

série D2 (PGD2), leucotrienos B4 (LT-B4), fator de ativação plaquetário (PAF), LT-C4 (Lewis *et al.*, 1982; Roberts *et al.*, 1979) entre outras citocinas e quimiocinas (Bissonnette, Enciso & Befus, 1997; Okayama *et al.*, 2003).

Foi também comprovado que os mastócitos sintetizavam e libertavam IL-1, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-15, IL-16, IL-18, IL-19, IL-25, fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos (GM-CSF), fator de necrose tumoral (TNF) pré-formado e induzível por antigénios, proteína quimiotática dos monócitos 1, proteína inflamatória dos macrófagos 1 alfa e 1 beta (Beaven, 2009; Gordon & Galli, 1990; Plaut *et al.*, 1989; Wodnar-Filipowicz, Heusser & Moroni, 1989).

2.1.4 Funções biológicas

A diversidade de mediadores biologicamente ativos faz com que os mastócitos consigam participar numa elevada variedade de funções biológicas, e desse modo mediar efeitos pro-inflamatórios, anti-inflamatórios e imunoregulatórios. As citocinas e quimiocinas neo-sintetizadas induzem a proliferação de mastócitos, recrutamento de outras células da linha imune e deste modo promovem a inflamação (Dawson, 2012).

Os mastócitos desempenham também funções na fisiologia e homeostasia corporal. Em órgão sujeitos a uma remodelação e crescimento contínuo, os mastócitos, desempenham um importante papel homeostático. Por exemplo o TNF- α derivado de mastócitos está implicado na deterioração de folículos pilosos e na regulação do crescimento dos mesmos (Maurer & Theoharides, 2003).

Os mastócitos participam em mecanismos de defesa do organismo, particularmente na reação inflamatória, estando presentes num conjunto de mecanismos imunológicos, humorais e celulares (Bensignor *et al.*, 1996). Têm um papel ativo num amplo espectro de respostas imunológicas inatas e adquiridas, incluindo reações de hipersensibilidade retardada (Askenase, 1980; Dvorak, Mihm & Dvorak, 1976; Takizawa *et al.*, 1989), fibrose (Claman, 1993), doenças autoimunes (Dietsch & Hinrichs, 1989; Mochizuki *et al.*, 1984) e neoplasias (Aiba *et al.*, 1985; Hartveit *et al.*, 1984).

Os mastócitos têm um papel fundamental nas reações alérgicas. Perante um alérgeno os mastócitos vão ser sensibilizados e vão responder produzindo uma reação imune específica. Antes da ativação dos mastócitos ocorre criação de linfócitos T auxiliares (CD4+ Th2), produção de IL-4 e IL-13 (citocinas dos CD4+ Th2) e consequente produção de IgE. Em suma, na presença de IL-4, as células CD4+ Th diferenciam-se em Th2 produzindo IL-4 e IL-13. A libertação destas citocinas leva a que os linfócitos B produzam e libertem IgE. A IgE vai se difundir local e sistemicamente, através de vasos linfáticos e posteriormente na circulação sanguínea, acabando por se ligar aos mastócitos. Esta ligação da IgE com o recetor FcεRI sensibiliza os mastócitos e ativa-os levando a libertação de mediadores pro-inflamatórios, que causam sintomas agudos de uma reação alérgica (Delves *et al.*, 2011).

Os mastócitos estão sujeitos a outros tipos de mecanismos de ativação como por exemplo através de componentes do complemento (Wojta *et al.*, 2002), por recetores do complemento, microrganismos (Supajatura *et al.*, 2001), por TLRs, IgG e quimiocinas através de recetores para quimiocinas (Dawson, 2012).

Os mastócitos são dos principais ativadores do sistema imune inato contra agentes patogénicos. Estes encontram-se estrategicamente localizados em muitos locais de exposição primária a antígenos como a pele, olho, pulmão e sistema gastrointestinal, e isto permite que os mastócitos sejam os primeiros a responder perante uma agressão por microrganismos. Isto faz com que os mastócitos sejam células com função sentinela para a imunidade inata. Devido a esta função sentinela os mastócitos desenvolveram três tipos de mecanismos de reconhecimento de agressão por agentes patogénicos: ligação direta com os agentes patogénicos ou com componentes seus através de recetores PAMP (*Pathogen-associated molecular patterns*); ligação, através de bactérias opsonizadas por proteínas do complemento ou anticorpos, a recetores de complemento ou de imunoglobulinas respetivamente; reconhecimento de péptidos endógenos libertados por células lesadas do hospedeiro (Dawson, 2012).

2.2 Mastocitoma

2.2.1 Etiologia

A verdadeira etiologia dos mastocitomas em cães não está completamente elucidada. Em ocasiões raras está relacionada com inflamações crônicas ou aplicação de produtos irritantes na pele. Uma etiologia vírica não tem evidência até ao momento, (não foram observadas partículas virais do tipo-C ou outro tipo de partículas) (Withrow & Vail, 2006). Por outro lado há quem defenda essa hipótese devido à presença ocasional de partículas víricas durante o exame ultra-estrutural dos mastócitos. Teoriza-se também que o Boxer e o Boston Terrier possuam oncogenes transmitidos à descendência, este oncogenes resultam numa maior incidência de mastocitomas nessas raças (Scott *et al.*, 2001).

Alguns estudos apontam para mutações ao nível do gene que expressa o receptor membranar c-kit, em mastócitos neoplásicos de cães (London *et al.*, 1996; Morini *et al.*, 2004; Reguera *et al.*, 2000; Webster *et al.*, 2007; Webster, Kiupel & Yuzbasiyan-Gurkan, 2006). 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 (Kitayama *et al.*, 1995; Zemke, Yamini & Yuzbasiyan-Gurkan, 2002).

Para além das mutações genéticas, alguns autores tem sugerido que inflamações cutâneas crônicas podem ter um papel no desenvolvimento do mastocitoma canino, ainda que tenham sido reportados poucos casos de mastocitomas associados a dermatites crônicas, cicatrizes ou agentes irritantes da pele (Govier, 2003; Hottendorf & Nielsen, 2010).

2.2.2 Fisiopatologia e sinais paraneoplásicos

O mastocitoma é um tumor que apresenta frequentemente sinais clínicos sistémicos. As substâncias vasoativas, presentes nos grânulos dos mastócitos, podem ser libertadas pelo tumor e causar eritema e edema. O aumento da histamina na circulação pode provocar úlceras gástricas e duodenais e a heparina pode aumentar a probabilidade de hemorragias. Estes síndromes paraneoplásicos podem provocar um quadro mais grave e urgente que o próprio mastocitoma primário (Fox, 2002; Howard *et al.*, 1969; Rhodes & Werner, 2011).

Do ponto de vista clínico as consequências mais relevantes dos mastocitomas são então o surgimento de úlceras gastroduodenais (que ocorrem em cerca de 83% dos casos), coagulopatias e o atraso nos processos de cicatrização (Lemarié, Lemarié & Hedlund, 1995; Macy, 1987). As úlceras gástricas podem ser assintomáticas ou provocar anorexia, emese ou hematemese, diarreia, melena e anemia. Se estas forem perfuradas podem ainda causar peritonite e abdomén agudo. Estes sinais clínicos são muitas vezes o motivo da consulta, sem que os proprietários tenham reparado no aparecimento de uma massa nem associado a presença da massa aos sinais (O’Keefe, 1990; Rogers, 1993).

O mastócito neoplásico contem cerca de 25 a 50 vezes mais histamina que um mastócito normal, tendo este facto tem um papel importante na morbidade associada com os mastocitomas (Macy & MacEwen, 1989). A histamina libertada pelos grânulos dos mastocitomas atua ao nível das células parietais do estômago através dos receptores H₂, resultando num aumento da secreção de ácido clorídrico. A histamina plasmática encontra-se aumentada em cães com mastocitomas e isso pode ser uma boa maneira de monitorizar a progressão da doença (Ishiguro *et al.*, 2003). Normalmente estes cães também apresentam uma diminuição dos níveis de gastrina, que é libertada pelas células G antrais, em resposta a um aumento do ácido clorídrico (Howard *et al.*, 1969).

Outra das consequências da libertação de substâncias vasoativas são as hemorragias durante a excisão cirúrgica (libertação de heparina) e os atrasos na cicatrização pós cirúrgica. Estes últimos são causados pela libertação de histamina que vai bloquear os receptores H₁ e H₂ dos macrófagos, levando dessa forma à libertação do factor supressor dos fibroblastos, diminuindo a produção de colagénio e conseqüente atraso da cicatrização (Withrow & Vail, 2006).

São comuns as coagulopatias sistémicas associadas aos mastocitomas e estas raramente ocorrem devido a alterações nos fatores de coagulação. Podem ocorrer também coagulações intravasculares disseminadas associadas ao tumor (Lemarié, Lemarié & Hedlund, 1995)

A metastização parece estar relacionada com o grau histológico (maior grau histológico maior probabilidade de metastização). Quando esta ocorre começa por infiltrar os gânglios linfáticos para onde drena a localização na qual se encontra a lesão e de seguida infiltra o baço e fígado. Outros órgãos podem ser afetados porém é mais comum

encontrarmos mastócitos neoplásicos na medula óssea do que, por exemplo, nos pulmões. (O'Keefe *et al.*, 1987)

Pode ocasionalmente ocorrer choque anafilático, devido a desgranulação súbita e liberação massiva de histamina das células neoplásicas. Apesar de incomum, esta reação está descrita na literatura em animais que continham formas disseminadas da doença (Withrow & Vail, 2006).

Existem ainda mais alguns síndromas paraneoplásicos mais relacionados com mastocitomas disseminados como a eosinofilia devido ao aumento de produção de IL-2 e IL-5, glomerulonefrite (Gaschen & Teske, 2005; North & Banks, 2009) e sinais neurológicos como hipotonia muscular, hiporreflexia e síndrome vestibular, que cessam após a primeira sessão de quimioterapia (Rodigheri *et al.*, 2008).

2.2.3 Epidemiologia: incidências e fatores de risco

A incidência de neoplasias na espécie canina tem vindo a aumentar, muito em parte devido ao aumento da esperança de vida, o que resulta numa maior exposição a agentes cancerígenos (Furlani *et al.*, 2008). Para além disso animais mais velhos tendem a ter o sistema imune comprometido, levando a falhar na vigilância e permitindo o desenvolvimento de processos neoplásicos (Withrow & Vail, 2006).

Os mastocitomas constituem o tipo de tumor cutâneo mais comum no cão (entre 16% a 21%) (Bostock, 1986; Finnie & Bostock, 1979). Além da alta incidência, o mastocitoma é considerado por diversos autores como um tumor maligno ou potencialmente maligno nos cães (Ogilvie & Moore, 1995; Scott *et al.*, 2001; Zemke, Yamini & Yuzbasiyan-Gurkan, 2002).

2.2.3.1 Raça

Esta neoplasia já foi descrita em todas as raças caninas porém, em termos de raça, cães com ancestrais provenientes de Bulldog, como o Boxer e o Boston Terrier, têm maior probabilidade de desenvolvimento de mastocitomas, porém de menor gravidade (London & Seguin, 2003; Welle *et al.*, 2008).

Os cães sem raça definida e os Boxers constituem as entidades de maior incidência desta doença (Withrow e Vail, 2006; Bostock, 1986), seguindo-se dos Boston Terriers,

Labrador Retrievers, Beagles, Shnauzers (Withrow & Vail, 2006), Cães de Gado Australianos e Starffordshire Bull Terriers (Baker-Gabb, Hunt & France, 2003). Outras raças onde estão também descritos mastocitomas com alguma frequência incluem Bullmastiffs, Cocker Spaniels, Fox terrier, English Bulldog, Dachshund, Golden Retriever, Beagles, Pug, Sharpei, Rhodesian Ridgeback, Weimaraner e (London & Seguin, 2003; Welle *et al.*, 2008).

Apesar dos Boxers serem a raça com maior predisposição, estes normalmente desenvolvem mastocitomas de baixo ou intermédio grau (Bostock, 1986).

Num estudo, Boxers e Boston Terriers representaram mais de 50% dos cães observados com mastocitoma. Os Boxers apresentaram 16,7 vezes mais probabilidade de desenvolvimento desta neoplasia e os Boston Terries 8 vezes mais, comparando com as outras raças (Brodey, 1970; Peters, 1969).

2.2.3.1 Sexo

Quanto a predisposição sexual, a maior parte dos estudos refere não haver (Baker-Gabb, Hunt & France, 2003; Govier, 2003; London & Seguin, 2003; Scott *et al.*, 2001; Thamm, Mauldin & Vail, 1997; Welle *et al.*, 2008) embora alguns autores tenham verificado maior incidência em fêmeas (Simoes, Schoning & Butine, 1994) ou em fêmeas castradas e machos não castrados. Apresentando este estudo ainda um melhor prognóstico para tratamentos quimioterápicos em fêmeas do que em machos (Gerritsen *et al.*, 1998).

Um estudo refere que fêmeas castradas têm maior risco de desenvolver tumores múltiplos (Mullins *et al.*, 2006) enquanto que outro afirma que não existe diferença na predisposição entre fêmeas e machos castrados (Simpson *et al.*, 2004).

2.2.3.1 Idade

Existem muitos estudos que apresentam idades médias para o desenvolvimento de mastocitomas. A idade média varia entre os 7,2 e os 9 anos (Baker-Gabb, Hunt & France, 2003; Bensignor *et al.*, 1996; Govier, 2003; Kiupel *et al.*, 2005; Thamm, Mauldin & Vail, 1997). Observou-se ainda um aumento da incidência com o avançar da idade (Bensignor *et al.*, 1996).

Os mastocitomas podem ocorrer esporadicamente em animais jovens. Foi relatado um caso de um Jack Russel Terrier de apenas 3 semanas (Davis *et al.*, 1992) e de Pastor

Alemão de 7 semanas (Cole, 1990). Os Shar-Pei parecem ter uma maior incidência de mastocitomas em animais jovens, com tumores indiferenciados a surgirem em animais com menos de 2 anos de idade (Miller, 1995).

2.2.4 Apresentação clínica

Os mastocitomas são conhecidos como os “grandes imitadores”, uma vez que podem mimetizar outras lesões (Murphy, 2011). O aspecto macroscópico é variado. As lesões podem ser desde firmes a moles, papulares, nodulares a pedunculadas, localização dérmica a subcutânea, bem a mal circunscritas, com a pele corada a eritematosa ou hiperpigmentada. Devido a ser um tumor de células redondas e não ter uma apresentação típica este pode mimetizar qualquer tipo de tumor de pele daí ter de ser considerado diagnóstico diferencial para qualquer tipo de tumor de pele (Moore & Kitchell, 2003; Morris & Dobson, 2008).

Podem ter desde poucos milímetros a vários centímetros de diâmetro, medindo menos de 3 cm em 56% dos casos. Podem ter um aspecto tumefacto urticariforme ou de uma área difusa de edema e inflamação lembrando celulite, podem ainda ulcerar (Bensignor *et al.*, 1996; Gross *et al.*, 2005; Scott *et al.*, 2001). A ulceração e a hemorragia são comuns em tumores de grande tamanho (Goldschmidt & Hendrick, 2002) e de modo geral, ulceração, edema, eritema, aumento de temperatura local e prurido são associados a pior prognóstico (Welle *et al.*, 2008).

A manipulação cutânea do tumor pode levar a desgranulação resultando no sinal de Darier, ou seja eritema e edema local, devido à libertação de heparina, histamina e outros factores vasoativos (Birchard & Sherding, 2005).

A localização anatómica desta neoplasia pode variar conforme a raça do cão e parece também estar associada à malignidade deste. Os mastocitomas localizados no períneo e prepúcio tendem a ter uma maior malignidade (Ogilvie & Moore, 1995).

Existem algumas correlações entre a apresentação clínica e a malignidade dos mastocitomas, sendo que mastocitomas bem diferenciados apresentam-se normalmente como lesões solitárias, com diâmetro entre 1 a 4 cm, de crescimento lento, não ulcerados, e presentes há pelo menos 6 meses (London & Seguin, 2003). Os mastocitomas indiferenciados tendem a ter um crescimento rápido, a ser ulcerados e os tecidos adjacentes exibirem eritema ou edema (Bostock, 1973; Govier, 2003), podem desenvolver-se pequenos nódulos satélites

nos tecidos vizinhos. Os tumores de diferenciação intermédia preenchem o espectro entre estes dois extremos (Withrow & Vail, 2006).

Em termos percentuais, os mastocitomas, tendem a aparecer mais comumente no tronco e abdómen (37,7% a 50%), seguido das extremidades (35,8% a 40%), cabeça e pescoço (10% a 13%), a região inguinal e perianal representaram 11% a 15% dos tumores. Parece ainda haver uma predisposição para a parte posterior do corpo (Bensignor *et al.*, 1996; Fulcher *et al.*, 2006; Kiupel *et al.*, 2005; London & Seguin, 2003).

Algumas raças aparentam ter predisposição para o desenvolvimento de tumores em localizações específicas. Os Boxer, os Boston Terrier, os Pug, os Setter Inglês e os American Staffordshire Terrier têm propensão a desenvolver tumores nos membros posteriores; o Leão da Rodésia tem maior incidência de tumores na cauda enquanto que o Setter Inglês desenvolve frequentemente tumores na cabeça. (Goldschmidt & Shofer, 1992).

Os Boxer (Goldschmidt & Shofer, 1992; Kiupel *et al.*, 2005), os Pug, os Weimaraner (Goldschmidt & Shofer, 1992) e os Golden Retriever têm predisposição para desenvolverem tumores múltiplos enquanto os Labrador Retriever apresentam uma maior prevalência de massas isoladas (Murphy, 2011).

Ao corte apresentam-se como nódulos de cor branca a ligeiramente amarela, dependendo a cor e a consistência do grau de desgranulação das células e da existência de processo inflamatório concomitante (Goldschmidt & Hendrick, 2002; Hendrick *et al.*, 1998).

2.2.5 Diagnóstico

Durante o processo de diagnóstico de um mastocitoma deve proceder-se à realização de uma citologia e de uma histopatologia de modo obter-se um diagnóstico definitivo, estadiamento tumoral de modo a avaliar o comprometimento sistémico da doença e registo dos sinais clínicos relativos a síndromes paraneoplásicas (Welle *et al.*, 2008).

Devido aos mastocitomas serem vistos como os “grandes imitadores”, é sempre importante ter em conta os possíveis diagnósticos diferenciais como linfoma, plasmocitoma, histiocitoma e tumor venéreo transmissível entre outros (London & Seguin, 2003).

2.2.5.1 Citologia tumoral

A punção aspirativa por agulha fina (PAAF) é um método fácil, pouco invasivo, de baixo risco para o paciente e de reduzida agressão para a neoplasia (Fox, 2002; Furlani *et al.*, 2008). Para além disso a PAAF, seguida de avaliação citológica, tem uma elevada sensibilidade, obtendo-se um correto diagnóstico em 96% dos mastocitomas. Deste modo deve ser realizada antes de qualquer procedimento cirúrgico, pois vai influenciar o tipo e extensão da intervenção cirúrgica (Baker-Gabb, Hunt & France, 2003; Withrow & Vail, 2006).

Após a punção as pode corar-se o material aspirado com corantes hematológicos comuns como Wright, Giemsa, Leishman ou com colorações mais específicas como o azul de Toluidina. Os mastócitos vão então surgir como células redondas, com um núcleo oval em posição central, que pode ser difícil de visualizar devido à presença de grânulos citoplasmáticos. Nos mastocitomas pouco diferenciados os mastócitos podem conter poucos ou nenhuns grânulos. A citologia por si só não chega como diagnóstico definitivo tendo de ser feita posteriormente avaliação histopatológica (London & Seguin, 2003). Porém esta técnica auxilia no diagnóstico definitivo pois as neoplasias de células redondas tendem a apresentar modelos histológicos frequentemente semelhantes (Duncan & Prasse, 1979).

Em 2008, durante a sua tese de mestrado, Torres Neto propôs uma adaptação da classificação histopatológica estabelecida por Patnaik *et al.* (1984) para o diagnóstico citológico. Em mastocitomas de grau I existe um elevado número de grânulos metacromáticos, núcleo pequeno, arredondado e uniforme. Variação do tamanho, forma nuclear e menor quantidade de grânulos em mastocitomas de grau II. Por fim nos mastocitomas de grau III ocorre variação do núcleo tanto no tamanho como na forma, presença de células bi ou multinucleadas e figuras mitóticas atípicas (Neto, 2008).

2.2.5.2 Analítica sanguínea e urianálise

Pacientes com suspeita de um processo neoplásico a decorrer devem realizar um *check up* hematológico, bioquímico e urianálise de modo a descartar comprometimento sistémico da doença, incluindo envolvimento hepático, renal, anemias. É comum a eosinofilia devido à produção e libertação de factores quimiotáticos e IL-5 pelos mastócitos (London *et al.*, 2003).

2.2.5.3 Estadiamento tumoral

Antes de se avançar para qualquer tipo de tratamento é indispensável a realização do estadiamento tumoral de modo a poder-se dar um prognóstico aos proprietários (London & Seguin, 2003). É também importante conhecer a extensão do tumor de modo a conseguir-se planear a extensão da excisão cirúrgica necessária à obtenção de margens cirúrgicas limpas. Isto pode-se tornar difícil quando o tumor é móvel ou não possui margens homogêneas. Sempre que um tumor produza reposta inflamatória regional deve-se presumir que existe infiltração local e optar-se pelo uso de radioterapia ou o uso de corticosteróides pré-cirúrgicos, de modo a tentar-se alcançar margens limpas (North & Banks, 2009).

Quando os mastocitomas metastizam, o primeiro local a ser afectado são os gânglios linfáticos regionais, seguindo-se o baço e fígado. Raramente os pulmões são afectados. Em casos de disseminação sistémica, podem ser observados mastócitos neoplásicos na medula óssea e no sangue periférico (Withrow & Vail, 2006).

O estadiamento tumoral tem como fim a pesquisa de metastização. Contempla assim a examinação citológica de gânglios linfáticos, baço, fígado, medula óssea e sangue. Contudo é recomendada citologia do baço e fígado mesmo em casos em o fígado e baço se encontrem ecograficamente normais pois é comum obter-se citologias com evidências de infiltração mastocitária sem alterações ecográficas. Após um estudo concluiu-se que a sensibilidade para a detecção ecográfica de infiltração de mastócitos no baço foi de 43% e 0% no fígado (Book *et al.*, 2011; Stefanello *et al.*, 2009).

A palpação, por si só, dos gânglios linfáticos não foi considerada um bom meio de diagnóstico de metastização ganglionar (Baginski, Davis & Bastian, 2014). Os gânglios linfáticos regionais devem ser cuidadosamente palpados e todos os gânglios linfáticos que apresentem linfadenomegália ou que levantem outras suspeitas devem ser puncionados para análise citológica. Alguns autores defendem que todos os gânglios linfáticos regionais acessíveis devem ser analisados citologicamente (London e Seguin, 2003).

Para se poder dizer que um gânglio linfático encontra-se infiltrado pelo mastocitoma, a população celular de mastócitos tem de ser superior a 3%. Outro fator a ter em conta é a diferenciação citológica mastocitária e a observação de agrupamentos celulares (Dobson &

Scase, 2007). Deve-se executar a linfadenectomia dos gânglios afetados ou com suspeita de estarem afetados, com posterior análise histopatológica (Withrow & Vail, 2006).

Numa citologia de medula óssea normal os mastócitos são raros, porém podem estar aumentados aquando de um processo inflamatório (London & Seguin, 2003). Por norma não existe infiltração de mastócitos na medula óssea em cães com mastocitomas, a menos que já haja infiltração de mastócitos nos gânglios linfáticos regionais e órgãos abdominais. Isto levou ao desuso da citologia de medula óssea como método diagnóstico de mastocitomas (Welle *et al.*, 2008).

As radiografias torácicas têm pouca relevância nos mastocitomas pois estes raramente metastizam para os pulmões (North & Banks, 2009). No entanto, a avaliação radiográfica abdominal pode ter relevância pois permite a visualização de hepatomegalia e esplenomegalia que pode ser sinal de metastização para estes órgãos (London & Seguin, 2003).

A avaliação ecográfica tem uma grande relevância diagnóstica pois permite averiguar o envolvimento do baço e do fígado, porém deve ser sempre acompanhada por PAAF (punção aspirativa por agulha fina) de ambos os órgãos de modo a obter-se um diagnóstico conclusivo. A presença de mastócitos nestes órgão é usual por isso deve-se ter em conta a morfologia dos mesmos (North & Banks, 2009; O'Brien & Barr, 2009).

O sistema de estadiamento tumoral de mastocitomas mais utilizado é o proposto pela OMS (Organização Mundial de Saúde) (Tabela I), apesar de existirem alguns autores que discordam com a utilização do mesmo devido à colocação de tumores múltiplos no estadio III logo pior prognóstico do que tumores solitários do mesmo grau histológico, o que nem sempre é verdade (Mullins *et al.*, 2006; Thamm, Mauldin & Vail, 1999).

Tabela I - Estadiamento de mastocitomas segundo a OMS, adaptado de O'Keefe, 1990

Estadio I	Tumor solitário confinado à derme, sem infiltração ganglionar regional
Estadio II	Tumor solitário confinado à derme, com infiltração ganglionar regional
Estadio III	Tumor na derme múltiplo ou muito infiltrativo, com ou sem infiltração ganglionar regional
Estadio IV	Qualquer tumor com metastização à distancia ou recidivo com metastização (incluindo sangue e medula óssea)

Em 2010 London propôs um novo sistema de estadiamento tumoral que inclui a presença de infiltração neoplásica nos gânglios linfáticos satélite e metastização (Tabela II).

Tabela II - Sistema de classificação tumoral proposto por London, 2010, adaptado de London, 2010

Estadio clínico	Tumor	Infiltração do Gânglio Linfático Regional	Metastização
IA	Tumor solitário, confinado à pele, <3 cm, bem circunscrito	negativo	negativo
IB	Tumor múltiplo, confinado à pele, com mais de 3 cm interlesional	negativo	negativo
II	Um ou mais tumores cutâneos, com mais de 3cm, mal circunscrito, ulcerado ou com nódulos satélites	negativo	negativo
III	Uma das anteriores	positivo	negativo
IV	Uma das anteriores	negativo ou positivo	positivo

2.2.5.4 Histopatologia e graduação histológica

Existe uma ampla variedade de padrões histológicos nos mastocitomas caninos, e o grau histológico está descrito como um forte factor de prognóstico tanto para o desfecho clínico como no comportamento biológico. Só é possível determinar o grau histológico após biopsia incisional ou excisional do tumor (Withrow & Vail, 2006). A histopatologia é assim indispensável para um melhor delineamento do tratamento de modo a possibilitar-se um aumento da sobrevida (Fox, 2002; Furlani *et al.*, 2008).

A classificação histológica mais comumente usada pelos patologistas veterinários é segundo Patnaik, Ehler e MacEwen proposta em 1984, por ser a mais completa e lógica. Esta classificação engloba a avaliação das características celulares como o número de grânulos citoplasmáticos, o grau de anisocariose, o número de figuras mitóticas por campo e a invasão tumoral dos tecidos adjacentes (Goldschmidt & Hendrick, 2002). Devido à avaliação histopatológica ser relativamente subjetiva, o que leva a variações na avaliação consoante o observador mesmo que esteja a ser avaliada a mesma lâmina, variação da classificação consoante a zona da preparação que está a ser observada. Isto ocorre principalmente em tumores de diferenciação intermédia (Strefezzi *et al.*, 2010). O corante mais utilizado na avaliação histológica é o azul de Toluidina (Kiupel *et al.*, 2005).

Segundo estes, os mastocitomas de grau I representam cerca de 36% dos casos. Ocorrem na derme e espaços interfoliculares. Nestes podem ser visualizados mastócitos bem diferenciados em grupos ou filas, separados por filas de colagénio maduro. Em termos morfológicos os mastócitos apresentam-se como células redondas e monomórficas com bastante citoplasma, limites citoplasmáticos bem diferenciados e de tamanho médio com grânulos intracitoplasmáticos. Exibem núcleos redondos com a cromatina condensada. Não são visualizadas células em fase mitótica (Gross *et al.*, 2005; Patnaik, Ehler & MacEwen, 1984).

Os mastocitomas de grau II representaram cerca de 43% dos casos para Patnaik *et al.* em 1984. Constitui uma neoplasia moderada a altamente celular, na qual as células neoplásicas estavam infiltradas ou substituíam a camada profunda da derme e tecido subcutâneo e podem infiltrar os tecidos adjacentes. As células apresentam-se moderadamente pleomórficas, organizadas em grupos e com um fino estroma fibrovascular, que pode também ser mais espesso e fibrocolagenoso com áreas de hialinização. Morfológicamente as células

neoplásicas são redondas, ovóides, por vezes encontram-se algumas células em forma de fuso ou células gigantes. Maioritariamente apresentam citoplasma fino e grânulos intracitoplasmáticos, contudo o citoplasma pode ser indistinto e os grânulos podem apresentar-se grandes e hipercromáticos. Os núcleos são redondos com a cromatina espalhada e apresentam apenas um nucléolo, ocasionalmente podem aparecer células com duplo núcleo, sendo raro observar células mitóticas. É possível observar áreas de edema e necrose difusa (Gross *et al.*, 2005; Patnaik, Ehler & MacEwen, 1984).

Quanto aos mastocitomas de grau III, estes são tumores celulares e pleomórficos nos quais as células neoplásicas substituíram totalmente o tecido subcutâneo e tecidos profundos adjacentes. Como já referido as células neoplásicas são pleomórficas, de tamanho médio, redondas, ovóides ou em forma de fuso e organizadas em grupos compactados. O citoplasma apresenta-se indistinto com pequenos grânulos intracitoplasmáticos não óbvios. Como nos mastocitomas de grau II, o estroma mais uma vez é fibrovascular ou fibrocolagenoso com áreas de hialinização. O núcleo celular exhibe a cromatina dispersa e possui um ou mais nucléolos. É comum a observação de células binucleadas existem muitas células gigantes e multinucleadas dispersas, bem como células em fase mitótica. Observam-se áreas de edema, hemorragia e necrose. Neste estudo os mastocitomas de grau III representaram 20% dos casos (Gross *et al.*, 2005; Patnaik, Ehler & MacEwen, 1984).

Parece haver uma tendência dos patologistas veterinários para a classificação de mastocitomas em grau II quando existe dúvida entre mastocitomas de grau I e de grau II. Devido a esta dúvida quase 50% dos mastocitomas diagnosticados perdem a sua relevância prognóstica devido à ambiguidade dos mastocitomas de grau II. A elevada ambiguidade e falta de consistência na classificação levou a que fosse proposta uma classificação dos mastocitomas em apenas dois graus baseada em critérios microscópicos simples. A falta de distinção entre mastocitomas de grau I e II e a falta de associação destes tumores com a diminuição esperança de vida leva a crer que estes possam ser juntos num só grupo representativo de mastocitomas de baixo grau. Este sistema propõe então uma divisão dos mastocitomas em dois graus, mastocitomas de baixo grau e mastocitomas de elevado grau, o que alguns autores defendem ter uma maior utilidade clínica. Um dos critérios usados para a diferenciação entre mastocitomas de grau I e II é a invasão da *subcutis*, porém já foi provado em pelo menos dois estudos como um fator sem relevância prognóstica. Com isto, este sistema de avaliação defende que os critérios a ser usados deveriam basear-se mais na

morfologia das células neoplásicas como o tamanho do núcleo, a organização da cromatina, o nucléolo, a presença de células multinucleadas e o número de figuras mitóticas (Kiupel *et al.*, 2011).

Em 2011 Kiupel *et al.* propuseram que um mastocitoma deve ser classificado como um tumor de elevado grau se for observado um ou mais dos seguintes critérios, em dez campos de grande ampliação: sete ou mais mitoses, três ou mais células multinucleadas com pelo menos três núcleos de aparência atípica, indentações marcadas, segmentação e forma irregular, cariomegalia em pelo menos 10% das células.

Esta classificação demonstrou uma baixa intervariabilidade entre os patologistas por conter critérios de classificação mais objetivos face à classificação de Patnaik. A relação entre o prognóstico e o tempo médio de sobrevivência (TMS) foi significativa. Cães diagnosticados com mastocitoma de elevado grau obtiveram um TMS inferior a quatro meses, enquanto que cães diagnosticados com mastocitoma de baixo grau obtiveram um TMS superior a dois anos. Cães com mastocitoma de elevado grau apresentaram para além de uma maior taxa de mortalidade, um maior risco de desenvolvimento de novos tumores e metástases, num menor intervalo de tempo (Donnelly *et al.*, 2013; Kiupel *et al.*, 2011; Takeuchi *et al.*, 2013; Vascellari *et al.*, 2013).

2.2.5.5 Histoquímica e Imunohistoquímica

A histoquímica, é uma técnica que permite a visualização de estruturas celulares e/ou tecidulares, através da utilização de corantes ou marcadores químicos (Fernandez *et al.*, 2005). Os corantes mais usados para histoquímica de mastocitomas são o azul de Toluidina, que cora os grânulos citoplasmáticos dos mastócitos; o corante de hematoxilina-eosina (HE); e os corante de prata que coram a região organizadora nuclear argirofílica (AgNOR) que serve para avaliar o índice de proliferação celular. O corante AgNOR é muito eficaz no relacionamento do grau histopatológico com o índice mitótico e desta maneira melhor classificar mastocitomas de grau dúbio, para além de ser um método acessível e económico (Rech *et al.*, 2004).

A imunohistoquímica é um exame complementar e de extrema importância principalmente em tumores de células redondas. Este exame tem como fim a identificação de determinadas substâncias e/ou outros componentes celulares, através de um processo

imunológico. (Fernandez *et al.*, 2005). Nos mastocitomas um dos marcadores imunohistoquímicos que se utiliza é o anticorpo monoclonal de reconhecimento da triptase. Que se demonstrou eficaz na detecção de mastocitomas entre outras neoplasias de células redondas (Fernandez *et al.*, 2005).

2.2.6 Tratamento

Os mastocitomas podem ser tratados cirurgicamente, por radioterapia, quimioterapia ou uma combinação entre elas (Scott *et al.*, 2001). Por norma, a radioterapia é usada em mastocitomas com excisão incompleta e com metástases nos gânglios linfáticos regionais (Frimberger *et al.*, 1997), enquanto que a quimioterapia e glucocorticóides são mais utilizados para tratar mastocitomas sistêmicos ou quando não é possível a excisão (O'Keefe, 1990).

A escolha da abordagem terapêutica vai depender do estado do paciente, do grau histológico e do estadió clínico (Withrow & Vail, 2006).

2.2.6.1 Abordagem cirúrgica

O tratamento recomendado para mastocitomas grau I e II é a excisão cirúrgica (Monteiro, Boston & Monteith, 2011).

Tumores de grau I são de fácil excisão completa (taxas de 100%). Tumores de grau II conseguem ser completamente excisados em 75% com uma margem cirúrgica de 1cm e 100% com margem de 2cm e quase todos os tumores de grau II conseguem ser completamente excisados com margens profundas de 1mm (uma fásia). Margens laterais de 2cm e margens profundas de um plano fascial são adequadas para a completa excisão de mastocitomas de grau I e II em cães (Fox, 2002; Fulcher *et al.*, 2006; Simpson *et al.*, 2004).

Em mastocitomas de grau III o procedimento cirúrgico, associado ou não a radioterapia, é desaconselhado por se tratar de um neoplasia extremamente agressiva. A sobrevida média dos casos submetidos apenas a cirurgia é de apenas 13 semanas. Recomenda-se o uso de quimioterapia sistémica em casos de mastocitomas múltiplos, disseminados, neoplasia sistémica, tumores não operáveis e tumores anaplásicos extirpados (Ogilvie & Moore, 1995; Rogers, 1993).

Alguns autores defendem uma abordagem cirúrgica mais agressiva recomendando excisão cirúrgica com amplas margens cirúrgicas, três centímetros de margens laterais e

profunda (Fox, 2002) ou a ampliação das margem para cinco centímetros se a localização assim o permitir (Frimberger *et al.*, 1997). Por outro lado alguns autores defendem o contrário, propondo que a maior parte dos mastocitomas de grau I e II podem ser facilmente tratados apenas cirurgicamente e a excisão cirúrgica pode ser efetuada com margens cirúrgicas menores do que as atualmente praticadas (Schultheiss *et al.*, 2011).

A excisão usando como referência a maior dimensão do tumor (diâmetro) como medida de margem lateral e com profundidade mínima de um plano fascial (margens proporcionais modificadas) resulta num controlo local satisfatório de mastocitomas em cães. Este estudo concluiu que os tumores excisados com estas margens apresentam margens cirúrgicas limpas em 85% dos casos, tendo sido incluídos neste estudo tumores de grau I, II e III. Esta técnica foi recomendada principalmente para zonas com pouco tecido cutâneo disponível para reconstrução cirúrgica ou em mastocitomas cutâneos múltiplos (Pratschke *et al.*, 2013).

Por outro lado, noutro estudo, o diâmetro do tumor não apresentou qualquer relação com as margens histológicas, o que de certa maneira revoga a utilização das margens proporcionais modificadas (Schultheiss *et al.*, 2011).

Mesmo usando a mesma técnica cirúrgica está descrito obter-se margens cirúrgicas limpas em 48% dos tumores, 18% quase limpas e 33% com margens infiltradas (Scarpa *et al.*, 2012).

Mastocitomas diagnosticados apenas por citologia aspirativa devem ser removidos com amplas margens cirúrgicas e enviados para análise histopatológica (de modo a que possa ser avaliado o seu grau histológico para melhor determinar o prognóstico) (Shaw & Ihle, 2013; Withrow & Vail, 2006).

Os factores de risco para a excisão cirúrgica incompleta de mastocitomas são o baixo peso corporal e o elevado tamanho tumoral. Por outro lado os factores que não influenciam o risco de excisão cirúrgica incompleta são o sexo, idade, raça, localização, grau histológico, reexcisão e o nível de treino dos cirurgiões (Monteiro, Boston & Monteith, 2011).

Foi comprovado que cães de porte pequeno e tumores de grandes dimensões apresentam uma maior dificuldade de excisão cirúrgica completa (Monteiro, Boston & Monteith, 2011; Simpson *et al.*, 2004).

Tumores localizados nas extremidades devem ser abordados de maneira diferente dos restantes por não se conseguem atingir margens cirúrgicas suficientes. Uma das possibilidades que tem de ser propostas é a amputação pois acaba por ser a melhor forma de controlar o tumor. Outra opção pode ser a excisão cirúrgica combinada com radioterapia (Séguin *et al.*, 2006).

Mastocitomas de grau II tratados apenas com cirurgia têm uma recidiva local de 5%, com tempo médio de recidiva de 62 dias. Ocorre 11% de desenvolvimento de mastocitomas noutras localizações com tempo médio até ao aparecimento de 240 dias. Existe uma probabilidade de 5% dos casos desenvolverem metastização com um tempo médio até à metastização de 158 dias. Cerca de 84% dos cães não desenvolveram recidivas, metastização ou novos mastocitomas, sendo então suficiente a excisão cirúrgica para o tratamento de mastocitomas de grau II, sem necessidade de outros tratamentos quer locais ou sistémicos (Séguin *et al.*, 2001).

Noutro estudo a excisão incompleta de mastocitomas de grau II resulta numa recidiva local de 23,3% com uma média de tempo livre de doença de 1713 dias. Ocorre recidiva local ao fim de 1 ano em 17,3% dos casos, 22,1% ao fim de 2 anos e ao fim de 5 anos 33,3%. Quase 40% dos cães desenvolvem mastocitomas noutras localizações. O período médio livre de doença é 1044 dias e a média do tempo de sobrevivência é 1426 dias (Séguin *et al.*, 2006).

Uma abordagem cirúrgica mais agressiva leva a uma menor taxa de recidiva local (Baker-Gabb, Hunt & France, 2003) e a remoção do gânglio linfático afetado aumenta a esperança de vida (Baginski, Davis & Bastian, 2014).

Vários estudos afirmam que a obtenção de margens cirúrgicas completas nem sempre previne a recidiva local e que a excisão cirúrgica incompleta nem sempre é sinal de recidiva local certa (Donnelly *et al.*, 2013; Fulcher *et al.*, 2006; Michels *et al.*, 2002; Pratschke *et al.*, 2013; Simpson *et al.*, 2004; Weisse, Shofer & Sorenmo, 2002). Este facto pode ser explicado, no caso dos tumores incompletamente excisados não recidivarem, pois os mastócitos visto nas margens podem ser apenas mastócitos normais saudáveis ou então as restantes células neoplásicas que sobraram foram eliminadas pelo sistema imune do paciente (Fife *et al.*, 2011).

Quando não é possível efetuar uma excisão cirúrgica completa foram propostas alternativas terapêuticas para o controlo local. Caso a neoplasia se localize num membro foi sugerida a amputação do mesmo (Withrow & Vail, 2006). Outra opção será a utilização exclusiva de radioterapia (Dobson, Cohen & Gould, 2004). Uma opção também viável, e talvez a mais recomendada, será a cirurgia citoreductora seguida de radioterapia. Em vez de radioterapia também pode ser utilizada quimioterapia em conjunto com a cirurgia citoreductora (Withrow & Vail, 2006).

2.2.6.2 Quimioterapia

A quimioterapia está indicada, em mastocitomas, para o controlo da doença disseminada, para quando não é possível a intervenção cirúrgica, em mastocitomas de grau III e como tratamento adjuvante de mastocitomas de grau II com prognóstico desfavorável (Lanore & Delprat, 2004; Welle *et al.*, 2008).

A resposta do tumor aos agentes quimioterápicos é variada podendo-se alcançar um sucesso terapêutico em 78% dos casos, utilizando uma combinação de fármacos, como tratamento adjuvante da excisão cirúrgica (Govier, 2003).

Utilizam-se tratamentos poliquimioterápicos de modo a evitar resistências de células neoplásicas aos quimioterápicos. (Nardi & Rodaski, 2008)

Quando se está a definir o protocolo quimioterápico é importante ter em conta vários factores. É necessário ter em consideração o estadio da doença, a existência de sintomas paraneoplásicos, o estado geral do animal, a disponibilidade financeira e horária dos proprietários (Nardi & Rodaski, 2008).

Os protocolos quimioterápicos mais utilizados em mastocitomas caninos incluem a utilização de vimblastina, lomustina e/ou prednisolona. A vimblastina consegue ter taxas sucesso na ordem dos 11,8%, enquanto que a lomustina consegue chegar a 44% de respostas positivas ao tratamento (Grant *et al.*, 2008; McCaw *et al.*, 1997; Rassnick *et al.*, 1999).

Os corticoesteróides são os fármacos que têm demonstrado maior eficácia no tratamento de mastocitomas (Lemarié, Lemarié & Hedlund, 1995; Ogilvie & Moore, 1995). Estes vão inibir a proliferação do mastocitoma e ao mesmo tempo promovem a apoptose das

células tumorais através da interação com os receptores de glucocorticóides (Takahashi *et al.*, 1997).

A administração de glucocorticóides é uma prática comum no tratamento de mastocitomas, porém existem variações à resposta ao tratamento. A expressão do gene recepção de glucocorticóides (GR) contribui para a sensibilidade ao tratamento por prednisolona, logo tumores com baixa expressão do gene GR iram ter uma menor resposta ao tratamento (Matsuda *et al.*, 2011).

O tratamento adjuvante com prednisona tem um efeito citoreductor sobre a maior parte dos mastocitomas. Quer com doses altas (2,2mg/kg, *per os*, uma toma por dia) ou doses baixas (1,0mg/kg, *per os*, uma toma por dia) ocorre uma redução de diâmetro médio de cerca de 45% e uma redução média do volume tumoral de 80%. O tratamento adjuvante com prednisona parece ser útil na indução da redução de mastocitomas cutâneos o que pode facilitar a sua excisão especialmente quando o mastocitoma tem uma localização mais difícil ou a dimensão é elevada ou ambos (Stanclift & Gilson, 2008).

Existem diversos ensaios que estudaram a resposta de protocolos combinados de prednisolona com outros quimioterápicos. O protocolo de prednisolona e vimblastina, como tratamento adjuvante, demonstrou uma eficácia de 47% (Thamm, Turek & Vail, 2006; Thamm, Mauldin & Vail, 1999). Ocorreu toxicidade em 26% dos casos, sendo moderada a severa em 6,5% dos mesmos (Welle *et al.*, 2008). Este protocolo aplicado em cães com mastocitomas de grau II incompletamente excisados promove uma grande eficácia no controlo local e mesmo no desenvolvimento de metástases. Apenas 3,7% de recidiva local e 15% de desenvolvimento de mastocitomas à distância (Davies *et al.*, 2004). Já em mastocitomas de elevado grau este protocolo proporcionou uma sobrevida média de 196 semanas sendo que 70% dos cães sobreviveram 1 ano, 58% sobreviveram 2 anos e 53% sobreviveram 3 anos após o tratamento (Thamm, Turek & Vail, 2006).

Cães com mastocitoma de grau III, tratados cirurgicamente e sujeitos posteriormente a um protocolo quimioterápico de vimblastina e prednisona, que apresentavam mutações ao nível do c-kit e com elevados valores de AgNOR e ki67 apresentaram um menor intervalo livre de doença e menor sobrevida (Webster *et al.*, 2008).

Dentro dos protocolos que englobam prednisolona, a combinação com lomustina parece ser a mais eficaz. A lomustina (1-(2-chloroethyl)-3-cyclohexyl-1-nitrosourea; CCNU) é uma nitrosuréia, subgrupo de agentes alquilantes, é lipossolúvel e penetra facilmente no sistema nervoso central não apresentando resistência cruzada com outros alquilantes. Um efeito secundário raro mas descrito é o desenvolvimento de neoplasias secundárias como leucemia (Nardi & Rodaski, 2008). Cães com mastocitomas de grau II incompletamente excisados e foram sujeitos a um protocolo combinado de prednisolona e lomustina, obtendo-se um efeito positivo em quase 100% dos casos. Ao fim de 2 dois anos após o tratamento 77% dos animais encontravam-se ainda livres de doença. O único efeito adverso deste protocolo é a possível hepatotoxicidade grave que pode ocorrer em cerca de 17% dos animais sujeitos a este protocolo (Hosoya *et al.*, 2009).

Em mastocitomas de grau II e III a utilização de lomustina como terapia única apresenta um sucesso de 44% (Rassnick *et al.*, 1999). A combinação de vimblastina e lomustina aumenta a eficácia do tratamento para 54%. Contudo este protocolo apresenta uma toxicidade renal e hepática de 54% (Cooper *et al.*, 2009). Os protocolos com lomustina apresentaram toxicidade em 54% dos cães. Sendo os efeitos secundários de gravidade média, bem tolerado e com isto deve ser considerado como um tratamento viável para mastocitomas caninos inoperáveis (Cooper, Tsai & Bennett, 2009). Apesar da elevada eficácia no tratamento de mastocitomas de grau I e II, a lomustina provoca neutropenia aguda em 41% sujeitos a este fármaco e mais ocasionalmente pode provocar ascite, hipertermia, efusão pleural e hepatotoxicidade crônica (Rassnick *et al.*, 1999; Welle *et al.*, 2008).

O protocolo combinado de prednisolona, vimblastina e ciclofosfamida apresenta uma resposta global de 64%, podendo ser considerado uma boa opção terapêutica devido aos seus baixos níveis de toxicidade (Camps-Palau *et al.*, 2007).

Protocolos quimioterápicos com clorambucil associado a prednisolona não apresentam toxicidade relatada e a resposta, diminuição do tamanho da massa, é menos evidente do que nos protocolos mais comumente usados apesar do tempo de sobrevida ser equiparável. A grande vantagem deste protocolo é mesmo a toxicidade mínima (Taylor *et al.*, 2009).

A quimioterapia com apenas vincristina é ineficaz no tratamento de mastocitomas pois existe uma grande percentagem de reações adversas (32%) o que leva a necessidade de

parar o tratamento devido à toxicidade ou ao deterioramento da qualidade de vida do paciente (McCaw *et al.*, 1997).

2.2.6.3 Inibidores de quinases de tirosina

Os recetores de quinases de tirosina (TKR) são um grupo de recetores membranares, no qual se encontra o c-kit, que têm um papel fundamental na ativação das células no sentido de proliferação, diferenciação e sobrevivência celular. Estes recetores desenrolam um papel importante também na angiogénese e metastização (Blackwood, 2010). Os inibidores de TKR vão atuar como inibidores competitivos, bloqueando o local de ligação das moléculas de adenosina trifosfato na quinase, de forma reversível ou irreversível. Este método de tratamento já foi testado e comprovada a sua eficácia em mastocitomas (London *et al.*, 2009).

Dentro dos inibidores de TKR conhecidos, duas moléculas foram aprovadas pela Agência Europeia de Medicamentos, para o tratamento de mastocitomas caninos: o fosfato de toceranib e o masitinib (Blackwood, 2010). Ainda não existem muitos ensaios clínicos realizados em veterinária, contudo um estudo demonstrou a capacidade destas moléculas inibirem a ativação do c-kit e a proliferação de mastócitos neoplásicos (Liao *et al.*, 2002).

2.2.6.3.1 Fosfato de toceranib (Palladia®)

O tratamento com fosfato de toceranib está indicado para cães com mastocitomas recidivantes, não excisáveis de grau II ou III (Blackwood, 2010). Em 2003 foi realizado o primeiro ensaio clínico de inibidores de TKR em veterinária. Neste estudo foram analisados 57 cães com uma ampla variedade de neoplasias (carcinomas, sarcomas, mastocitomas, melanomas, linfomas). Obteve-se uma resposta positiva em 16 cães, dentro destes, em 6 cães, obteve-se remissão total da neoplasia. Quinze dos cães sujeitos a esta terapêutica apresentaram uma estabilização da progressão da doença durante 10 semanas. Dentro das neoplasias, os mastocitomas foram os que apresentaram a melhor resposta face a este tratamento (cerca de 69% de resposta positiva) (London *et al.*, 2003).

Como era expectável, os cães com mutação ao nível do c-kit responderam melhor à exposição de inibidores de TKR. Contudo animais sem esta mutação também responderam positivamente em 30% dos casos (London *et al.*, 2003).

Em 2009 foi realizado outro ensaio clínico em cães com mastocitomas de grau II e III inoperáveis. Os cães foram separados em dois grupos: um tratado com fosfato de toceranib e outro com um placebo. O grupo placebo apresentou uma resposta positiva em apenas 8% dos casos face aos 37% de resposta positiva no grupo ao qual foi administrado fosfato de toceranib. Na segunda fase do estudo 58 cães do grupo placebo foram selecionados e iniciaram o tratamento com fosfato de toceranib no qual foi registada uma resposta positiva objectiva na ordem dos 41%. A taxa de resposta global dos 145 cães que foram tratados com fosfato de toceranib foi de 43%. Cães com mutação ao nível do c-kit obtiveram uma resposta superior, 82%, face aos que não expressavam esta mutação, 55%. Outra constatação foi que cães com metastização nos gânglios linfáticos obtiveram uma taxa de sucesso menor, 46%, face aos cães sem metastização nos gânglios linfáticos, 67% (London *et al.*, 2009).

Num estudo recente foi instituído um protocolo que englobava fosfato de toceranib, radioterapia hipofraccionada e prednisolona. Obtiveram-se taxas de sucesso e de remissão melhores do que quando é administrado fosfato de toceranib unicamente (Carlsten *et al.*, 2012).

Outra combinação que melhora os resultados do fosfato de toceranib é a junção de vinblastina. Obteve-se uma resposta objectiva de 71%. Para além de uma resposta superior, é possível reduzir para metade a dose de vinblastina, contudo este protocolo obteve altos níveis de toxicidade. As doses máximas toleradas foram de 1,6mg/m² de 15 em 15 dias de vinblastina e 3,25mg/kg, *per os*, em dia sim dia não de fosfato de toceranib (Robat *et al.*, 2012).

2.2.6.3.2 Masitinib (Masivet® ou Kinavet®)

Está recomendada a utilização de masitinib em mastocitomas não excisáveis de grau II ou III que tenham presente a mutação do c-kit. (Blackwood, 2010) Esta molécula atua ao nível da inibição da fosforilação de vários TKR, do c-kit, do PDGFR (receptor do factor de crescimento derivado de plaquetas) e ainda das quinases Lyn, Fyn e Lck (Monografia-Masivet, 2009).

Recentemente foi provado que a inibição da atividade de quinase do PDGFR origina interrupção do crescimento tumoral e apoptose, desta forma aumentando a sensibilidade à quimioterapia e a biodisponibilidade tumoral (Monografia-Masivet, 2009).

O tratamento com masitinib foi implementado em 13 cães com mastocitomas de grau II e III. Neste estudo, de fase II, obtiveram-se duas respostas completas, duas respostas parciais e duas estabilizações da doença (London, 2009). Posteriormente este estudo avançou para uma terceira fase na qual cerca de 200 cães com mastocitomas de grau II e III, não operáveis e não metastáticos, foram divididos em dois grupos. Num dos grupos foi implementado tratamento com masitinib e no outro administrado um placebo. Não foram observadas diferenças significativas entre o placebo, 15%, e o masitinib, 16% (London, 2009). Contudo o grupo que foi sujeito ao tratamento com masitinib apresentou um período de progressão da doença maior face ao grupo placebo (118 dias de progressão para o grupo tratado com masitinib e 78 dias de progressão para o grupo submetido ao placebo), sem relação aparente com a presença de mutação ao nível do c-kit (Hahn *et al.*, 2008).

Num estudo mais recente foi avaliada a sobrevida dos cães sujeitos a masitinib comparativamente a cães sujeitos a um placebo. A taxa de sobrevida dos cães tratados com masitinib foi significativamente maior, 62,1% de sobrevida aos 12 meses e 39,8% de sobrevida aos 24 meses, comparativamente aos cães sujeitos ao placebo, 36% de sobrevida aos 12 meses e 15% de sobrevida aos 24 meses. O tempo médio de sobrevida do grupo tratado com masitinib foi de 617 dias, enquanto que no grupo sujeito a placebo foi de apenas 322 dias (Hahn *et al.*, 2010).

Para além dos benefícios já mencionados é também relevante referir que o masitinib tem um potencial anti-metastático no controlo de recidivas locais e metastização visceral em mastocitomas cutâneos de grau II e III não operáveis ou recidivantes (Ogilvie & Hensel, 2012).

2.2.6.4 Radioterapia

A radioterapia está indicada, como tratamento de mastocitomas, em situações de excisão cirúrgica incompleta, como forma de controlo local. (Goldschmidt & Shofer, 1992; Poirier *et al.*, 2006) A radioterapia está também aconselhada em casos de doença subclínica ou microscópica e no caso de uma nova excisão cirúrgica não seja possível. Alguns estudos defendem também a radioterapia como terapia citoreduzora pré-cirúrgica (Welle *et al.*, 2008; Withrow & Vail, 2006).

Um estudo revelou que os tumores de grau intermédio, excisados completamente, sujeitos ou não a radioterapia apresentam o mesmo controlo local. Conclui-se então que em tumores de grau intermédio, a utilização de radioterapia como tratamento adjuvante, é desnecessária e é mesmo desaconselhada devido aos seus efeitos colaterais (Weisse, Shofer & Sorenmo, 2002).

A eficácia de radioterapia em mastocitomas e metástases em gânglios linfáticos regionais foi testada num estudo em que foram incluídos cães com mastocitomas de grau I, II e III. Foi efectuada radioterapia pré cirúrgica para citorredução do tumor primário e gânglios linfático infiltrados (e alguns gânglios linfáticos não afectados tratados profilaticamente), juntamente foi também administrada prednisona oral. Foi realizada radioterapia com quantidade de radiação total entre 48 e 57 Gray nos quais os efeitos secundários foram aceitáveis. O período médio livre de doença foi de 1240 dias (entre 256 e 2391 dias). Concluiu-se então que para mastocitomas de grau II a combinação de cirurgia, radioterapia e Prednisona do tumor primário juntamente com radioterapia do gânglio linfático afectado é uma abordagem eficaz. (Chaffin & Thrall, 2002).

Noutro estudo cães com excisão incompleta de mastocitomas, determinada por histopatologia, foram irradiados com uma dose total entre os 46,2 e os 48 Gray usando ortovoltagem ou megavoltagem. A radiação foi aplicada ao redor da cicatriz cirúrgica (numa região de 3cm ao redor). 97% dos tumores não recidivaram no espaço de um ano e 93% dos tumores não recidivaram no espaço de três anos não havendo diferença entre a ortovoltagem ou megavoltagem providenciando ambas um excelente controlo local de mastocitomas mediantemente diferenciados (Frimberger *et al.*, 1997).

Num estudo foi avaliada a eficácia de um protocolo de radioterapia dia sim dia não para excisão incompleta de mastocitoma de grau III. O tratamento teve uma dose total de 52 Gray em 18 fracções em protocolo de dia sim dia não numa área de 3cm à volta da cicatriz cirúrgica e nos gânglios linfáticos regionais. O período mediano e médio de remissão foi respectivamente de 27,7 e 17 meses (de 1 a 47 meses). A esperança mediana e médio de vida foi respectivamente 28 e 20 meses (de 3 a 52 meses). Tumor localizados na pele da auricular, perineal e prepucial obtiveram um período médio de remissão superior do que cães com tumores localizados noutras localizações (27,7 e 14,4 meses respetivamente). Cães com tumores com menos de 3cm de diâmetro sobreviveram mais tempo do que cães com tumores

superiores a 3cm (31 e 24 meses respectivamente). Obteve-se uma taxa de remissão de 65% e uma taxa de sobrevivência de 71% um ano após o tratamento. Sem qualquer outro tratamento os mastocitomas de grau III que não tenham sido totalmente removidos têm uma alta reincidência loco-regional. A utilização de radioterapia loco-regional como tratamento adjuvante pós cirúrgico pode ajudar no controlo local deste tipo de tumores (Hahn, King & Carreras, 2004).

Cães que foram sujeitos a excisão incompleta ocorreu recidiva local em 13% dos casos sujeitos a reexcisões, 8% dos sujeitos a radioterapia local e 38% no caso de não ser efectuado nenhum tratamento complementar. Utilizando terapias adjuvantes, como radioterapia ou reexcisão, obtém-se uma taxa de recidiva local menor e um período livre de doença maior, logo na esperança de vida (Kry & Boston, 2014).

A radioterapia pode ser usada tratamento paliativo quando o tumor primário já se encontra metastizado no momento do diagnóstico ou quando o animal apresenta doenças concomitantes, ou seja quando a cirurgia está desaconselhada e o intuito é apenas melhorar a qualidade de vida do paciente (Welle *et al.*, 2008).

A radioterapia de protocolo hipofraccionado ou de baixas doses (40-45 Gray) proporciona uma taxa de controlo tumoral de 1 ano de 44% a 78% dos tumores macroscópicos (Dobson, Cohen & Gould, 2004; Welle *et al.*, 2008). Porém se forem utilizadas doses totais maiores, é possível uma taxa de controlo superior. Para tratamentos definitivos estão propostos protocolos de 48-57 Gray em 15 a 19 frações (Welle *et al.*, 2008).

Existem protocolos que sugerem a irradiação dos gânglios linfáticos regionais profilaticamente. Num estudo provou-se que esta ação profilática melhorou o prognóstico e aumentou o intervalo livre de doença em cães com mastocitomas de grau elevado ou que se localizavam em zonas próximas de junções mucocutâneas (Withrow & Vail, 2006).

Sempre que seja utilizada radioterapia é preciso ter em conta não só os efeitos colaterais da radiação, como os efeitos da radiação nos mastócitos que pela desgranulação pode induzir vômito, hipotensão e morte (London, 2008; Mayer, 2006).

2.2.6.5 Terapias de suporte

É de extrema importância avaliar a necessidade de implementação de terapêutica de suporte. Deve ser implementada terapia de suporte nos seguintes casos: presença de sinais sistêmicos ou locais devido a desgranulação mastocitária; aquando da excisão cirúrgica de mastocitomas múltiplos; quando temos presente um mastocitoma primário de grandes dimensões grande probabilidade de desgranulação local (Welle *et al.*, 2008).

Por norma não é necessária a implementação de terapêutica de suporte em mastocitomas submetidos a excisão cirúrgica completa, a não ser que ocorra uma excessiva manipulação da massa tumoral (Withrow & Vail, 2006). Nestes casos, ocorre libertação massiva de histamina aquando da desgranulação dos mastócitos contudo os efeitos que esta vai provocar podem ser anulados através da administração de antagonistas dos receptores H1, como a difenidramina (2-4mg/kg, *per os*, duas tomas por dia) (London & Seguin, 2003). A utilização de antagonistas dos receptores H2 é também aconselhável pois a histamina pode estimular as células parietais do estômago a produzir ácido clorídrico em elevadas quantidades, o que pode levar ao desenvolvimento de úlceras gastrointestinais. Como exemplo de antagonista dos receptores de H2 temos a cimetidina (4mg/kg, *per os*, três tomas por dia) ou a famotidina (0,5-1mg/kg, *per os*, uma toma por dia) (London & Seguin, 2003).

Outra terapia que pode ser aconselhada são os antieméticos em caso de náusea ou vômito, como a metoclopramida (0,1-0,4mg/kg, *per os*/subcutâneo/intramuscular, três a quatro tomas por dia), citrato de maropitant (1mg/kg, *per os*, uma toma por dia) e/ou ondansetron (0,1-1mg/kg, *per os*, uma a duas tomas por dia) (North & Banks, 2009; Withrow & Vail, 2006).

2.2.6.6 Criocirurgia e electrocirurgia

Tanto a criocirurgia como a electrocirurgia estão recomendadas na excisão de tumores não operáveis ou múltiplos (Scott *et al.*, 2001). Uma das recomendações é a administração de anti-histamínicos pré-cirurgicamente, pois o choque anafilático é uma consequência comum deste procedimento. Tendo em conta isto, é importante também a preparação pré-cirúrgica de uma solução salina endovenosa contendo epinefrina (Goldschmidt & Shofer, 1992; Scott *et al.*, 2001).

2.2.6.7 Instilação de água desionizada

Alguns estudos revelam que a instilação de água desionizada nas margens cirúrgicas, após a excisão, parece trazer alguns efeitos positivos no controlo local (Lemarié, Lemarié & Hedlund, 1995; Ogilvie & Moore, 1995). O processo por detrás deste aparente controlo é o efeito da hipotonicidade da água sobre as células que leva à ruptura da membrana citoplasmática e morte celular seletiva. Este tratamento deve ser repetido passados 10, 20 e 30 dias da cirurgia (Lemarié, Lemarié & Hedlund, 1995; Ogilvie & Moore, 1995).

Outros autores afirmam que esta técnica não apresenta eficácia na prevenção de recidiva local do tumor e por isso não é recomendada (Brocks *et al.*, 2008; Grier & Guardo, 1990, 1995; Jaffe & Hosgood, 2000; Neyens & Kirpensteijn, 2004).

2.2.6.8 Outras modalidades terapêuticas

Várias terapias têm sido propostas para o tratamento de mastocitomas cutâneos caninos como por exemplo hipertermia em combinação com radioterapia (Withrow & Vail, 2006), terapia fotodinâmica (Frimberger, Moore & Cincotta, 1998), administração de corticoesteróides intralesional (Rogers, 1993), braquiterapia intralesional (Northrup *et al.*, 2004), crioterapia e electroquimioterapia (Kodre *et al.*, 2009; Spugnini & Vincenzi, 2011; Spugnini, Vincenzi & Baldi, 2006). Nenhuma destas terapias locais revelou eficácia clínica igual ou superior a cirurgia, radioterapia ou a sua combinação (London & Thamm, 2013).

Kodre *et al.* (2009) demonstrou que a utilização de electroquimioterapia com cisplatina no tratamento local de mastocitoma é uma alternativa eficaz, fácil e segura comparando com a excisão cirúrgica. Esta técnica está especialmente indicada em mastocitomas de pequenas dimensões ou quando não é possível fazer a excisão devido a localização tumoral.

2.2.7 Factores de prognóstico

O prognóstico de mastocitomas é um pouco incerto e multifactorial devido à diversidade de comportamentos biológicos (Kiupel *et al.*, 2005; London & Thamm, 2013), porém existem diversos factores que devem ser considerados pois influenciam o prognóstico. O factor de prognóstico mais relevante e apontado por diversos autores é o grau histopatológico. Mais recentemente descobriram-se marcadores genéticos

imunohistoquímicos que também são bastante relevantes na definição do prognóstico (Welle *et al.*, 2008).

Alguns factores que podem estar associados a um melhor prognóstico são a utilização de um bom controlo local do tumor, tumores com diâmetro inferior a três centímetros, ausência de infiltração ganglionar regional, tratamento dirigido ao gânglio linfático e índice mitótico inferior ou igual a cinco (Hume & Kiupel, 2011; Mullins *et al.*, 2006).

2.2.7.1 Sexo, Idade e Raça

Dentro dos factores de prognóstico, o sexo, não aparenta ter um papel relevante na sobrevida dos cães (Gieger & Theon, 2003), porém segundo alguns autores os machos obtiveram um menor tempo de sobrevida comparativamente às fêmeas. Inclusivamente foi apresentado um estudo no qual fêmeas tratadas com quimioterapia apresentavam um melhor prognóstico comparado com machos (Bostock, 1973; Gerritsen *et al.*, 1998; Kiupel *et al.*, 2005).

Em relação à castração, uma prática bastante comum nos tempos que correm, cães esterilizados parecem ter um menor período de sobrevida (Kiupel *et al.*, 2005).

Em relação à faixa etária, os cães com idade compreendida entre os 8 e os 9 anos apresentam uma menor sobrevida comparativamente com as outras idades, logo um pior prognóstico (Cahalane & Payne, 2004; Michels *et al.*, 2002; Scase, Edwards & Miller, 2006; Sfiligoi & Rassnick, 2005). Os cães com mais idade têm também tendência ao desenvolvimento de mastocitomas múltiplos (Kiupel *et al.*, 2005).

Racialmente os cães de raça Boxer têm tendência para desenvolver mastocitomas cutâneos bem diferenciados, logo com um bom prognóstico. Porém têm também tendência para o desenvolvimento de mastocitomas múltiplos (Bostock, 1973, 1986; Kiupel *et al.*, 2005). Por outro lado os cães de raça Shar-Pei e Labrador Retriever têm tendência para desenvolver mastocitomas cutâneos com comportamento biológico agressivo (Miller, 1995; Murphy & Sparkes, 2006). A raça Golden Retriever pode também ter tendência ao desenvolvimento de mastocitomas cutâneos múltiplos (Murphy & Sparkes, 2006).

A raça Pug tem tendência para o desenvolvimento de mastocitomas múltiplos, porém 96% dos tumores são geralmente de grau I ou II. Num estudo concluiu-se que apenas 12% dos cães desta raça morreram por motivos associados à neoplasia durante o estudo (660 dias). Com isto concluiu-se que nesta raça o comportamento biológico do tumor tende a ser benigno (McNiel, Prink & O'Brien, 2006).

A comparação do sexo e idade com o grau histológico do tumor não revelou diferenças significativas relativamente ao tempo de sobrevida (Patnaik, Ehler & MacEwen, 1984).

2.2.7.2 Tamanho tumoral e taxa de crescimento

A taxa de crescimento tumoral é também apontada como um factor de prognóstico. Tumores de crescimento lento, presentes à pelo menos 7 meses têm por norma um comportamento pouco agressivo (Welle *et al.*, 2008; Withrow & Vail, 2006). Por outro lado tumores com crescimento rápido tendem a ter um comportamento biológico agressivo (Bostock, 1973; Mullins *et al.*, 2006; Withrow & Vail, 2006).

Quanto à dimensão, os tumores com dimensões superiores a 3cm de diâmetro tendem a estar associados a um pior prognóstico (Hahn, King & Carreras, 2004; Mullins *et al.*, 2006; Withrow & Vail, 2006).

2.2.7.3 Localização tumoral e número total de tumores

Num estudo recente que tinha como objectivo a avaliação dos factores de prognóstico em cães com mastocitomas o único factor de prognóstico verificado foi a localização do tumor (Baginski, Davis & Bastian, 2014).

Dentro de todas as localizações, as que apresentam um prognóstico mais reservado são mastocitomas com localização prepucial, escrotal, subungueal, oral e nas mucosas. (London & Thamm, 2013). Este prognóstico é reservado pois cães com mastocitomas nestas localizações apresentam taxas de metastização muito elevadas, entre 59% e 72% (Hillman *et al.*, 2010; Kiupel *et al.*, 2005).

Mastocitomas com localização em mucosas foram associados a um prognóstico desfavorável, com uma taxa de sobrevida de 44% ao fim de um ano e de 30% ao fim de três anos (Thamm, Turek & Vail, 2006). A mucosa conjuntival é uma exceção apresentando bom

prognóstico, independentemente do grau histológico. Mastocitomas com esta localização têm uma taxa de recidiva local pós cirúrgica muito baixa e uma probabilidade de desenvolvimento de tumores à distância também bastante baixa, para além disso não foi registada neste estudo nenhuma morte relacionada com o tumor nesta localização (Fife *et al.*, 2011).

Mastocitomas localizados nos membros, com exceção dos mastocitomas subungueais, têm uma menor taxa de metastização, maior intervalo livre de doença e um maior tempo de sobrevida comparando com mastocitomas com localização no tronco (Turrel *et al.*, 1988). Por outro lado num estudo de 2007, em oito casos de mastocitomas localizados nos dígitos, três dos animais morreram devido a doença metastática, resultando numa sobrevivência de 63% ao fim de dois anos (Wobeser & Kidney, 2007).

Num estudo de 2014 conclui-se que mastocitomas cutâneos na orelha, de grau III, têm uma esperança de vida de 10 meses (Schwab *et al.*, 2014).

Alguns estudos por outro lado afirmam que não existe associação entre a localização cutânea e o prognóstico (Ginn, Fox & Brower, 2000). Mastocitomas na região perineal ou inguinal sempre foram associados a um pior prognóstico, porém alguns autores defendem não haver qualquer diferença estatística entre esta localização e outras localizações no que diz respeito ao prognóstico (Cahalane & Payne, 2004; Sfiligoi & Rassnick, 2005). Um estudo indica mesmo que mastocitomas de grau III localizados na região perineal e prepucial obtiveram um melhor prognóstico comparativamente com outras localizações (Hahn, King & Carreras, 2004).

Alguns autores defendem que cães com massas tumorais múltiplas têm pior prognóstico do que cães com apenas uma massa tumoral logo deve-se aconselhar tratamento adjuvante, para estes casos, para além da excisão cirúrgica (Kiupel *et al.*, 2005). Outros autores defendem que a apresentação tumoral múltipla em nada influencia o prognóstico (Murphy & Sparkes, 2006; Scase, Edwards & Miller, 2006).

Num estudo efetuado para averiguar os factores de prognóstico em cães, com mastocitomas cutâneos múltiplos, tratados cirurgicamente com ou sem tratamento adjuvante concluiu-se que os factores que influenciaram negativamente o período de sobrevida foram: excisão incompleta, local da recidiva, tamanho (maior do que 3cm), sinais clínicos ao momento do diagnóstico e o uso de tratamentos adjuvantes. A presença de sinais clínicos no

momento do diagnóstico foi o único fator de prognóstico negativo no intervalo livre de doença. Com este estudo concluiu-se que os mastocitomas cutâneos múltiplos estão associados a baixas taxas de metastização (15%) e a um bom prognóstico para uma esperança de vida longa (85% de sobrevivência ao fim de 5 anos) desde que seja feita a sua correta excisão (Mullins *et al.*, 2006).

2.2.7.4 Estadiamento clínico

Seguindo a classificação de estadiamento proposta pela OMS, tumores de estadio 0 ou I, têm um prognóstico significativamente melhor comparando com tumores de estadio mais elevado (Sfiligoi & Rassnick, 2005).

Em geral, cães com estadio clínico II, ou seja presença de metástases nos gânglios linfáticos regionais, têm um prognóstico reservado (Hume & Kiupel, 2011). A presença de metástases no momento do diagnóstico diminui significativamente o tempo de sobrevida do animal, refletindo-se numa taxa de mortalidade de cerca de cinco vezes superior à dos cães que não as apresentam (Bonagura & Twedt, 2008; Sfiligoi & Rassnick, 2005). Porém o prognóstico não é obrigatoriamente mau. É possível atingir um intervalo livre de doença e uma sobrevida semelhante ao estadio I ao serem tratados cirurgicamente e com a aplicação de quimioterapia adjuvante (Camps-Palau *et al.*, 2007; Dobson, Cohen & Gould, 2004; Hume & Kiupel, 2011; Rassnick *et al.*, 2010; Thamm, Turek & Vail, 2006).

O estadio tumoral III, presença de tumores múltiplos, é classificado pela OMS como um estadio mais elevado, porém existem alguns estudos que dizem que a presença de tumores múltiplos não apresentam pior prognóstico que tumores únicos quando tratados com quimioterapia (Thamm, Mauldin & Vail, 1999).

Em cães diagnosticados com mastocitoma cutâneo de grau II e com metastização para o gânglios linfáticos regional, não apresentam diferença significativa na esperança de vida comparado com cães que não apresentam metastização para gânglios linfáticos regionais (Baginski, Davis & Bastian, 2014). Outro estudo teve também resultados semelhantes pois a abordagem terapêutica, em cães com metastização ganglionar regional, foi uma terapia trimodal composta por cirurgia, quimioterapia e radioterapia (Hillman *et al.*, 2010).

Cães com evidência citológica de infiltração neoplásica de mastócitos no baço, fígado ou ambos, ou seja estadio IV, têm uma esperança de vida significativamente menor,

logo um pior prognóstico comparando com os outros estádios (Book *et al.*, 2011; Gerritsen *et al.*, 1998; Hume & Kiupel, 2011; Jaffe & Hosgood, 2000; O’Keefe *et al.*, 1987; Sfiligoi & Rassnick, 2005; Stefanello *et al.*, 2009; Vascellari *et al.*, 2013). O tempo médio de sobrevivência nestes casos varia entre 34 a 100 dias (Book, Fidel & Wills, 2011; Stefanello *et al.*, 2009). Num outro estudo, cães que apresentavam metastização no momento do diagnóstico, a taxa de mortalidade foi cerca de cinco vezes superior à dos cães que não as apresentavam (Romansik & Reilly, 2007).

2.2.7.5 Sintomatologia sistémica

A sintomatologia sistémica predominante em mastocitomas são vômitos, ulceração gastrointestinal, anorexia e melena. Estes estão associados a estádios clínicos mais avançados, logo a um pior prognóstico (Mullins *et al.*, 2006; O’Keefe, 1990).

2.2.7.6 Recidivas locais

Vários autores descrevem que animais que desenvolvem recidiva local após excisão cirúrgica apresentam um prognóstico reservado, logo uma diminuição da esperança de vida (Mullins *et al.*, 2006; Séguin *et al.*, 2006; Thamm, Mauldin & Vail, 1999). Assim, uma terapia loco-regional agressiva logo desde do momento do diagnóstico é imprescindível, de modo a tentar evitar ou atrasar a recidiva da neoplasia (London & Thamm, 2013).

O grau histológico nos mastocitomas foi considerado o maior factor de risco para recidiva local (Baker-Gabb, Hunt & France, 2003). Em termos estatísticos os mastocitomas pouco diferenciados têm uma recidiva local em 19% dos casos, 6% de recidiva em mastocitomas moderadamente diferenciados e apenas 0,29% em tumores bem diferenciados (Murphy *et al.*, 2004).

Utilizando a graduação histopatológica de Kiupel *et al.* (2011), tumores de elevado grau recidivaram localmente, após excisão cirúrgica com margens limpas, em 36% dos casos, enquanto que tumores de grau baixo recidivaram em apenas 4% dos casos. Com isto concluiu-se que tumores de elevado grau têm uma maior tendência a recidivar localmente, levando a um maior risco de metastização e uma maior probabilidade de morte associada ao mastocitoma (Donnelly *et al.*, 2013).

2.2.7.7 Grau histológico

Para muitos autores o grau histológico dos mastocitomas é o fator de prognóstico mais relevante e está positivamente correlacionado com o tempo de sobrevivência e a taxa de metastização (Brocks *et al.*, 2008; Gieger & Theon, 2003; Gross *et al.*, 2005; London & Seguin, 2003; Patnaik, Ehler & MacEwen, 1984; Withrow & Vail, 2006). Contudo devido à grande variedade de tipos histopatológicos de grau II existe uma grande dificuldade em emitir um prognóstico (Ozaki *et al.*, 2007).

É importante referir que a classificação histológica, por si só, é incapaz de prever a cem por cento o comportamento biológico dos tumores, principalmente em tumores de grau I e II (Kiupel *et al.*, 2011; Takeuchi *et al.*, 2013). Um bom exemplo desta afirmação é um estudo de Patnaik *et al.* em 1984, no qual cerca de cinquenta por cento dos cães diagnosticados com mastocitoma de grau II estavam vivos ao fim de 1500 dias, enquanto que a outra metade tinha falecido por causas relacionadas com o tumor.

Os tumores de grau elevado têm uma maior probabilidade de metastização, o que está associado a um pior prognóstico. Num estudo três dos cinco cães diagnosticados com mastocitoma cutâneo de grau III desenvolveram metástases, enquanto que apenas um dos oitenta e cinco cães diagnosticados com mastocitoma de grau II e nenhum dos vinte e cinco cães diagnosticados com mastocitoma de grau I desenvolveram metástases (Schultheiss *et al.*, 2011).

A maioria dos mastocitomas de grau I são benignos, têm um crescimento lento, podem persistir durante anos sem aumentar de tamanho, é pouco frequente metastizarem e raramente levam à morte do animal (Patnaik, Ehler & MacEwen, 1984). Num estudo concluiu-se que mastocitomas bem diferenciados têm uma taxa de sobrevivência ao fim de um ano de 100% (mais de 1300 dias) (Murphy *et al.*, 2004).

Por outro lado, os mastocitomas de grau III, tendem a ter um crescimento agressivo e com elevada possibilidade de recidivar. Levam muitas vezes à morte do animal e têm um grande potencial de metastização (Schwab *et al.*, 2014; Welle *et al.*, 2008). Um estudo aponta que a taxa de sobrevivência ao fim de um ano de 46% (média de 278 dias) (Murphy *et al.*, 2004).

Os mastocitomas de grau II têm um prognóstico muito variável. A maior parte destes são tratados apenas com cirurgia e acabam por metastizar em apenas 5 a 22% dos casos. As

taxas de mortalidade variam entre 17-56% principalmente devido a falhas de tratamento ou a doença metastática (Welle *et al.*, 2008). Num estudo concluiu-se que estes mastocitomas têm uma taxa de sobrevida ao fim de um ano de 92% (mais de 1300 dias) (Murphy *et al.*, 2004).

Em 2011 Kiupel *et al.* propuseram um novo sistema de classificação histológica de mastocitomas. Durante o estudo propuseram também que mastocitomas de elevado grau apresentam um menor tempo de sobrevida do que mastocitomas de menor grau, para além de terem um maior risco de desenvolverem novas lesões tumorais. Em média mastocitomas de elevado grau têm uma sobrevida de 4 meses enquanto que mastocitomas de baixo grau obtiveram uma sobrevida média superior a 2 anos. O risco de mortalidade em mastocitomas de elevado grau foi 53,8 vezes maior do que em mastocitomas de baixo grau (Kiupel *et al.*, 2011).

Num estudo, aquando do diagnóstico, 22% dos cães com mastocitoma de grau II apresentavam metastização ganglionar regional enquanto que cães com mastocitoma de grau III apresentavam metastização ganglionar em 48% dos casos. Este achado tem uma grande relevância prognóstica visto que a metastização ganglionar está associada a um pior prognóstico (Krick & Billings, 2009).

2.2.7.8 Índice mitótico

O índice mitótico (IM) é um elemento de avaliação de inúmeras histopatologias e por isso deve ser incluído em todos os relatórios histopatológicos (Blackwood *et al.*, 2012). Este pode ser definido como a contagem média do número de mitoses em 10 campos de grande ampliação (400x) em preparações histológicas coradas com hematoxilina-eosina (Thompson *et al.*, 2011).

O índices de proliferação celular pode ser indicativo de uma maior probabilidade de recidiva dos mastocitomas após excisão incompleta (Séguin *et al.*, 2006). Foi proposto que um IM superior a 7 pode ser um factor preditivo de recidiva tumoral (Kiupel *et al.*, 2011).

Para alguns autores o IM factor de prognóstico tão ou mais importante que o grau histológico, afirmando que cães com IM inferior a 5 apresentam uma maior sobrevida comparativamente com cães com IM superior a 5 independentemente do grau histológico (Romansik & Reilly, 2007).

2.2.7.9 Excisão completa vs excisão incompleta

Nos trinta meses pós-operatórios, os cães com mastocitomas de grau II incompletamente excisados revelaram uma maior taxa de recidiva e/ou metastização e uma maior taxa de mortalidade do que nos casos de excisão completa (Ozaki *et al.*, 2007).

Podemos esperar uma taxa de recidiva de 45%, sendo mais frequente em excisões com margens positivas e infiltradas do que em excisões com margens limpas. A avaliação histológica das margens é útil para prever a recidiva local de tumores cutâneos malignos em cães tratados apenas com excisão cirúrgica (Scarpa *et al.*, 2012).

Outros autores propuseram que a presença de margens infiltradas ou limpas não tem relação com recidiva local ou com tempo de sobrevida (Schwab *et al.*, 2014) ou que apenas uma minoria dos mastocitomas com excisão incompleta recidivam, por isso a terapia local adjuvante pode não ser sempre necessária (Séguin *et al.*, 2006).

Murphy *et al.* (2004) propôs que margens cirúrgicas amplas não são um pré-requisito para um desfecho de sucesso a longo prazo em cães com mastocitomas cutâneos bem diferenciados.

2.2.7.10 AgNORs (Regiões organizadores nucleolares argirófilas)

As AgNORs estão envolvidas na transcrição dos ácidos ribonucleicos (ARN) ribossomais (Derenzini, 2000). A contagem dos mesmos tem sido utilizada de modo a prever prognóstico dos mastocitomas, sendo que por norma os tumores pouco diferenciados apresentam contagens mais elevadas de AgNORs (Bostock & Crocker, 1989; Kravis & Vail, 1996; Scase, Edwards & Miller, 2006; Simoes, Schoning & Butine, 1994). Os tumores com valores elevados de AgNORs estão positivamente correlacionados com uma elevada mortalidade, alta incidência de recidiva local e ocorrência de metástases (Blackwood *et al.*, 2012; Scase, Edwards & Miller, 2006; Simoes, Schoning & Butine, 1994; Welle *et al.*, 2008). Por outro lado contagem menores parecem ser indicativas de um período de sobrevida maior (Blackwood *et al.*, 2012). Apesar do valor de prognóstico da contagem de AgNORs, esta não está relacionada com o comportamento clínico, sendo este imprevisível (Scase, Edwards & Miller, 2006; Simoes, Schoning & Butine, 1994).

O valor prognóstico da contagem de AgNORs não é independente do grau histológico, porém pode contribuir para a decisão da abordagem terapêutica de mastocitomas de grau II (Blackwood *et al.*, 2012).

2.2.7.11 PCNA (Antigénio proliferativo celular nuclear)

O PCNA é uma proteína indispensável na síntese do ácido desoxirribonucleico (ADN), esta em conjunto com a ADN polimerase age como factor auxiliar na replicação e reparação do ADN. Para além dessa função a sua expressão está associada com a proliferação celular (Welle *et al.*, 2008).

A elevada expressão de PCNA parece estar ligada a um aumento da taxa de mortalidade (Simoes, Schoning & Butine, 1994; Webster *et al.*, 2007). A expressão de PCNA é significativamente maior quer em mastocitomas recidivantes como em mastocitomas metastáticos, não sendo independente do grau histológico (Abadie, 1999; Simoes, Schoning & Butine, 1994). Scase *et al.* em 2006 afirma que a expressão de PCNA em nada está associada com o tempo de sobrevida.

A combinação dos resultados de Ki-67 e PCNA foram considerados como prognóstico para recidiva local (Séguin *et al.*, 2006).

2.2.7.12 Ki-67

Sendo um marcador de proliferação celular, produzida durante o ciclo celular, esta proteína pode ser detectada por imunohistoquímica (Webster *et al.*, 2007). A expressão desta proteína está diretamente relacionada com a capacidade proliferativa do tumor e deste modo pode ser usada como factor de prognóstico independentemente do grau histológico (Abadie, 1999; Scase, Edwards & Miller, 2006).

A elevada expressão de Ki-67 está associada a um aumento da mortalidade, recidiva e metastização. Cães com mastocitomas de grau II podem ser divididos em dois grupos de prognóstico diferente dependendo da quantificação de Ki-67, sendo expectável tempos de sobrevida diferentes. Mastocitomas de grau II com contagens de Ki-67 inferiores a 1,8 têm um prognóstico significativamente melhor comparando com mastocitomas de grau II com contagens superiores a 1,8 (Ozaki *et al.*, 2007; Scase, Edwards & Miller, 2006).

A avaliação do Ki-67 deverá ser utilizada em casos em que outros factores como o aspecto e a rapidez de crescimento do tumor não sejam coerentes com o valor do índice mitótico. Por outro lado esta avaliação é irrelevante caso se trate de um tumor de grau I, III ou em casos em que o tumor já se encontre metastizado (Berlato *et al.*, 2013).

2.2.7.13 c-kit

A presença de mutações do c-kit é visível em 15% a 40% dos mastocitomas caninos (Welle *et al.*, 2008). A sua presença está associada a um pior prognóstico, elevada probabilidade de metastização, recidiva local e a um elevado índice de proliferação celular (Kiupel *et al.*, 2004; Zemke, Yamini & Yuzbasiyan-Gurkan, 2002).

Foi sugerida uma nova classificação dos mastocitomas caninos tendo em conta a imunomarcção para o c-kit. Nesta os mastocitomas seriam divididos em três categorias dependendo da localização do c-kit. No padrão I ou padrão membranar apresenta marcação membranar e marcação citoplasmática mínima. No padrão II ou padrão citoplasmático focal os mastócitos apresentam uma marcação citoplasmática focal ou pontilhada. Por último, no padrão III ou padrão difuso os mastócitos apresentam uma marcação citoplasmática difusa podendo não ser visível as restantes características citoplasmáticas. Nos padrões II e III é esperada uma elevada taxa de recidiva local e a um menor tempo de sobrevida (Kiupel *et al.*, 2004).

Num estudo de Takeuchi *et al.* (2013) não foi observada qualquer relação entre a presença de mutações no gene c-kit e o grau histológico nem com o prognóstico.

2.2.7.14 Mutação p53

O gene supressor tumoral p53 é um dos genes mais estudados e que está mais associado à tumorigénese de mastocitomas. Os mastocitomas de grau III apresentam elevadas marcações deste gene mutado comparativamente com mastocitomas de grau I e II (Jaffe & Hosgood, 2000). Apesar de alguns estudos indicarem que o aparecimento dos mastocitomas pode estar relacionado com a mutação do gene p53, esta não apresentou nenhuma relação com a sobrevida dos animais ou com a capacidade de recidiva local. Concluiu-se então que a mutação do gene p53 é um mau indicador de prognóstico para os mastocitomas nos cães (Ginn, Fox & Brower, 2000; Jaffe & Hosgood, 2000).

2.2.7.15 Densidade microvascular

A densidade microvascular deve ser tida em conta como factor de prognóstico quanto à previsão da sobrevida. Porém não é considerado como factor de prognóstico para o intervalo livre de doença (Scase, Edwards & Miller, 2006). O desenvolvimento de microcirculação é um requisito básico para a expansão, disseminação e metastização tumoral (Preziosi, Sarli & Paltrinieri, 2004).

2.2.8 Relação entre a inflamação cutânea crónica e o desenvolvimento de mastocitomas

Pode ocorrer um aumento do número de mastócitos cutâneos, mastocitose, numa grande diversidade de processos, como por exemplo no tecido de granulação, neurofibromas, urticária pigmentosa, dermatites atópicas, entre outros. Durante os processos inflamatórios agudos o número de mastócitos é diminuto, enquanto que em processos inflamatórios crónicos os mastócitos estão presentes em maior número. Por outro lado nas dermatites quer sejam agudas ou crónicas o número de mastócitos é bastante elevado (Orkin & Schwartzman, 1959).

Há também hipersecreção de mediadores inflamatórios pelos mastócitos em diversos distúrbios cutâneos caninos como a dermatite atópica e a alergia à picada da pulga (Hammerberg, Olivry & Orton, 2001). As raças que mais comumente desenvolvem dermatites atópicas são o Golden Retriever, Labrador Retriever, West Highland White Terrier. Também os Springer Spaniels, Shar Peis, Bull Terriers, Bichons Frisés, e os Tibetan Terriers são apontados como raças de risco elevado (Zur *et al.*, 2002). Coincidentemente muitas destas raças estão também predispostas ao desenvolvimento de mastocitomas. As regiões que são mais afectadas pela dermatite atópica são as extremidades distais, orelhas, abdómen, orelhas e face (Gross *et al.*, 2005). Estas regiões, dado possuírem pouco pêlo, são mais afectadas pela dermatite por contacto com substância irritantes (Scott *et al.*, 2001).

Em situações de infecção e inflamação pode ocorrer a sobre-expressão de IL-4 e IL-10. Esta sobre-expressão pode resultar no desenvolvimento de inflamação crónica, devido ao aumento dos sinais clínicos e estimulação contínua à produção de mediadores inflamatórios (Lin & London, 2010).

A teoria que aponta para uma relação entre a inflamação crónica e o desenvolvimento tumoral teve origem na constatação que várias neoplasias aparecem em localizações constantemente sujeitas a infeções e inflamações, como forma de defesa do hospedeiro (Coussens & Werb, 2001).

Infeções persistentes levam ao desenvolvimento de inflamação crónica. Neste processo várias células fagocitárias são chamadas ao local e durante o processo de combate à infecção produzem várias formas de oxigénio e nitrogénio reativos, que reagem entre si produzindo peróxido nitroso, que induz danos ao nível do ADN das células proliferativas. Estes danos podem levar a alterações genómicas permanentes, mutações pontuais, deleções e rearranjos. Um dos casos mais estudados é a infecção por *Helicobacter pylori*, na qual existe uma probabilidade de 75% de desenvolvimento de tumor gástrico, após a infecção por este agente (Coussens & Werb, 2001).

Transpondo esta teoria para os mastocitomas, zonas com inflamações e infeções crónicas, quer devido a agressões, traumatismos e parasitismos ou atopias podem estar mais predispostos ao desenvolvimento de mastocitomas cutâneos.

Vários estudos já demonstraram que tal como os mastócitos normais, algumas linhas celulares de mastocitomas libertam importantes mediadores de inflamação quando expostas a estímulos antigénicos e químicos (Lin & London, 2010).

Uma das enzimas mais relevante na síntese dos mediadores de inflamação que podem ser secretados é a COX-2. Esta pode ser libertada em resposta a certos estímulos, como a presença de citocinas, factores de crescimento, endotoxinas bacterianas e oncogenes. Este mediador foi detectado em grandes quantidades em neoplasias e tem sido associado a mecanismos de promoção tumoral, através da indução de angiogénese, inibição de apoptose, modulação de inflamação e da reposta imune (Coussens & Werb, 2001).

2.2.8 Acompanhamento

Devido ao intervalo livre de doença e a taxas de recidiva local muito semelhante entre margens cirúrgicas quase limpas e infiltradas é aconselhado um acompanhamento pós-cirúrgico contínuo com duração de 2 anos (Scarpa *et al.*, 2012).

3. Estudo Retrospectivo

3.1 Objectivos

Este estudo tem como objetivo a caracterização de casos de 40 diagnosticados com mastocitomas cutâneos.

Como objetivos específicos pretende-se: a) realizar estatística descritiva da distribuição dos casos (sexo, idade, raça, localização e tamanho tumoral, historial de afecções dermatológicas, achados histopatológicos, terapias adjuvantes, sobrevida, recidivas e metastizações); b) estudar a possível associação entre inflamação cutânea crónica com características da doença tais como determinantes intrínsecos como o sexo, características da história clínica, e a sobrevida do animal; c) avaliar a relação entre o grau histológico do tumor e a sobrevida dos pacientes.

3.2 Material e métodos

Numa primeira abordagem foi realizado o levantamento de dados nos arquivos do Hospital Veterinário Central da Linha de Cascais (VetOeiras) e do Centro Veterinário Berna. Os dados obtidos para a realização deste estudo foram colhidos de casos admitidos entre Março de 2011 e Maio de 2015. No total foram recolhidos cerca 80 casos. Foram incluídos neste primeiro grupo cães, de todas as idades e de ambos os sexos, aos quais, durante uma consulta de rotina, foram detectadas massas cutâneas. Na presença de uma massa cutânea um dos diagnósticos diferenciais que tem de ser tido em conta é mastocitoma e daí o grande número de casos inicialmente.

Posteriormente foram analisados todos os relatórios histopatológicos disponíveis e foram seleccionados todos os cães que tinham sido sujeitos a ressecção cirúrgica ou biópsia excisional das massas tumorais e aos quais tinha sido diagnosticado por análise histopatológica mastocitoma cutâneo. Esta análise levou a uma redução em cerca de 50% dos casos totais recolhidos de início pois muitos ou não apresentavam relatório histopatológico ou não foram sujeitos a excisão cirúrgica. O critério de inclusão foi a existência de relatório histopatológico comprovativo que o paciente padecia de mastocitoma cutâneo canino.

A partir desta seleção desenvolveu-se uma base de dados com todos os dados disponíveis nos relatórios de histopatologia (dimensões da massa, ulceração, fixação à pele e

ao músculo, infiltração no gânglio linfático regional, excisão completa ou incompleta, numero de mitoses e grau histológico) e dados das fichas clínicas (idade, sexo, raça, neoplasias anteriores, história de inflamação cutânea crónica (foram englobadas as histórias de otites crónicas, atopia, alergias alimentares com manifestações cutâneas e patologias cutâneas sem diagnostico definitivo (PCSDD)), localização da massa, terapias adjuvantes, sobrevida, recidiva e metastização).

Devido a tratar-se de uma recolha de dados retrospectivos apenas 40 casos, dos 80 seleccionados no grupo inicial, seguiram para análise estatística devido a possuírem poucos parâmetros analisáveis ou não se incluírem no grupo de estudo objectivo (animais diagnosticados por análise histopatológica pós excisão cirúrgica).

3.3 Análise estatística

Os dados foram registados e processados através do software Microsoft® Excel 2011 e IBM® SPSS (Statistical Package for the Social Sciences). As variáveis analisadas estão descritas na Tabela III, estando relatadas as respectivas categorias e unidades. Foram utilizados métodos descritivos univariados para o cálculo da distribuição de frequências e medidas de síntese de modo a caracterizar a amostra estudada. De modo a investigar possíveis associações entre as diferentes variáveis categóricas, foram utilizados os testes qui-quadrado de Pearson, o teste exacto de Fisher, teste de Shapiro-Wilk e teste t. Todos os testes estatísticos foram realizados com base no nível de significância de 5%.

Tabela III - Variáveis e respectivas categorias

Variável	Categoria
Idade	Anos
Sexo	Macho ou Fêmea
Raça	Raça
Neoplasias anteriores	Sim, Não ou S/ Informação
História clínica de inflamação cutânea crónica	Sim, Não ou S/ Informação
PCSDD	Sim, Não ou S/ Informação
Alergias alimentares	Sim, Não ou S/ Informação
Atopias	Sim, Não ou S/ Informação
Otitis crónicas	Sim, Não ou S/ Informação
Localização	Flanco, Membro, Inguinal, Perianal, Torácico, Multiplo, Perivulvar, Mamário, Escrotal, Craniano, Auricular, Prepucial
Dimensão da massa tumoral	Centímetros
Ulceração	Sim ou Não
Fixação à pele	Sim ou Não
Invasão no gânglio linfático regional	Sim, Não ou S/Informação
Excisão	Completa ou Incompleta
Grau histológico	I, II ou III
Sobrevida aos 12 meses	Sim, Não ou S/Informação
Sobrevida aos 24 meses	Sim, Não ou S/Informação
Recidiva	Sim, Não ou S/Informação
Metastização	Sim, Não ou S/Informação

3.4. Resultados

3.4.1. Caracterização dos pacientes

A série era composta por 40 cães com idade média de 8,4 anos com intervalo de confiança de 95% (idade compreendida entre os 4 e os 14 anos). A figura I demonstra a distribuição das idades dos pacientes.



Figura 1 - Distribuição de idades dos pacientes

Cerca de 42,5% dos casos (n=17) da série eram machos, sendo a maioria (n=23) dos pacientes da série fêmeas, 57,5% dos casos. A raça mais predominante neste estudo foram os Labrador Retriever representando cerca de 35% dos pacientes (n=14), seguindo-se os cães de raça Boxer com 15% (n=6) e os cães sem raça determinada com 12,5% (n=5), as restantes raças são apresentadas na tabela IV.

Tabela IV - Distribuição das raças no grupo de estudo

Raça	Frequência	Porcentagem
Beagle	2	5,0%
Bouvier de Flandes	1	2,5%
Boxer	6	15,0%
Golden Retriever	3	7,5%
Griffon	1	2,5%
Labrador Retriever	14	35,0%
Pitbull	2	5,0%
Podengo Português	1	2,5%
Rottweiler	2	5,0%
Sem Raça Definida	5	12,5%
Starfforshire Terrier	1	2,5%
Weimaraner	1	2,5%
Yorkshire Terrier	1	2,5%
Total	40	100%

No que diz respeito distúrbios dermatológicos, mais de metade, 55% (n=22), apresentava história de inflamação cutânea crônica. Cerca de 40% (n=16) dos pacientes tinham reportados PCSDD, 25% dos pacientes (n=10) tinham diagnóstico prévio de otite, 17,5% dos pacientes tinham diagnóstico prévio de alergias alimentar (n=7) e 15% dos pacientes tinham diagnóstico prévio de atopia (n=6) dos casos (Tabela V).

Ainda relativamente à história clínica, 17,5% (n=7) dos animais já tinha sido diagnosticado com neoplasia anteriormente.

Tabela V - História clínica dermatológica pregressa dos pacientes com mastocitoma

História clínica	Frequência	Porcentagem
História clínica de inflamação cutânea crônica	22	55%
PCSDD	16	40%
Alergias alimentares com manifestações cutâneas	7	17,5%
Atopia	6	15%
Otite crônica	10	25%

3.4.2. Caracterização clínica dos tumores

Em termos da localização dos mastocitomas cutâneos as mais comumente encontradas foram os membros em 22,5% (n=9) e tórax também em 22,5% dos pacientes (n=9) (Tabela VI).

Tabela VI - Caracterização da distribuição

Localização	Frequência	Porcentagem
Craniano	1	2,5%
Escrotal	1	2,5%
Flanco	4	10,0%
Inguinal	2	5,0%
Mamário	3	7,5%
Membro	9	22,5%
Múltiplo	5	12,5%
Pavilhão auricular	1	2,5%
Perianal	2	5,0%
Perivulvar	1	2,5%
Prepucial	1	2,5%
Torácico	9	22,5%
Sem registo	1	2,5%
Total	40	100,0%

Em relação ao tamanho médio dos tumores, nos casos em que os dados foram registados (n=30), 43,3% (13/30) dos tumores tinham um diâmetro superior a 3cm. O maior diâmetro médio foi de 3,4 cm com I.C 95% [2,62-4,15] e o menor diâmetro médio foi de 2,67 cm com I.C 95% [2,05-3,29] (Figura 2).

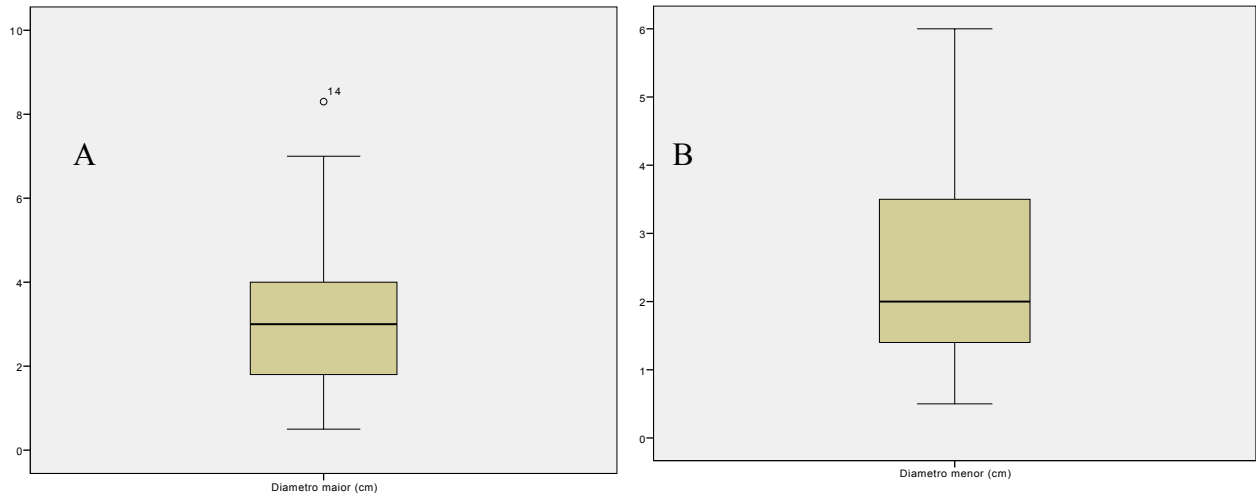


Figura 2 - Tamanho dos tumores. A) Distribuição do diâmetro maior das massas. B) Distribuição do diâmetro menor das massas

Cerca de 32,5% (n=13) dos tumores encontravam-se ulcerados. A grande maioria 92,5% (n=37) encontravam-se fixos à pele e apenas 5% (n=2) encontravam-se fixos ao músculo (Tabela VII).

3.4.3. Caracterização histológica dos tumores

Em relação ao modo de crescimento, 5% (n=2) invadiam vasos, a maioria 80% (n=32) eram invasivos ultrapassando a cápsula, e apenas 15% (n=6) foram considerados expansivos.

Em relação ao grau histológico, a maioria, 52,7% (n=21) dos casos foram classificados como mastocitomas de grau II, seguidos de 25% dos casos (n=10) mastocitomas de grau histológico III e finalmente 17,5% (n=7) dos casos foram classificados como

mastocitomas de grau histológico I. Apenas um caso foi classificado como II/III, existindo um outro caso sem registo de grau histológico no relatório histopatológico (Tabela VII).

No que concerne a excisão, verificou-se que em 45% (n=18) dos casos esta foi considerada como completa (Tabela VII).

Em relação à metastização nos gânglios linfáticos regionais, dentro dos casos em que esta foi estudada, foi encontrada invasão em 16,7% (n=5) dos pacientes e em 83,3% (n=25) dos casos não existia invasão dos gânglios linfáticos regionais. Em 25% (n=10) do total de casos esta não foi investigada (Tabela VII).

Tabela VII - Caracterização histopatológica dos tumores

Caracterização histopatológica	Frequência	Percentagem	
Grau histológico	I	7	17,5%
	II	21	52,5%
	III	10	25,0%
	Sem classificação	2	5,0%
Ulceração	Presente	13	32,5%
	Ausente	27	67,5%
Fixação à pele	Presente	37	92,5%
	Ausente	3	7,5%
Fixação ao músculo	Presente	2	5,0%
	Ausente	38	95,0%
Infiltração nos gânglios linfáticos regionais	Presente	5	12,5%
	Ausente	25	62,5%
	Não estudada	10	25,0%
Excisão	Completa	18	45,0%
	Incompleta	22	55,0%

3.4.4. Acompanhamento pós cirúrgico e sobrevida

Cerca de 60% (n=24) dos animais sobreviveu aos primeiros 12 meses após excisão e 58,3% (n=14) dos que sobreviveram aos primeiros 12 meses permaneceram vivos até aos 24 meses. Ocorreu recidiva local em 37,5% (n=15) dos casos, tendo sido relatado uma taxa de metastização/aparecimento de novas massas de 40%.

No que diz respeito a tratamentos pós cirúrgicos cerca de 65% (n=26) dos pacientes foram submetidos a terapias adjuvantes (Tabela VIII). O quimioterápico mais utilizado foi a vinblastina, em 57,5% (n=23) dos casos, sendo administrada semanalmente na maioria dos casos (75% (n=14)), ou quinzenalmente (35% (n=7)). A prednisolona foi aplicada em 47,5% (n=19) sendo na maioria dos casos administrada diariamente. Outros fármacos quimioterápicos utilizados foram a lomustina (n=5), Masivet® (n=6) e Palladia® (n=2).

Tabela VIII - Terapia adjuvante

Terapia adjuvante	Frequência	Percentagem	Protocolo maioritário
Vinblastina	23	57,5%	Semanalmente
Prednisolona	19	47,5%	Diariamente
Lomustina	5	12,5%	-
Masivet®	6	15,0%	-
Palladia®	2	5,0%	-
Imunoterapia	1	2,5%	-

4. Associações entre a inflamação cutânea crónica, determinantes intrínsecos e história progressa em pacientes com mastocitoma

Em relação à idade e ao historial de inflamação cutânea crónica, comparou-se as idades entre os animais (Figura 3).

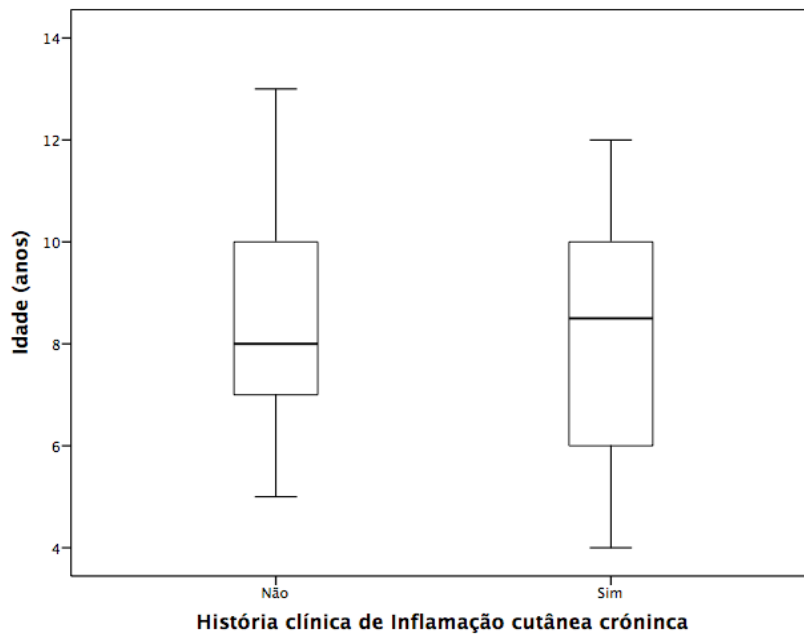


Figura 3 - Associação entre a história clínica de inflamação cutânea crónica e a idade

Os pacientes com mastocitoma que possuem inflamação cutânea crónica na sua história clínica, aparentam ter uma média de idade inferior (8,1 anos; desvio padrão (s)=2,54) aos que não têm (8,5 anos; s=2,15). No entanto estas diferenças não foram estatisticamente significativas ($p=0,572$) de acordo com o teste t para amostras independentes executado após a verificação da normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk.

Tentou-se investigar uma possível relação entre a inflamação cutânea crónica com determinantes intrínsecos como o sexo e dados da história pregressa nos pacientes com mastocitomas. Como seria de esperar, existe uma relação altamente significativa entre a história pregressa de PCSDD ($p<0,001$) e otite ($p=0,001$), que são encontrados não só isoladamente em, respectivamente, 8 e 5 pacientes como também concomitantemente em 5 pacientes. Existe uma relação estatisticamente significativa entre a história pregressa de atopia (reportada isoladamente em apenas um paciente) e inflamação cutânea crónica ($p=0,019$). Do mesmo modo existe uma relação estatisticamente significativa entre história pregressa de alergia alimentar e inflamação cutânea crónica ($p=0,01$). Esta foi reportada isoladamente em apenas 1 paciente sendo que nos restantes pacientes foi reportada concomitantemente com atopia generalizada em 5 pacientes e otite em 4 pacientes.

Tabela IX - Associação entre inflamação cutânea crônica e variáveis categóricas

		História clínica de inflamação cutânea crônica				Qui-quadrado
		Não		Sim		Valor de p
		n	%	n	%	
Sexo	Fêmea	10	43,5%	13	56,5%	0,987
	Macho	7	43,8%	9	56,3%	
Neoplasias anteriores	Não	14	42,4%	19	57,6%	0,731
	Sim	3	50,0%	3	50,0%	
Atopia	Não	17	51,5%	16	48,5%	0,019
	Sim	0	0,0%	6	100,0%	
PCSDD	Não	17	73,9%	6	26,1%	<0,001
	Sim	0	0,0%	16	100,0%	
História de otites	Não	17	58,6%	12	41,4%	0,001
	Sim	0	0,0%	10	100,0%	
Alergias alimentares	Não	17	53,1%	15	46,9%	0,01
	Sim	0	0,0%	7	100,0%	

Pela aplicação do teste de Qui-quadrado (validado pelo teste Exacto de Fisher para tabelas 2x2) que a história de neoplasias anteriores e o sexo não possuem relação estatisticamente significativa com a inflamação cutânea crônica (valor de $p > 0,05$).

Não foi possível efetuar o teste de Qui-quadrado ou o teste exacto de Fisher para a raça e para as localizações - uma vez que as tabelas de contingências geradas apresentavam frequências esperadas menores que 5 em mais de 20% das células, uma condição para aplicabilidade do teste estatístico de Qui-quadrado.

4.1. Avaliação da relação entre a história de inflamação cutânea crônica e a sobrevida em pacientes com mastocitomas

Apesar dos resultados não serem estatisticamente significativos, a maioria dos pacientes vivos aos 12 meses (72,7%) e aos 24 meses (71,4%) tinham história clínica de inflamação cutânea crônica. No entanto, através da utilização do teste exacto de Fisher concluiu-se que não existe relação entre ter inflamação cutânea crônica e a sobrevida aos 12

meses (valor de $p=0,352$). De forma semelhante, o teste sugere que não existe relação estatística entre ter inflamação cutânea crónica e estar vivo aos 24 meses (valor de $p=0,383$).

Tabela X - Associação entre a história clínica de inflamação cutânea crónica e a sobrevida

		História Clínica de Inflamação Cutânea Crónica				Teste Exacto de Fisher Valor de p
		Não		Sim		
		n	%	n	%	
Sobrevida 12 meses	Não	3	50,0%	3	50,0%	0,352
	Sim	6	27,3%	16	72,7%	
Sobrevida 24 meses	Não	5	55,6%	4	44,4%	0,383
	Sim	4	28,6%	10	71,4%	

4.2 Avaliação da relação entre a história de inflamação cutânea crónica e o grau histológico dos mastocitomas

Em relação à avaliação da inflamação cutânea crónica face ao grau histológico dos mastocitomas verificou-se um menor número de casos com história clínica reportada de inflamação cutânea crónica em grau histológico de mastocitoma mais elevado.

Tabela XI - Relação entre o grau histológico e a história clínica de inflamação cutânea crónica

Grau Histológico	História Clínica de Inflamação Cutânea Crónica			Total
	Não	Sim		
I	n	2	5	7
	%	28,6%	71,4%	100,0%
II	n	8	13	21
	%	38,1%	61,9%	100,0%
III	n	6	4	10
	%	60,0%	40,0%	100,0%
Total	n	16	22	38
	%	42,1%	57,9%	100,0%

Não foi, no entanto, possível efetuar o teste de Qui-quadrado ou o teste Exacto de Fisher para averiguar se grau histológico tem relação com a história clínica de inflamação

uma vez que as tabelas de contingências geradas apresentavam frequências esperadas menores que 5 em mais de 20% das células, condição para aplicabilidade do teste estatístico de Qui-quadrado.

5. Avaliação do grau histológico

Na caracterização do grau histológico, verificou-se que a maior proporção de massas ulceradas ocorreu em mastocitomas de grau III, afectando 60% (n=6) dos cães com mastocitomas deste grau. Em relação a estar fixo à pele e ao músculo o grau III também apresenta maiores proporções, afectando 100% (n=10) e 10% (n=1) respectivamente. O grau histológico III não foi aquele em que se verificou maior número de casos com invasão linfática regional (Tabela XII).

Tabela XII - Avaliação do grau histológico

Grau Histológico		I		II		III	
		n	%	n	%	n	%
Ulcerado	Não	6	85,7%	16	76,2%	4	40,0%
	Sim	1	14,3%	5	23,8%	6	60,0%
Fixo à pele	Não	1	14,3%	2	9,5%	0	0,0%
	Sim	6	85,7%	19	90,5%	10	100,0%
Fixo ao músculo	Não	7	100,0%	20	95,2%	9	90,0%
	Sim	0	0,0%	1	4,8%	1	10,0%
Infiltração gânglios linfáticos	Não estudado	2	28,6%	5	23,8%	3	30,0%
	Não	4	57,1%	13	61,9%	6	60,0%
	Sim	1	14,3%	3	14,3%	1	10,0%
Excisão	Completa	5	71,4%	11	52,4%	2	20,0%
	Incompleta	2	28,6%	10	47,6%	8	80,0%

Não foi possível no entanto calcular o teste de Qui-Quadrado (tabelas de contingências geradas apresentavam frequências esperadas menores que 5 em mais de 20% das células).

5.1 Avaliação entre o grau histológico e a sobrevida

Em relação a sobrevida face ao grau histológico, o grau III apresenta a menor expectativa de sobrevida aos 12 meses (60%; n=3) e aos 24 meses (33,3%; n=1). Já o grau histológico II apresenta a maior expectativa de vida aos 12 meses, estando 83,3% dos animais vivos ao fim de um ano. Os animais diagnosticados com mastocitoma de grau histológico I foram os que mais frequentemente atingiram a sobrevida aos 24 meses com uma taxa de sobrevivência de 75% (Tabela XIII).

Tabela XIII - Avaliação entre o grau histológico e a sobrevida

Grau Histológico		I		II		III	
		n	%	n	%	n	%
Sobrevida 12 meses	Não	1	20,0%	3	16,7%	2	40,0%
	Sim	4	80,0%	15	83,3%	3	60,0%
Sobrevida 24 meses	Não	1	25,0%	5	33,3%	2	66,7%
	Sim	3	75,0%	10	66,7%	1	33,3%

Não foi possível no entanto calcular o teste de Qui-Quadrado pelas razões enunciadas (tabelas de contingências geradas apresentavam frequências esperadas menores que 5 em mais de 20% das células).

5. Modelo de sobrevida

De seguida apresenta-se um modelo logístico com o objectivo de explicar a sobrevida.

Tabela XIV - Modelo de sobrevida comparando o grau histológico e a história clínica de inflamação cutânea crónica

Variáveis	B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95% C.I. para EXP(B)	
							Inferior	Superior
Hist. Clínica								
Inf. Cutânea Crónica								
Grau I	-	-	1.253	2	.534	-	-	-
Grau II	0.491	1.543	0.101	1	0.751	1.633	0.079	33.609
Grau III	1.271	1.158	1.205	1	0.272	3.565	0.368	34.506
Constante	-0.262	1.124	0.054	1	0.816	0.770	-	-

No modelo que considerava apenas as variáveis de grau histológico e de inflamação cutânea crónica o grau II apresenta até 1,6x mais risco de morrer e o grau III 3,5x, porém nenhum destes resultados é estatisticamente significativo.

7. Discussão

A prevalência de neoplasia nos animais domésticos tem vindo a aumentar sendo atualmente a principal causa de morte entre os cães. Este aumento deve-se a uma maior esperança de vida por uma maior convivência com o homem (Withrow & Vail, 2006). A pele é o local com maior prevalência de neoplasias nos canídeos (Maxie, 2007). Qualquer tumor tem um potencial maligno, por isso deve-se recorrer a exames citológicos e histológicos para se poder tomar a melhor opção terapêutica (Meuten, 2008).

Os mastocitomas são uma proliferação neoplásica de mastócitos e constituem o tipo de tumor cutâneo mais comum no cão (Withrow & Vail, 2006). A etiologia do mastocitoma ainda não está bem elucidada porém estudos recentes apontam para mutações na proteína p53 e sobreexpressão de c-kit (Turin *et al.*, 2006; Webster *et al.*, 2007; Wu, Hayashi & Inoue,

2004). O aspecto macroscópico deste tumor raramente é típico, porém está descrito como uma lesão dermoepidérmica em forma de cúpula, com alopecia e eritema local. Após um pequeno traumatismo no tumor pode ocorrer eritema e formação de erupção cutânea, esta reação tem o nome de Sinal de Darier e pode ajudar no diagnóstico do mastocitoma (Nelson & Couto, 2011; Withrow & Vail, 2006). Os principais sintomas associados aquando do envolvimento sistémico são emese, hematemesa, anorexia, melena e anemia. Os mastocitomas podem ocorrer como nódulos solitários ou múltiplos em 10 a 15% (London & Seguin, 2003). O diagnóstico normalmente é efectuado através de exame citológico, histopatológico e sinais clínicos (Johnson *et al.*, 2002; Rech *et al.*, 2004). A PAAF (punção aspirativa por agulha fina) por ser um método pouco invasivo, de baixo risco para o paciente, de reduzida perturbação da neoplasia é um ótimo meio de ajuda ao diagnóstico (Meuten, 2008). Durante a análise citológica, após punção, podem-se visualizar eosinófilos, células mesenquimatosas e um material amorfo e rosado que possivelmente corresponde a colagénio degenerado (Withrow & Vail, 2006). Os mastocitomas podem ser tratados por excisão cirúrgica, radioterapia e quimioterapia, sendo os dois primeiros potencialmente curativos (Nelson & Couto, 2011).

É uma neoplasia de grande relevância devido à sua elevada incidência, sendo mais comum em animais de meia idade a geriátricos, raças braquiocefálicas (Nelson & Couto, 2011), não existindo aparentemente predisposição sexual (Withrow & Vail, 2006). Neste estudo a distribuição da idade dos pacientes foi entre os 4 e os 14 anos, sendo que a média da detecção dos mastocitomas foi aos 8,4 anos, o que está de acordo com a bibliografia que aponta para uma idade média entre os 7,2 e os 9 anos (Baker-Gabb, Hunt & France, 2003; Bensignor *et al.*, 1996; Govier, 2003; Kiupel *et al.*, 2005; Thamm, Mauldin & Vail, 1997). Quanto a predisposição sexual, foi constatada uma ligeira predisposição para fêmeas constituindo 57,5% da população do estudo. A maior parte dos autores refere não haver predisposição sexual (Baker-Gabb, Hunt & France, 2003; Govier, 2003; London & Seguin, 2003; Scott *et al.*, 2001; Thamm, Mauldin & Vail, 1997; Welle *et al.*, 2008) embora alguns autores tenham verificado maior incidência em fêmeas (Simoes, Schoning & Butine, 1994).

Quanto à raça verificou-se que 35% dos animais do grupo eram da raça Labrador Retriever, 15% da raça Boxer, 12,5% sem raça definida (S.R.D.) e as restantes raças encontravam-se representadas por poucos elementos. Estes achados corroboram os dados anteriores da literatura, em que está descrito serem os cães sem raça definida e os Boxers

mais afectados por esta doença (Withrow e Vail, 2006; Bostock, 1986), seguindo-se dos Boston Terriers, Labrador Retrievers, Beagles e Shnauzers (Withrow & Vail, 2006).

Relativamente à localização das neoplasias, os locais de maior prevalência foram os membros (22,5%) e a região torácica (22,5%). Também estes achados parecem estar de acordo com a bibliografia, onde se reporta que os mastocitomas tendem a aparecer mais comumente no tronco e abdómen, seguido das extremidades, cabeça, pescoço e por último região inguinal e perianal (Bensignor *et al.*, 1996; Fulcher *et al.*, 2006; Kiupel *et al.*, 2005; London & Seguin, 2003).

Os mastocitomas são classificados segundo o seu grau de malignidade, de grau I a III. No grau I existe pouca evidência de recidiva após a excisão cirúrgica, o grau II tem um moderado potencial metastático e no grau III ocorre metastização frequente (Pulley, L.T. & Stannard, A., 1990). Muitas vezes existe relação entre a citologia e a histopatologia, porém em tumores mais indiferenciados (grau III) nem sempre é possível verificar esta relação (Lavallo *et al.*, 2003). A histopatologia é o método mais correto para a classificação do grau de malignidade apesar da citologia também o poder fazer (Sueiro, Daleck & Alessi, 2002). O grau histopatológico mais prevalente no presente trabalho foi o grau II (52,7%), seguido do grau III (25%) e grau I (17,5%). Apesar da classificação os mastocitomas de grau II estar de acordo com a bibliografia (43% dos mastocitomas cutâneos caninos), o mesmo não se aplica aos de grau histológico elevado pois está descrito na bibliografia que existe uma maior prevalência mastocitomas de grau I (36% dos casos) face aos mastocitomas de grau III (20% dos casos) (Gross *et al.*, 2005; Patnaik, Ehler & MacEwen, 1984). Esta prevalência invertida pode ser explicada por pelo menos duas hipóteses: 1) um possível enviesamento, dado alguns dos casos serem referências de outras clínicas por se tratarem de casos mais complicados; 2) uma certa negligência por parte dos proprietários face ao nódulo cutâneo, numa fase precoce.

A taxa de ulceração observada, neste estudo, foi de 32,5%. Esta percentagem é relativamente elevada e pode estar relacionada tanto com a agressividade dos tumores anteriormente referida, como de certa maneira pela negligência face ao tumor. Uma das principais razões da ulceração tumoral é a dimensão ou seja ou o tumor é muito agressivo, logo tem um crescimento rápido e rapidamente evolui para uma massa ulcerada ou o tumor foi aumentando de tamanho com o passar do tempo e o proprietários do paciente apenas se

deslocaram ao hospital veterinário aquando da ulceração do mesmo (Goldschmidt e Hendrick, 2002; Welle *et al.*, 2008).

Este tumor tem um comportamento clínico agressivo e oferece uma grande dificuldade de excisão cirúrgica com margens seguras (Withrow & Vail, 2006). Relativamente à excisão cirúrgica em apenas 45,0% dos casos esta foi considerada como completa. A eficácia da excisão cirúrgica vai depender de diversos factores entre eles a técnica cirúrgica, as margens cirúrgicas que o cirurgião optou e a agressividade tumoral. Tratando-se de um estudo retrospectivo foi impossível ter acesso às margens cirúrgicas adoptadas e técnicas utilizadas para cada cirurgia. Alguns autores defendem que pacientes com mastocitomas cutâneo incompletamente excisado têm uma maior probabilidade de recidiva e/ou metastização e uma maior taxa de mortalidade do que nos casos de excisão completa (Ozaki *et al.*, 2007).

Quanto à metastização ganglionar regional, este estudo revelou que esta ocorreu em 16,67% dos casos em que foi avaliada. Comparando com um outro estudo anterior, existe uma menor taxa de metastização visto que nesse mesmo estudo, a quando do diagnóstico, 22% dos cães com mastocitoma de grau II apresentavam metastização ganglionar regional enquanto que cães com mastocitoma de grau III apresentavam metastização ganglionar em 48% dos casos (Krick & Billings, 2009). Comparando com os resultados deste estudo no qual se obteve uma grande percentagem de mastocitomas de grau II e III, poder-se-ia esperar uma maior taxa de metastização ganglionar. Estes resultados poderão estar relacionados com a ausência de estudo de metastização ganglionar em 25% dos casos, ou por falta de avaliação sistemática de possíveis micrometástases.

A taxa de recidiva local foi de 37,5% e taxa de mestastização à distancia/aparecimento e novas massas foi de 40%. A taxa de recidiva depende de diversos factores entre os quais a excisão completa/incompleta e a aplicação de terapia adjuvante. Tendo em conta isto e os resultados prévios deste estudo (grande percentagem de tumores com excisão incompleta e uma aplicação de terapias adjuvantes em 65% dos pacientes) é difícil tirar uma conclusão objectiva visto não ter sido objecto do estudo a associação entre o tratamento optado e a taxa de recidiva. Contudo tendo em conta a alta percentagem de tumores de grau II e III podemos concluir que a taxa de recidiva foi elevada comparada com a bibliografia, porém a taxa de metastização/aparecimento de novas massas cai dentro do esperado. Em dois

estudos diferentes os resultados foram os seguintes. Em mastocitomas de grau II tratados apenas com cirurgia têm uma recidiva local de 5% com tempo mediano de recidiva de 62 dias. Cerca de 84% dos cães não desenvolveram recidivas, metastização ou novos mastocitomas sendo então suficiente a excisão cirúrgica para o tratamento de mastocitomas de grau II, sem necessidade de outros tratamentos quer locais ou sistémicos (Séguin *et al.*, 2001). Noutro estudo a excisão incompleta de mastocitomas de grau II resulta numa recidiva local de 23,3% com uma média de tempo livre de doença de 1713 dias. Ocorre recidiva local ao fim de 1 ano em 17,3% dos casos, 22,1% ao fim de 2 anos e ao fim de 5 anos 33,3%. Quase 40% dos cães desenvolvem mastocitomas noutras localizações. O período médio livre de doença é 1044 dias e a mediana do tempo de sobrevida é 1426 dias (Séguin *et al.*, 2006).

Neste estudo 65% dos pacientes foram submetidos a terapias adjuvantes, 57,5% destes foram sujeitos a quimioterapia com vinblastina e a 47,5% foi administrada prednisolona diariamente. Estas percentagem são meramente informativas pois por si só não têm grande valor. Porém tentou-se utilizar estes dados como uma tentativa de grupo de controlo (pacientes sujeitos a terapias adjuvantes vs pacientes sujeitos apenas a excisão cirúrgica) o que não relevou resultados estatisticamente significativos devido ao reduzido número de casos. Tratamentos complementares com protocolo de prednisolona e vinblastina demonstraram uma eficácia de cerca 47% (Thamm, Turek & Vail, 2006; Thamm, Mauldin & Vail, 1999). Este protocolo, aplicado em cães com mastocitomas de grau II incompletamente excisados, promove uma grande eficácia no controlo local e mesmo no desenvolvimento de metástases. Apresentando uma recidiva local de apenas 3,7% e em apenas 15% dos casos ocorreu desenvolvimento de mastocitomas à distância (Davies *et al.*, 2004). Já em mastocitomas de elevado grau este protocolo proporcionou uma sobrevida média de 196 semanas sendo que 70% dos cães sobreviveram 1 ano, 58% sobreviveram 2 anos e 53% sobreviveram 3 anos após o tratamento (Thamm, Turek & Vail, 2006).

Alguns estudos sugerem a relação entre a inflamação crónica e o aparecimento de neoplasias. Em diversos processos inflamatórios cutâneos pode ocorrer um aumento do número de mastócitos cutâneos. Só em processos inflamatórios crónicos é que o número de mastócitos é significativamente maior (Orkin & Schwartzman, 1959). No que diz respeito a distúrbios dermatológicos, no presente estudo, mais de metade dos cães com mastocitomas (55%) apresentava história clínica de inflamação cutânea crónica. Os mastócitos são um componente normal do sistema imune e participam nas respostas inflamatórias. Durante muito

tempo foi associada a presença de mastócitos no sangue aos mastocitomas. No entanto, foi comprovada a sua presença no sangue em diversas outras doenças como em anemias regenerativas, doenças inflamatórias, trauma tecidual, em diversas situações de necrose e em outras neoplasias (Stockham, Basel & Schmidt, 1986). De foram semelhante aos mastócitos normais, os mastócitos neoplásicos possuem, muitas vezes, grânulos com substâncias biologicamente ativas como a heparina, histamina, factor ativador de plaquetas e factor quimiotático. A quantidade e variedade dos grânulos depende do nível de diferenciação dos mastócitos nos mastocitomas. Sendo assim, neoplasias mais bem diferenciadas contêm mais heparina do que tumores mais indiferenciados que contêm quantidades mais elevadas de histamina (Birchard & Sherding, 2005).

Com base na constatação que várias neoplasias aparecem em localizações constantemente sujeitas a infeções e inflamações, parece haver uma relação entre a inflamação crónica e o desenvolvimento tumoral (Coussens & Werb, 2001). Um dos casos mais estudados é a infeção por *Helicobacter pylori*, na qual existe uma probabilidade de 75% de desenvolvimento de tumor gástrico, após a infeção por este agente (Coussens & Werb, 2001). Tendo em conta esta hipótese foram realizados testes estatísticos para avaliar a possível relação entre a história clínica de inflamação cutânea crónica e características da história clínica (história de neoplasias anteriores e o sexo do paciente) e pela aplicação do teste de Qui-quadrado (validado pelo teste exacto de Fisher para tabelas 2x2) tanto a história de neoplasias anteriores e o sexo não possuem relação estatisticamente significativa com a inflamação cutânea crónica. Não foram realizados outros testes estatísticos por serem esperadas frequências inferiores a 5. Estes resultados podem ser explicados quer pelo baixo número de casos quer pela realidade de uma não existência de relação entre estas características.

Realizaram-se testes estatísticos de modo a avaliar a relação entre a idade e história clínica de inflamação cutânea crónica. Os animais com história clínica de inflamação cutânea crónica apresentaram uma média de idade de 8,1 e os animais que não apresentavam história clínica de inflamação cutânea tinham uma idade média de 8,5 anos. Estas diferenças não foram consideradas estatisticamente significativas, podendo-se concluir que aparentemente não existe relação entre a história clínica de inflamação cutânea crónica e a idade ao diagnóstico de mastocitoma.

Foram também realizados testes de modo a avaliar a relação entre a inflamação cutânea crónica e a sobrevida aos 12 e 24 meses. Concluiu-se, no entanto, que não existia relação estatisticamente significativa entre a inflamação cutânea crónica e a sobrevida aos 12 e 24 meses. Contudo é importante referir que animais com mastocitoma e história progressiva de inflamação cutânea crónica parecem estar associados a uma sobrevida mais longa. Estes resultados poderiam ter sido diferentes caso se tivesse optado por uma categorização da sobrevida em dias ou semanas mas tal não foi possível.

Testou-se a possível relação entre a inflamação cutânea crónica e o grau dos mastocitomas e concluiu-se ocorrer uma diminuição da frequência da história clínica de inflamação cutânea crónica com o aumento de grau histológico. No entanto estes resultados não puderam ser confirmados por testes estatísticos devido ao baixo número de casos. Estes resultados poderiam ser explicados pela distribuição não equitativa entre os graus e o baixo número de casos.

Considerando e comparando o grau histológico e a história clínica de inflamação cutânea crónica concluiu-se que pacientes com mastocitoma de grau II apresentam 1,6x maior probabilidade de falecer face às outras variáveis e o pacientes com mastocitoma de grau III apresentam 3,5x maior probabilidade de falecer face às outras variáveis. Apesar destes resultados não terem sido estatisticamente significativos de certa maneira vão de acordo com a bibliografia. Para muitos autores o grau histológico dos mastocitomas é o fator de prognóstico mais relevante e está positivamente correlacionado com o tempo de sobrevida (Brocks *et al.*, 2008; Gieger & Theon, 2003; Gross *et al.*, 2005; London & Seguin, 2003; Patnaik, Ehler & MacEwen, 1984; Withrow & Vail, 2006).

8. Conclusão

Apesar de se tratar de um estudo retrospectivo foi possível retirar algumas conclusões relevantes.

Em termos de diagnóstico este estudo apenas recorreu a mastocitomas previamente diagnosticados por estudo histopatológico pois apenas por este método pode-se obter um diagnóstico definitivo. Contudo e apesar de não referido no estudo, na maior parte dos pacientes, foi realizada uma punção aspirativa com agulha fina como primeira abordagem à neoplasia.

Todos os pacientes foram sujeitos a excisão cirúrgica. Esta continua a ser a abordagem mais comum aos mastocitomas cutâneos. Contudo, devido a este estudo ter sido efectuado com base em pacientes tratados em centros veterinários de referência, uma percentagem considerável dos pacientes foi submetida a tratamentos complementares (65% dos pacientes). Mais especificamente 57,5% do grupo de estudo foi sujeito a tratamentos com vinblastina e 47,5% dos pacientes foram sujeitos a terapia complementar com prednisolona. Um dos tratamentos complementares de controlo local, desta neoplasia, de maior eficácia é a radioterapia, mas infelizmente em Portugal ainda não dispomos de equipamento para a realização deste tratamento.

Em termos de distribuição racial, a raça Labrador Retriever constituiu a maior percentagem do grupo de estudo, seguida da raça Boxer e os cães sem raça definida. Esta predominância pode não estar associada a uma maior predisposição racial mas sim a uma preferência/popularidade racial no nosso país.

Quanto à localização, esta ocorreu sobretudo nas extremidades e na região torácica. O grau histológico mais predominante foi o grau II (52,7%), seguido do grau III (25%) e por fim o grau I (17,5%). De destacar também foram as taxas de metastização ganglionar cerca de 17%, possivelmente em parte a um número relativamente elevado de casos em que esta não foi estudada (25%).

O objectivo deste estudo era avaliar a possível relação entre a inflamação cutânea crónica e o desenvolvimento dos mastocitomas. Porém devido ao baixo número de casos de estudo e reduzida descrição da sintomatologia cutânea nas fichas clínicas foi impossível chegar a resultados com relevância estatística.

Contudo obtiveram-se alguns resultados interessantes: 1) Mais de metade dos cães com mastocitoma tinham história clínica inflamação cutânea (ou seja tinham história clínica de otites, atopia, alergia alimentar e/ou outras patologias cutâneas sem diagnóstico definitivo); 2) Pacientes com história prévia de inflamação cutânea crónica parecem estar associados ao desenvolvimento de mastocitomas de grau histológico mais baixo; 3) Animais com mastocitoma cutâneo e que tinham história prévia de inflamação cutânea crónica parecem conseguir atingir uma sobrevida mais longa.

9. Limitações do estudo e perspectivas futuras

A primeira constatação durante a realização deste estudo foi a dificuldade em reunir os dados retrospectivamente. Poderiam ter sido utilizados mais de duzentos casos nesta tese, mas devido à falta de pormenor de algumas fichas clínicas tornou-se impossível a utilização dos mesmos. Devido então ao reduzido número de casos toda a parte estatística tornou-se bastante difícil pois existe um número mínimo de casos para se realizar determinados testes estatísticos (como o teste de Qui-quadrado e o teste exacto de Fisher).

Outra dificuldade encontrada foi na diversidade de abordagens às massas neoplásicas. Ou seja é difícil fazer grupos de controlo e grupos de estudo se cada animal teve uma abordagem diferente. Alguns seguiram logo para cirurgia, outros foi feita quimioterapia pré-cirúrgica, outros apenas quimioterapia (sendo estes últimos descartados do estudo).

De futuro, para outros estudos, o ideal seria um estudo observacional de coorte prospectivo, de modo a que se pudesse definir um grupo de estudo e um grupo de controlo, definir bem que patologias cutâneas englobar no estudo, ter um grupo maior de modo a conseguir chegar a uma conclusão com relevância estatística e um acompanhamento dos pacientes ao longo de anos (preferencialmente durante a vida toda do paciente).

Bibliografia

- Abadie, J. (1999). Immunohistochemical detection of proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 in mast cell tumors from dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*.
- Aiba, M., Iri, H., Suzuki, H., Kageyama, K., Kawai, T., Abe *et al.* (1985). Numerous mast cells in an 11-deoxycorticosterone-producing adrenocortical tumor. Histologic evaluation of benignancy and comparison with mast cell distribution in adrenal glands and neoplastic counterparts of 67 surgical specimens. *Archives of pathology & laboratory medicine*, 109, 357–60.
- Askenase, P. W. (1980). T cell-dependent mast cell degranulation and release of serotonin in murine delayed-type hypersensitivity. *Journal of Experimental Medicine*, 152(5), 1358–1374.
- Baginski, H., Davis, G., Bastian, R. P. (2014). The prognostic value of lymph node metastasis with grade 2 MCTs in dogs: 55 cases (2001-2010). *Journal of the American Animal Hospital Association*, 50(2), 89–95.
- Baker-Gabb, M., Hunt, G. B., France, M. P. (2003). Soft tissue sarcomas and mast cell tumours in dogs; clinical behaviour and response to surgery. *Australian veterinary journal*, 81(12), 732–8.
- Beaven, M. A. (2009). Our perception of the mast cell from Paul Ehrlich to now. *European journal of immunology*, 39(1), 11–25.
- Bensignor, E., Fontaine, J.-J., Delisle, F., Devauchelle, P. (1996). Le mastocytome cutané canin: résultat's d'une étude anatomoclinique et thérapeutique de 85 cas. *Recueil de médecine vétérinaire*, 172(7–8), 351–358.
- Berlato, D., Murphy, S., Monti, P., Stewart, J., Newton, J. R., Flindall, A. *et al.* (2013). Comparison of mitotic index and Ki67 index in the prognostication of canine cutaneous mast cell tumours. *Veterinary and comparative oncology*, 13(2), 143–50.
- Birchard, S. J., Sherding, R. G. (2005). *Saunders Manual of Small Animal Practice*. Elsevier Health Sciences.
- Bissonnette, E. Y., Enciso, J. A., Befus, A. D. (1997). TGF-beta1 inhibits the release of histamine and tumor necrosis factor-alpha from mast cells through an autocrine pathway. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 16(3), 275–82.
- Blackwood, L. (2010). Where do TKIs fit in? *British Small Animal Veterinary Congress 8-11th April 2010*.

- Blackwood, L., Murphy, S., Buracco, P., De Vos, J. P., De Fornel-Thibaud, P., Hirschberger, J. *et al.* (2012). European consensus document on mast cell tumours in dogs and cats. *Veterinary and Comparative Oncology*, 10(3).
- Bonagura, J. D., Twedt, D. C. (2008). *Kirk's Current Veterinary Therapy XIV*. Elsevier Health Sciences.
- Book, A. P., Fidel, J., Wills, T., Bryan, J., Sellon, R., Mattoon, J. (2011). Correlation of ultrasound findings, liver and spleen cytology, and prognosis in the clinical staging of high metastatic risk canine mast cell tumors. *Veterinary Radiology and Ultrasound*, 52, 548–554.
- Bostock, D., Crocker, J. (1989). Nucleolar organiser regions as indicators of post-surgical prognosis in canine spontaneous mast cell tumours. *British Journal of Cancer*.
- Bostock, D. E. (1973). The prognosis following surgical removal of mastocytomas in dogs. *Journal of Small Animal Practice*, 14(1), 27–40.
- Bostock, D. E. (1986). Neoplasms of the skin and subcutaneous tissues in dogs and cats. *The British veterinary journal*, 142(1), 1–19.
- Brocks, B. A. W., Neyens, I. J. S., Teske, E., Kirpensteijn, J. (2008). Hypotonic water as adjuvant therapy for incompletely resected canine mast cell tumors: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Veterinary surgery : VS*, 37(5), 472–8.
- Brodey, R. S. (1970). Canine and feline neoplasia. *Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine*, 14, 309–354.
- Brown, J. M., Wilson, T. M., Metcalfe, D. D. (2008). The mast cell and allergic diseases: role in pathogenesis and implications for therapy. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, 38(1), 4–18.
- Cahalane, A., Payne, S., Barber, L. G., Duda, L. E., Henry, C. J., Mauldin, G. E. *et al.* (2004). Prognostic factors for survival of dogs with inguinal and perineal mast cell tumors treated surgically with or without adjunctive treatment: 68 cases (1994-2002). *Journal of the American Veterinary Association*
- Camps-Palau, M. A., Leibman, N. F., Elmslie, R., Lana, S. E., Plaza, S., McKnight, J. A., *et al.* (2007). Treatment of canine mast cell tumours with vinblastine, cyclophosphamide and prednisone: 35 cases (1997-2004). *Veterinary and comparative oncology*, 5(3), 156–67.

- Carlsten, K. S., London, C. A., Haney, S., Burnett, R., Avery, A. C., Thamm, D. H. (2012). Multicenter prospective trial of hypofractionated radiation treatment, toceranib, and prednisone for measurable canine mast cell tumors. *Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine*, 26(1), 135–41.
- Chaffin, K., Thrall, D. E. (2002). Results of radiation therapy in 19 dogs with cutaneous mast cell tumor and regional lymph node metastasis. *Veterinary radiology & ultrasound : the official journal of the American College of Veterinary Radiology and the International Veterinary Radiology Association*, 43(4), 392–5.
- Claman, H. N. (1993). Mast cells and fibrosis. Hints from graft-versus-host disease and scleroderma. *Lung biology in health and disease*, 62, 653–667.
- Cole, W. (1990). Ontario. Mast cell tumor in a puppy. *The Canadian veterinary journal. La revue vétérinaire canadienne*, 31(6), 457.
- Cooper, M., Tsai, X., Bennett, P. (2009). Combination CCNU and vinblastine chemotherapy for canine mast cell tumours: 57 cases. *Veterinary and Comparative Oncology*, 7(3), 196–206.
- Coussens, L. M., Werb, Z. (2001). Inflammatory Cells and Cancer. *The Journal of Experimental Medicine*, 193(6), F23–F26.
- Davies, D. R., Wyatt, K. M., Jardine, J. E., Robertson, I. D., Irwin, P. J. (2004). Vinblastine and prednisolone as adjunctive therapy for canine cutaneous mast cell tumors. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 40(November 1999), 124–130.
- Davis, B. J., Page, R., Sannes, P. L., Meuten, D. J. (1992). Cutaneous Mastocytosis in a Dog. *Veterinary Pathology*, 29(4), 363–365.
- Dawson, M. (2012). Mast cell migration in allergy. UCL (University College London).
- Delves, P. J., Martin, S. J., Burton, D. R., Roitt, I. M. (2011). *Roitt's Essential Immunology*.
- Derenzini, M. (2000). The AgNORs. *Micron*.
- Dietsch, G. N., Hinrichs, D. J. (1989). The role of mast cells in the elicitation of experimental allergic encephalomyelitis. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 142(5), 1476–81.
- Dobson, J., Cohen, S., Gould, S. (2004). Treatment of canine mast cell tumours with prednisolone and radiotherapy. *Veterinary and comparative oncology*, 2(3), 132–41.

- Dobson, J. M., Scase, T. J. (2007). Advances in the diagnosis and management of cutaneous mast cell tumours in dogs. *The Journal of small animal practice*, 48(8), 424–31.
- Donnelly, L., Mullin, C., Balko, J., Goldschmidt, M., Krick, E., Hume, C. *et al.* (2013). Evaluation of histological grade and histologically tumour-free margins as predictors of local recurrence in completely excised canine mast cell tumours. *Veterinary and comparative oncology*, 13(1), 70–6.
- Duncan, J. R., Prasse, K. W. (1979). Cytology of Canine Cutaneous Round Cell Tumors: Mast Cell Tumor, Histiocytoma, Lymphosarcoma and Transmissible Venereal Tumor. *Veterinary Pathology*, 16(6), 673–679.
- Dvorak, A. M., Mihm, M. C., Dvorak, H. F. (1976). Morphology of delayed-type hypersensitivity reactions in man. II. Ultrastructural alterations affecting the microvasculature and the tissue mast cells. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, 34(2), 179–91.
- Fernandez, N. J., West, K. H., Jackson, M. L., Kidney, B. A. (2005). Immunohistochemical and histochemical stains for differentiating canine cutaneous round cell tumors. *Veterinary pathology*, 42(4), 437–45.
- Fife, M., Blocker, T., Fife, T., Dubielzig, R. R., Dunn, K. (2011). Canine conjunctival mast cell tumors: a retrospective study. *Veterinary ophthalmology*, 14(3), 153–60.
- Finnie, J. W., Bostock, D. E. (1979). Skin neoplasia in dogs. *Australian Veterinary Journal*, 55(12), 602–604.
- Fox, L. E. (2002). *Cancer in Dogs and Cats: Medical and Surgical Management*.
- Frimberger, A. E., Moore, A. S., LaRue, S. M., Gliatto, J. M., & Bengtson, A. E. (1997). Radiotherapy of incompletely resected, moderately differentiated mast cell tumors in the dog: 37 cases (1989-1993). *Journal of the American Animal Hospital Association*, 33(4), 320–4.
- Frimberger, A., Moore, A., Cincotta, L. (1998). Photodynamic therapy of naturally occurring tumors in animals using a novel benzophenothiazine photosensitizer. *Clinical Cancer Research*
- 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), 210–5.
- Furlani, J. M., Daleck, C. R., Vicenti, F. A. M., Nardi, A. B. De, Pereira, G. T., Santana, Á. E. *et al.* (2008). Mastocitoma canino: estudo retrospectivo. *Ciência Animal Brasileira*.

- Galli, S. J., Tsai, M., Wershil, B. K. (1993). The c-kit receptor, stem cell factor, and mast cells. What each is teaching us about the others. *The American journal of pathology*, 142(4), 965–74.
- Gaschen, F., Teske, E. (2005). Paraneoplastic syndrome. *Kirjassa: Textbook of Veterinary Internal Medicine: Diseases of the Dog and Cat E-edition, toim. Ettinger SJ & Feldman EC 6 (2005): 789-795.*
- Gerritsen, R. J., Teske, E., Kraus, J. S., Rutteman, G. R. (1998). Multi-agent chemotherapy for mast cell tumours in the dog. *Veterinary Quarterly*, 20(1), 28–31.
- Gieger, T., Theon, A. (2003). Biologic behavior and prognostic factors for mast cell tumors of the canine muzzle: 24 cases (1990–2001). *Journal of Veterinary Internal Mmedicine*
- Ginn, P., Fox, L., Brower, J. (2000). Immunohistochemical detection of p53 tumor-suppressor protein is a poor indicator of prognosis for canine cutaneous mast cell tumors. *Veterinary Pathology*
- Goldschmidt, M. H., & Hendrick, M. J. (2002). *Tumors in Domestic Animals*. (D. J. Meuten, Ed.). Ames, Iowa, USA: Iowa State Press.
- Goldschmidt, M. H., Shofer, F. S. (1992). Skin tumors of the dog and cat.
- Gordon, J. R., & Galli, S. J. (1990). Mast cells as a source of both preformed and immunologically inducible TNF-alpha/cachectin. *Nature*, 346(6281), 274–6.
- Govier, S. M. (2003). Principles of treatment for mast cell tumors. *Clinical techniques in small animal practice*, 18(2), 103–6.
- Grant, I. A., Rodriguez, C. O., Kent, M. S., Sfilgoi, G., Gordon, I., Davis, G. *et al.* (2008). A phase II clinical trial of vinorelbine in dogs with cutaneous mast cell tumors. *Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine*, 22(2), 388–93.
- Grier, R., Guardo, G. (1995). Mast cell tumour destruction in dogs by hypotonic solution. *Journal of Small Animal Practice*
- Grier, R., Guardo, G. Di. (1990). Mast cell tumor destruction by deionized water. *American journal of veterinary research*
- Gross, T. L., Ihrke, P. J., Walder, E. J., Affolter, V. K. (2005). *Skin Diseases of the Dog and Cat*. Oxford, UK: Blackwell Science Ltd.

- Hahn, K. A., King, G. K., & Carreras, J. K. (2004). Efficacy of radiation therapy for incompletely resected grade-III mast cell tumors in dogs: 31 cases (1987-1998). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 224(1), 79–82.
- Hahn, K. A., Legendre, A. M., Shaw, N. G., Phillips, B., Ogilvie, G. K., Prescott, D. M. *et al.* (2010). Evaluation of 12- and 24-month survival rates after treatment with masitinib in dogs with nonresectable mast cell tumors. *American Journal of Veterinary Research*, 71(11), 1354–61.
- Hahn, K. A., Ogilvie, G., Ogilvie, G., Rusk, T., Devauchelle, P., Leblanc, A. *et al.* (2008). Masitinib is safe and effective for the treatment of canine mast cell tumors. *Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine*, 22(6), 1301–9.
- Hammerberg, B., Olivry, T., & Orton, S. (2001). Skin mast cell histamine release following stem cell factor and high-affinity immunoglobulin E receptor cross-linking in dogs with atopic dermatitis. *Veterinary dermatology*.
- Hartveit, F., Thoresen, S., Tangen, M., Maartmann-Moe, H. (1984). Mast cell changes and tumour dissemination in human breast carcinoma. *Invasion & Metastasis*, 4(3), 146–55.
- Hendrick, M., Mahaffey, E., Moore, F., Vos, J., Walder, E. (1998). Histological classification of mesenchymal tumors of skin and soft tissues of domestic animals. *Washington, Armed Forces Institute of Pathology*.
- Hillman, L. A., Garrett, L. D., de Lorimier, L. P., Charney, S. C., Borst, L. B., Fan, T. M. (2010). Biological behavior of oral and perioral mast cell tumors in dogs: 44 cases (1996-2006). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 237(8), 936–42.
- Hosoya, K., Kisseberth, W. C., Alvarez, F. J., Lara-Garcia, A., Beamer, G., Stromberg, P. C., Couto, C. G. (2009). Adjuvant CCNU (lomustine) and prednisone chemotherapy for dogs with incompletely excised grade 2 mast cell tumors. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 45(1), 14–8.
- Hottendorf, G. H., Nielsen, S. W. (2010). Pathologic Survey of 300 Extirpated Canine Mastocytomas. *Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe A*, 14(3), 272–281.
- Howard, E. B., Sawa, T. R., Nielsen, S. W., & Kenyon, A. J. (1969). Mastocytoma and Gastroduodenal Ulceration: Gastric and Duodenal Ulcers in Dogs with Mastocytoma. *Veterinary Pathology*, 6(2), 146–158.

- Huang, E., Nocka, K., Beier, D. R., Chu, T.-Y., Buck, J., Lahm, H.-W. *et al.* (1990). The hematopoietic growth factor KL is encoded by the SI locus and is the ligand of the c-kit receptor, the gene product of the W locus. *Cell*, *63*(1), 225–233.
- Huizinga, J. D., Thuneberg, L., Kluppel, M., Malysz, J., Mikkelsen, H. B., Bernstein, A. (1995). W/kit gene required for interstitial cells of Cajal and for intestinal pacemaker activity. *Nature*, *373*(6512), 347–349.
- Hume, C., Kiupel, M. (2011). Outcomes of dogs with grade 3 mast cell tumors: 43 cases (1997–2007). *Journal of the American hospital association*
- Irani, A. M., Nilsson, G., Miettinen, U., Craig, S. S., Ashman, L. K., Ishizaka, T. *et al.* (1992). Recombinant human stem cell factor stimulates differentiation of mast cells from dispersed human fetal liver cells. *Blood*, *80*(12), 3009–21.
- Ishiguro, T., Kadosawa, T., Takagi, S., Kim, G., Ohsaki, T., Bosnakovski, D. *et al.* (2003). Relationship of Disease Progression and Plasma Histamine Concentrations in 11 Dogs with Mast Cell Tumors. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, *17*(2), 194–198.
- Jaffe, M., Hosgood, G. (2000). Deionised water as an adjunct to surgery for the treatment of canine cutaneous mast cell tumours. *Journal of Small Animal Practice*
- Johnson, T. O., Schulman, F. Y., Lipscomb, T. P., Yantis, L. D. (2002). Histopathology and biologic behavior of pleomorphic cutaneous mast cell tumors in fifteen cats. *Veterinary pathology*, *39*(4), 452–457.
- Junqueira, L. C. U., Carneiro, J. (2008). *Histologia básica: texto, atlas*. Guanabara Koogan.
- Kalesnikoff, J., Galli, S. J. (2008). New developments in mast cell biology. *Nature immunology*, *9*, 1215–1223.
- Kitamura, Y., Kasugai, T., Arizono, N., Matsuda, H. (1993). Development of mast cells and basophils: processes and regulation mechanisms. *The American journal of the medical sciences*, *306*(3), 185–191.
- Kitayama, H., Kanakura, Y., Furitsu, T., Tsujimura, T., Oritani, K., Ikeda, H. *et al.* (1995). Constitutively activating mutations of c-kit receptor tyrosine kinase confer factor-independent growth and tumorigenicity of factor-dependent hematopoietic cell lines. *Blood*, *85*(3), 790–8.

- Kiupel, M., Webster, J. D., Bailey, K. L., Best, S., DeLay, J., Detrisac, C. J. *et al.* (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), 147–55.
- 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), 371–7.
- Kiupel, M., Webster, J. D., Miller, R. A., Kaneene, J. B. (2005). Impact of tumour depth, tumour location and multiple synchronous masses on the prognosis of canine cutaneous mast cell tumours. *Journal of veterinary medicine. A, Physiology, pathology, clinical medicine*, 52(6), 280–6.
- Kodre, V., Cemazar, M., Pecar, J., Sersa, G., Cor, A., Tozon, N. (2009). Electrochemotherapy compared to surgery for treatment of canine mast cell tumours. *In vivo (Athens, Greece)*, 23(1), 55–62.
- Kravis, L., Vail, D. (1996). Frequency of argyrophilic nucleolar organizer regions in fine-needle aspirates and biopsy specimens from mast cell tumors in dogs. *Journal of the american veterinary medical association*
- Krick, E., Billings, A. (2009). Cytological lymph node evaluation in dogs with mast cell tumours: association with grade and survival. *Veterinary and comparative oncology*
- Kry, K. L., Boston, S. E. (2014). Additional local therapy with primary re-excision or radiation therapy improves survival and local control after incomplete or close surgical excision of mast cell tumors in dogs. *Veterinary surgery : VS*, 43(2), 182–9.
- Lanore, D., Delprat, C. (2004). *Quimioterapia anticancerígena*. Elsevier España.
- Lavalle, G. E., Araújo, R. B., Carneiro, R. A., Pereira, L. C. (2003). Punção aspirativa por agulha fina para diagnóstico de mastocitoma em cães. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 55(4), 500–502.
- Lemarié, J. R., Lemarié, L. S., Hedlund, S. C. (1995). *The Compendium on Continuing Education for the Animal Health Technician*. Veterinary Learning Systems Co.
- Lennartsson, J., Jelacic, T., Linnekin, D., Shivakrupa, R. (2005). Normal and oncogenic forms of the receptor tyrosine kinase kit. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 23(1), 16–43.

- Lewis, R. A., Soter, N. A., Diamond, P. T., Austen, K. F., Oates, J. A., Roberts, L. J. (1982). Prostaglandin D2 generation after activation of rat and human mast cells with anti-IgE. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 129(4), 1627–31.
- Liao, A. T., Chien, M. B., Shenoy, N., Mendel, D. B., McMahon, G., Cherrington, J. M., London, C. A. (2002). Inhibition of constitutively active forms of mutant kit by multitargeted indolinone tyrosine kinase inhibitors. *Blood*, 100(2), 585–93.
- Lin, T., London, C. (2010). Characterization and modulation of canine mast cell derived eicosanoids. *Veterinary immunology and immunopathology*.
- London, C. A. (2008). Management of Canine Mast Cell Tumors. *Proceeding of the SEVC Southern European Veterinary Conference*, 1–10.
- London, C. A. (2009). Tyrosine kinase inhibitors in veterinary medicine. *Topics in companion animal medicine*, 24(3), 106–12.
- London, C. A., Hannah, A. L., Zadovoskaya, R., Chien, M. B., Kollias-Baker, C., Rosenberg, M. *et al.* (2003). Phase I Dose-Escalating Study of SU11654, a Small Molecule Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor, in Dogs with Spontaneous Malignancies. *Clin. Cancer Res.*, 9(7), 2755–2768.
- 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.
- London, C. A., Malpas, P. B., Wood-Follis, S. L., Boucher, J. F., Rusk, A. W., Rosenberg, M. P. *et al.* (2009). Multi-center, placebo-controlled, double-blind, randomized study of oral toceranib phosphate (SU11654), a receptor tyrosine kinase inhibitor, for the treatment of dogs with recurrent (either local or distant) mast cell tumor following surgical excision. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 15(11), 3856–65.
- London, C. A., Seguin, B. (2003). Mast cell tumors in the dog. *The Veterinary clinics of North America. Small animal practice*, 33(3), 473–489.
- London, C., Thamm, D. (2013). Mast cell tumors. *Small Animal Clinical Oncology*.
- Longley, B. J., Tyrrell, L., Ma, Y., Williams, D. A., Halaban, R., Langley, K. *et al.* (1997). Chymase cleavage of stem cell factor yields a bioactive, soluble product. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(17), 9017–9021.

- Macy, D., MacEwen, E. (1989). Mast cell tumors. *Veterinary oncology*. Philadelphia: JB Lippincott, 156–165.
- Macy, D. W. (1987). *Proceedings of the 10th Annual Kal Kan Symposium for the Treatment of Small Animal Disease, October 1986*. Kal Kan Foods, Incorporated.
- Matsuda, A., Tanaka, A., Amagai, Y., Ohmori, K., Nishikawa, S., Xia, Y. *et al.* (2011). Glucocorticoid sensitivity depends on expression levels of glucocorticoid receptors in canine neoplastic mast cells. *Veterinary immunology and immunopathology*, 144(3–4), 321–8.
- Maurer, M., Theoharides, T., Granstein, R. D., Bischoff, S. C., Bienenstock, J., Henz, B. *et al.* (2003). What is the physiological function of mast cells? *Experimental dermatology*
- Maxie, M. G. (2007). *Pathology of Domestic Animals*. Elsevier Saunders.
- Mayer, M. N. (2006). Radiation therapy for canine mast cell tumors. *The Canadian veterinary journal. La revue vétérinaire canadienne*, 47(3), 263–5.
- McCaw, D. L., Miller, M. A., Bergman, P. J., Withrow, S. J., Moore, A. S., Knapp, D. W. *et al.* (1997). Vincristine therapy for mast cell tumors in dogs. *Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine*, 11(6), 375–8.
- McNiell, E., Prink, A., O'Brien, T. (2006). Evaluation of risk and clinical outcome of mast cell tumours in pug dogs. *Veterinary and comparative oncology*
- Meuten, D. J. (2008). *Tumors in Domestic Animals*. John Wiley & Sons.
- Michels, G. M., Knapp, D. W., DeNicola, D. B., Glickman, N., Bonney, P. (2002). Prognosis following surgical excision of canine cutaneous mast cell tumors with histopathologically tumor-free versus nontumor-free margins: a retrospective study of 31 cases. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 38(5), 458–66.
- 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), 360–3.
- Mochizuki, M., Kuwabara, T., Chan, C. C., Nussenblatt, R. B., Metcalfe, D. D., Gery, I. (1984). An association between susceptibility to experimental autoimmune uveitis and choroidal mast cell numbers. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 133(4), 1699–701.
- Monografia Masivet. (2009). Masivet Monograph.

- Monteiro, B., Boston, S., Monteith, G. (2011). Factors influencing complete tumor excision of mast cell tumors and soft tissue sarcomas: a retrospective study in 100 dogs. *The Canadian veterinary journal. La revue vétérinaire canadienne*, 52(11), 1209–14.
- Moore, A. S., Kitchell, B. E. (2003). New chemotherapy agents in veterinary medicine. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 33(3), 629–649.
- Morini, M., Bettini, G., Preziosi, R., Mandrioli, L. (2004). C-kit Gene Product (CD117) Immunoreactivity in Canine and Feline Paraffin Sections. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 52(5), 705–708.
- Morris, J., Dobson, J. (2008). *Small Animal Oncology*. John Wiley & Sons.
- 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), 91–5.
- Murphy, S. (2011). *BSAVA Manual of Canine and Feline Oncology*. Wiley.
- Murphy, S., Sparkes, A., Bluden, A. S., Brearley, M. J., Smith, K. C. (2006). Effects of stage and number of tumours on prognosis of dogs with cutaneous mast cell tumours. *The veterinary record*
- Murphy, S., Sparkes, A. H., Smith, K. C., Blunden, A. S., & Brearley, M. J. (2004). Relationships between the histological grade of cutaneous mast cell tumours in dogs, their survival and the efficacy of surgical resection. *The Veterinary record*, 154(24), 743–6.
- Nardi, A. B. de, Rodaski, S. (2008). *Quimioterapia Antineoplásica Em Cães e Gatos*.
- Nelson, R. W., Couto, C. G. (2011). *Medicina interna de pequenos animais*. Elsevier (medicina).
- Neto, R. T. (2008). Mastocitoma cutâneo canino : aspectos clínicos, citopatológico, morfométrico e imunocitoquímico. *Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia*.
- Neyens, I., Kirpensteijn, J. (2004). Pilot study of intraregional deionised water adjunct therapy for mast cell tumours in dogs. *The Veterinary record*.
- Nilsson, G., Butterfield, J. H., Nilsson, K., Siegbahn, A. (1994). Stem cell factor is a chemotactic factor for human mast cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 153(8), 3717–23.

- North, S. M., & Banks, T. A. (2009). *Small Animal Oncology: An Introduction*. Elsevier Health Sciences.
- Northrup, N. C., Roberts, R. E., Harrell, T. W., Allen, K. L., Howerth, E. W., Gieger, T. L. (2004). Iridium-192 Interstitial Brachytherapy as Adjunctive Treatment for Canine Cutaneous Mast Cell Tumors.
- O'Brien, R., & Barr, F. (2009). BSAVA manual of canine and feline abdominal imaging.
- O'Keefe, D. A. (1990). Canine Mast Cell Tumors. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 20(4), 1105–1115.
- O'Keefe, D. A., Couto, C. G., Burke-Schwartz, C., Jacobs, R. M. (1987). Systemic Mastocytosis in 16 Dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 1(2), 75–80.
- Ogilvie, G., Hensel, P. (2012). Masitinib—a targeted therapy with applications in veterinary oncology and inflammatory diseases. *Animal Science Reviews 2011*
- Ogilvie, G. K., Moore, A. S. (1995). Managing the veterinary cancer patient: a practice manual.
- Okayama, Y., Tkaczyk, C., Metcalfe, D. D., Gilfillan, A. M. (2003). Comparison of Fc epsilon RI and Fc gamma RI-mediated degranulation and TNF-alpha synthesis in human mast cells: selective utilization of phosphatidylinositol-3-kinase for Fc gamma RI-induced degranulation. *European journal of immunology*, 33(5), 1450–9.
- Orkin, M., Schwartzman, R. (1959). A Comparative Study of Canine and Human Dermatology: II. Cutaneous Tumors—The Mast Cell and Canine Mastocytoma. From the Division of. *Journal of Investigative Dermatology*.
- Ozaki, K., Yamagami, T., Nomura, K., & Narama, I. (2007). Prognostic significance of surgical margin, Ki-67 and cyclin D1 protein expression in grade II canine cutaneous mast cell tumor. *The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science*, 69(11), 1117–21.
- Pardanani, A., Akin, C., Valent, P. (2006). Pathogenesis, clinical features, and treatment advances in mastocytosis. *Best practice & research. Clinical haematology*, 19(3), 595–615.
- 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.
- Peters, J. A. (1969). Canine Mastocytoma: Excess Risk as Related to Ancestry. *Journal of National Cancer Institute*, 42(3), 435–443.

- Plaut, M., Pierce, J. H., Watson, C. J., Hanley-Hyde, J., Nordan, R. P., Paul, W. E. (1989). Mast cell lines produce lymphokines in response to cross-linkage of Fc epsilon RI or to calcium ionophores. *Nature*, 339(6219), 64–7.
- Poirier, V. J., Adams, W. M., Forrest, L. J., Green, E. M., Dubielzig, R. R., Vail, D. M. (2006). Radiation therapy for incompletely excised grade II canine mast cell tumors. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 42(6), 430–4.
- Pratschke, K. M., Atherton, M. J., Sillito, J. A., Lamm, C. G. (2013). Evaluation of a modified proportional margins approach for surgical resection of mast cell tumors in dogs: 40 cases (2008-2012). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 243(10), 1436–41.
- Preziosi, R., Sarli, G., Paltrinieri, M. (2004). Prognostic value of intratumoral vessel density in cutaneous mast cell tumours of the dog. *Journal of comparative pathology*.
- Pulley, L. T., Stannard, A. A. (1990). *Tumors of the skin and soft tissues*. Moutlon, J.E. - Tumors in domestic animals. 3^o ed. University of California Press, 1990. Cap. 2, pg. 23-87.
- Rassnick, K. M., Bailey, D. B., Russell, D. S., Flory, A. B., Kiselow, M. A., Intile, J. L. *et al.* (2010). A phase II study to evaluate the toxicity and efficacy of alternating CCNU and high-dose vinblastine and prednisone (CVP) for treatment of dogs with high-grade, metastatic or nonresectable mast cell tumours. *Veterinary and comparative oncology*, 8(2), 138–52.
- Rassnick, K. M., Moore, A. S., Williams, L. E., London, C. A., Kintzer, P. P., Engler, S. J., Cotter, S. M. (1999). Treatment of Canine Mast Cell Tumors with CCNU (Lomustine). *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 13(6), 601–605.
- Rech, R. R., Graça, D. L., Kommers, G. D., Sallis, E. S. V, Raffi, M. B., Garmatz, S. L. (2004). Mastocitoma cutâneo canino. Estudo de 45 casos. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia*, 56(4), 441–448.
- Reguera, M. J., Rabanal, R. M., Puigdemont, A., Ferrer, L. (2000). Canine mast cell tumors express stem cell factor receptor. *The American Journal of dermatopathology*, 22(1), 49–54.
- Rhodes, K. H., Werner, A. H. (2011). *Blackwell's Five-Minute Veterinary Consult Clinical Companion: Small Animal Dermatology*. John Wiley & Sons.
- Robat, C., London, C., Bunting, L., McCartan, L., Stingle, N., Selting, K. *et al.* (2012). Safety evaluation of combination vinblastine and toceranib phosphate (Palladia®) in dogs: a phase I dose-finding study. *Veterinary and comparative oncology*, 10(3), 174–83.

- Roberts, L. J., Lewis, R. A., Oates, J. A., Austen, K. F. (1979). Prostaglandin, thromboxane, and 12-hydroxy-5,8,10,14-eicosatetraenoic acid production by ionophore-stimulated rat serosal mast cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*, 575(2), 185–192.
- Rodigheri, S. M., Daleck, C. R., Calazans, S. G., Fernandes, S. C., De Nardi, A. B., Cesar, J. R. F., Castro, J. H. T. de. (2008). Neuropatia paraneoplásica associada ao mastocitoma canino. *Ciência Rural*, 38(3), 819–822.
- Rogers, K. S. (1993). Common questions about diagnosing and treating canine mast cell tumors. *Veterinary Medicine*.
- Romansik, E., Reilly, C. (2007). Mitotic index is predictive for survival for canine cutaneous mast cell tumors. *Veterinary Pathology*.
- Roskoski, R. (2005). Structure and regulation of Kit protein-tyrosine kinase--the stem cell factor receptor. *Biochemical and biophysical research communications*, 338(3), 1307–15.
- Scarpa, F., Sabbatini, S., Marconato, L., Capitani, O., Morini, M., Bettini, G. (2012). Use of histologic margin evaluation to predict recurrence of cutaneous malignant tumors in dogs and cats after surgical excision. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 240(10), 1181–7.
- Scase, T., Edwards, D., Miller, J. (2006). Canine mast cell tumors: correlation of apoptosis and proliferation markers with prognosis. *Journal of Veterinary Internal Medicine*.
- Schultheiss, P. C., Gardiner, D. W., Rao, S., Olea-Popelka, F., Tuohy, J. L. (2011). Association of histologic tumor characteristics and size of surgical margins with clinical outcome after surgical removal of cutaneous mast cell tumors in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 238(11), 1464–9.
- Schwab, T. M., Popovitch, C., Debiasio, J., Goldschmidt, M. (2014). Clinical Outcome for MCTs of Canine Pinnae Treated with Surgical Excision (2004-2008). *Journal of the American Animal Hospital Association*.
- Scott, D. W., Muller, G. H., Kirk, R. W., Miller, W. H., Griffin, C. E. (2001). *Muller & Kirk's Small Animal Dermatology*.
- Séguin, B., Besancon, M. F., McCallan, J. L., Dewe, L. L., Tenwolde, M. C., Wong, E. K., Kent, M. S. (2006). Recurrence rate, clinical outcome, and cellular proliferation indices as prognostic indicators after incomplete surgical excision of cutaneous grade II mast cell tumors: 28 dogs (1994-2002). *Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine*, 20(4), 933–40.

- Séguin, B., Leibman, N. F., Bregazzi, V. S., Ogilvie, G. K., Powers, B. E., Dernell, W. S. *et al.* (2001). Clinical outcome of dogs with grade-II mast cell tumors treated with surgery alone: 55 cases (1996-1999). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 218(7), 1120–3.
- Sfiligoi, G., & Rassnick, K. (2005). Outcome of dogs with mast cell tumors in the inguinal or perineal region versus other cutaneous locations: 124 cases (1990–2001). *Journal of the American veterinary association*.
- Shaw, D. H., Ihle, S. L. (2013). *Small Animal Internal Medicine* (Vol. 1).
- 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.
- Simpson, A. M., Ludwig, L. L., Newman, S. J., Bergman, P. J., Hottinger, H. A., Patnaik, A. K. (2004). Evaluation of surgical margins required for complete excision of cutaneous mast cell tumors in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 224(2), 236–40.
- Souza, T. M., Figuera, R. a., Kommers, G. D., Barros, C. S. L. (2009). Aspectos histológicos da pele de caes e gatos como ferramenta para dermatopatologia. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*, 29(2), 177–190.
- Spugnini, E., Vincenzi, B. (2011). Evaluation of Cisplatin as an electrochemotherapy agent for the treatment of incompletely excised mast cell tumors in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*.
- Spugnini, E., Vincenzi, B., Baldi, F. (2006). Adjuvant electrochemotherapy for the treatment of incompletely resected canine mast cell tumors. *Anticancer research*.
- Stanclift, R. M., Gilson, S. D. (2008). Evaluation of neoadjuvant prednisone administration and surgical excision in treatment of cutaneous mast cell tumors in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 232(1), 53–62.
- Stefanello, D., Valenti, P., Faverzani, S., Bronzo, V., Fiorbianco, V., Pinto da cunha, N. *et al.* (2009). Ultrasound-guided cytology of spleen and liver: A prognostic tool in canine cutaneous mast cell tumor. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 23, 1051–1057.
- Stockham, S. L., Basel, D. L., & Schmidt, D. A. (1986). Mastocytemia in Dogs With Acute Inflammatory Diseases. *Veterinary Clinical Pathology*, 15(1), 16–21.

- 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*.
- Strefezzi, R. de F., Xavier, J. G., Kleeb, S. R., Catão-Dias, J. L. (2009). Nuclear morphometry in cytopathology: a prognostic indicator for canine cutaneous mast cell tumors. *Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, 21, 821–825.
- Sueiro, F. A. R., Daleck, C. R., Alessi, A. C. (2002). Ultra-estrutura dos mastócitos de diferentes tipos histológicos de mastocitoma em cães. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 54(3), 255–258.
- Supajatura, V., Ushio, H., Nakao, A., Okumura, K., Ra, C., Ogawa, H. (2001). Protective roles of mast cells against enterobacterial infection are mediated by Toll-like receptor 4. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 167(4), 2250–6.
- Takahashi, T., Kadosawa, T., Nagase, M., Mochizuki, M., Matsunaga, S., Nishimura, R., Sasaki, N. (1997). Inhibitory effects of glucocorticoids on proliferation of canine mast cell tumor. *The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science*, 59(11), 995–1001.
- Takeuchi, Y., Fujino, Y., Watanabe, M., Takahashi, M., Nakagawa, T., Takeuchi, A. *et al.* (2013). Validation of the prognostic value of histopathological grading or c-kit mutation in canine cutaneous mast cell tumours: a retrospective cohort study. *Veterinary journal (London, England : 1997)*, 196(3), 492–8.
- Takizawa, H., Ohta, K., Hirai, K., Misaki, Y., Horiuchi, T., Kobayashi, N. *et al.* (1989). Mast cells are important in the development of hypersensitivity pneumonitis. A study with mast-cell-deficient mice. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 143(6), 1982–8.
- Taylor, F., Gear, R., Hoather, T., Dobson, J. (2009). Chlorambucil and prednisolone chemotherapy for dogs with inoperable mast cell tumours: 21 cases. *Journal of Small Animal Practice*, 50(6), 284–289.
- Thamm, D. H., Mauldin, E. A., Vail, D. M. (1997). Prednisone and vinblastine chemotherapy for canine mast cell tumor--41 cases (1992-1997). *Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine*, 13(5), 491–7.

- Thamm, D. H., Mauldin, E. A., Vail, D. M. (1999). Prednisone and Vinblastine Chemotherapy for Canine Mast Cell Tumor-41 Cases (1992-1997). *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 13(5), 491–497.
- 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. *Journal of Veterinary Medical Science*, 68(6), 581–587.
- Theoharides, T. C., Conti, P. (2004). Mast cells: the Jekyll and Hyde of tumor growth. *Trends in immunology*, 25(5), 235–41.
- Thompson, J. J., Pearl, D. L., Yager, J. A., Best, S. J., Coomber, B. L., Foster, R. A. (2011). Canine subcutaneous mast cell tumor: characterization and prognostic indices. *Veterinary pathology*, 48(1), 156–68.
- Tizard, I. R. (2009). *Immunología veterinaria*. Elsevier Health Sciences.
- Turin, L., Acocella, F., Stefanello, D., Oseliero, A., Fondrini, D., Brizzola, S., Riva, F. (2006). Expression of c-kit proto-oncogene in canine mastocytoma: a kinetic study using real-time polymerase chain reaction. *Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, 18(4), 343–349.
- Turrel, J. M., Kitchell, B. E., Miller, L. M., Théon, A. (1988). Prognostic factors for radiation treatment of mast cell tumor in 85 dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 193(8), 936–40.
- Vascellari, M., Giantin, M., Capello, K., Carminato, A., Morello, E. M., Vercelli, A. *et al.* (2013). Expression of Ki67, BCL-2, and COX-2 in canine cutaneous mast cell tumors: association with grading and prognosis. *Veterinary pathology*, 50(1), 110–21.
- Webster, J. D., Kiupel, M., Yuzbasiyan-Gurkan, V. (2006). Evaluation of the kinase domain of c-KIT in canine cutaneous mast cell tumors. *BMC cancer*, 6(1), 85.
- 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.
- Webster, J. D., Yuzbasiyan-Gurkan, V., Thamm, D. H., Hamilton, E., Kiupel, M. (2008). Evaluation of prognostic markers for canine mast cell tumors treated with vinblastine and prednisone. *BMC Veterinary Research*, 4(1), 32.

- Weisse, C., Shofer, F. S., Sorenmo, K. (2002). Recurrence rates and sites for grade II canine cutaneous mast cell tumors following complete surgical excision. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 38(1), 71–3.
- Welle, M. M., Bley, C. R., Howard, J., Rüfenacht, S. (2008). Canine mast cell tumours: a review of the pathogenesis, clinical features, pathology and treatment. *Veterinary Dermatology*, 19(6), 321–39.
- Williams, D. E., Eisenman, J., Baird, A., Rauch, C., Van Ness, K., March, C. J. *et al.* (1990). Identification of a ligand for the c-kit proto-oncogene. *Cell*, 63(1), 167–174.
- Withrow, S. J., Vail, D. M. (2006). *Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology*. Elsevier Science Health Science Division.
- Wobeser, B., Kidney, B. (2007). Diagnoses and clinical outcomes associated with surgically amputated canine digits submitted to multiple veterinary diagnostic laboratories. *Veterinary Pathology*.
- Wodnar-Filipowicz, A., Heusser, C. H., Moroni, C. (1989). Production of the haemopoietic growth factors GM-CSF and interleukin-3 by mast cells in response to IgE receptor-mediated activation. *Nature*, 339(6220), 150–2.
- Wojta, J., Kaun, C., Zorn, G., Ghannadan, M., Hauswirth, A. W., Sperr, W. R. *et al.* (2002). C5a stimulates production of plasminogen activator inhibitor-1 in human mast cells and basophils. *Blood*, 100(2), 517–23.
- Wu, H., Hayashi, T., Inoue, M. (2004). Immunohistochemical expression of p27 and p21 in canine cutaneous mast cell tumors and histiocytomas. *Veterinary pathology*, 41(3), 296–299.
- Yarden, Y., Kuang, W. J., Yang-Feng, T., Coussens, L., Munemitsu, S., Dull, T. J. *et al.* (1987). Human proto-oncogene c-kit: a new cell surface receptor tyrosine kinase for an unidentified ligand. *The EMBO journal*, 6(11), 3341–51.
- Yee, N. S. (1994). Role of kit-ligand in proliferation and suppression of apoptosis in mast cells: basis for radiosensitivity of white spotting and steel mutant mice. *Journal of Experimental Medicine*, 179(6), 1777–1787.
- 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*, 39(5), 529–535.

Zur, G., Ihrke, P., White, S., Kass, P. (2002). Canine atopic dermatitis: a retrospective study of 266 cases examined at the University of California, Davis, 1992–1998. Part I. Clinical features and allergy testing. *Veterinary dermatology*.