

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**  
Programa de Pós Graduação em Veterinária



Dissertação

**ESTUDO DA APLICABILIDADE DE CRITÉRIOS MORFOLÓGICOS E  
MORFOMÉTRICOS PARA A GRADUAÇÃO DE MASTOCITOMAS CUTÂNEOS  
EM CANINOS**

**MÁRCIA FELTRIN DIAS**

Pelotas, 2007

**MÁRCIA FELTRIN DIAS**

**ESTUDO DA APLICABILIDADE DE CRITÉRIOS MORFOLÓGICOS E  
MORFOMÉTRICOS PARA A GRADUAÇÃO DE MASTOCITOMAS CUTÂNEOS  
EM CANINOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós  
Graduação em Veterinária da Universidade  
Federal de Pelotas, como requisito parcial à  
obtenção do título de Mestre em Ciências (área  
do conhecimento: Patologia Animal).

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Cristina Gevehr Fernandes

Pelotas, 2007

**BANCA EXAMINADORA:**

Profª Drª Gláucia Denise Kommers

Profª Drª Gilma Trindade

Méd. Vet. Drª Ana Lúcia Schild

## **DEDICATÓRIA**

Aos meus pais, Macir e Ondina , meus primeiros mestres, que com amor , carinho e dedicação me ensinaram as mais importantes lições da vida.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pela benção da vida, pela saúde e pela força de nela buscar o caminho do bem e do conhecimento.

A minha família, por sempre me incentivar a voar e por sempre me mostrar que eu teria acolhida na volta ao ninho.

Ao Meu Pai Macir, pelo amor, carinho, amizade e companheirismo que sempre me dedicou em todos os momentos da vida.

A Minha Mãe Ondina, que mesmo na impossibilidade do toque ou da palavra seu amor é sempre presente em minha vida.

A Minha Irmã Mara Cristina, pelo incondicional apoio, incentivo e carinho em todas as horas.

Ao Meu Avô, Antero Dias pela simplicidade e carinho com que sempre me transmitiu suas lições de sabedoria.

Ao Meu Amor Paulo Ricardo, "Pelo Amor" que incentivou, apoiou, ajudou, comemorou, consolou e mais que tudo compreendeu a cada dia por todos os dias desta caminhada.

A Minha Orientadora Cristina Gevehr Fernandes, pela oportunidade de realizar este trabalho, pelo carinho e dedicação que sempre me dispensou, tornando-se para mim uma pessoa muito estimada. Colaborando enormemente para o meu crescimento profissional e pessoal. E principalmente pelo seu marcante alto- astral e bom humor que sempre me ajudaram muito.

Aos professores do Departamento de Patologia Animal, Josiane Bonel, Margarida Raffi e Simone Salles pela dedicação destinada à formação e também pelo carinho e amizade dispensados durante o curso.

Ao Professor Obirajara Rodrigues pelo incentivo e pela dedicação, tão importantes para que eu chegasse até aqui.

Aos Técnicos do LRD, Ana Lúcia, João Luís Montiel e Mauro Soares, pelo apoio e dedicação dispensados a minha formação profissional.

As técnicas Rosária e Daiane, pela disponibilidade em ajudar e amizade que sempre recebi.

Ao João Nunes, em especial pela imensa dedicação com que colaborou para a realização deste trabalho e pelo imenso carinho e amizade que sempre dispensou para minha pessoa.

A Zuleica, pelo bom humor carinho com que sempre esteve disposta a ajudar.

Aos colegas, que se transformaram em grandes amigos Patrícia Vives, Milton e Thomas pelo companheirismo e auxílio durante este período e em especial a colega e amiga Tatiane Camacho Mendes, que dividiu comigo as alegrias e angústias deste período sempre dedicada e carinhosa e foi incansável em me ajudar durante o curso, tornando-se para mim uma Amiga Inesquecível.

Aos estagiários e bolsistas do Departamento de Patologia Animal, Amanda, Beatriz, Camila, Camila Farias, Conrado, Fábio, Fernanda, Guisepe, Juliana, Letícia, Mariana, Monique, Vanessa e Marcel pela dedicação nos trabalhos, ajuda cooperação e principalmente pelos bons momentos de descontração em convívio com vocês.

Aos Professores e Colegas do Departamento de Ciências Morfobiológicas (FURG) Dionísio Loch, Antônio Sérgio Varella Jr. e Ana Luiza Velloso pelo auxílio e compreensão durante a realização deste trabalho.

A minha Amiga e Boadrasta, Gema Bonatto Tafarel por todo o carinho com que sempre está me incentivando.

Aos meus sogros Joaquim e Leonir, pela acolhida como filha e como tal me dedicarem carinho e cuidado.

Aos animais que mesmo na dor ou no infortúnio, colaboraram para a realização deste trabalho.

A todos. MUITO OBRIGADA!

## Resumo

DIAS, Márcia Feltrin. **Estudo da aplicabilidade de critérios morfológicos e morfométricos para a graduação de mastocitomas cutâneos em caninos.** 2006. 59 p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Mastocitomas estão entre os neoplasmas cutâneos caninos mais freqüentes. Com o objetivo de estudar o comportamento biológico desses tumores e de buscar métodos que permitam uma classificação mais objetiva e fidedigna, foi realizada uma análise retrospectiva dos Mastocitomas em caninos, provenientes de biópsias e necropsias enviadas ao Laboratório Regional de Diagnóstico (LRD) da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL), no período de janeiro de 1986 a dezembro de 2005. A partir desta revisão realizou-se uma abordagem epidemiológica baseada nos dados de 80 mastocitomas diagnosticados no período. Assim sendo, verificou-se que quanto ao sexo, 45 (56,2%) foram diagnosticados em fêmeas, 33 (41,2%) em machos e para 2 (2,5%) animais o sexo não foi informado. Estes tumores foram diagnosticados em 16 raças diferentes, tendo predominado em cães sem raça definida e na raça Boxer. Os mastocitomas predominaram na faixa etária de 6-10 anos. Realizou-se, também, uma avaliação morfológica e morfométrica de parâmetros histológicos de 25 mastocitomas resgatados no período. As amostras foram classificadas de acordo com seu grau histológico e para tal foram utilizadas as colorações de hematoxilina e eosina, azul de toluidina e tricrômico de Masson e avaliou-se o índice de proliferação celular através da impregnação argêntica (AgNOR). Com base em critérios pré-definidos os 25 mastocitomas do estudo foram classificados em graus, obtendo-se sete (28%) classificados como grau I, 11(44%) como grau II e sete (28%) como grau III. Para o estudo morfométrico foram avaliados área e perímetro da célula e área e perímetro do núcleo dos mastócitos tumorais. Parâmetros morfométricos aliados aos parâmetros morfológicos de graduação dos mastocitomas conferiram maior confiabilidade ao diagnóstico.

Palavras-chave: Mastocitomas, Caninos, AgNOR, Morfometria

## Abstract

DIAS, Márcia Feltrin **Study of the applicability of morphologic and morphometric criteria for the canine graduation of Mastocitomas.** 2006. 59 p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Patologia Animal. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Mastocitomas are most prevalent cutaneous neoplasms in canines. Aiming to study the biologic behavior of the mastocytomas, an analysis was carried through retrospect of the diagnostic of neoplasms of skin in canines, obtained from biopsies and autopsies sent to the Regional Diagnostic Laboratory (LRD) of the Federal University of Pelotas (UFPEL), between January of 1986 and December of 2005. From this revision two approaches had been carried. An epidemiologic search and another morphologic carried through the rescued diagnostic of mastocitomas in the related period. To an epidemiologic approach, 80 samples of Mastocitomas were used. It was observed that 45 (56.2%) occurred in females, 33 (41.2%) in males and in 2 (2.5%) this data was not informed. These tumors occurred in 16 different breeds. Mastocytomas predominate in animals with 6-10-years-old. Only 25 samples could be used in the morphologic and morphometric evaluation. The neoplasms were processed and histologic slides were stained by Hematoxilin-eosin, Toluidin Blue and Masson trichromic. Cellular proliferation index was inferred with AgNOR. Based on these criteria, mastocitomas were graded. Seven (28%) were classified as grade I, 11 (44%) as grade II and 7 (28%) as grade III. In the morphometric study, mast cells cellular area and perimeter were measured. In order to obtain an improvement in the graduate quality its necessary the association of morphologic and morphometric parameters.

Key-words: Mastocitomas, Canines, AgNOR, Morphometry



## Lista de Figuras

Figura 1 - Mediadores primários e secundários liberados pelos mastócitos. ....	16
Figura 2 - Estádios clínicos do mastocitoma segundo a OMS. ....	20
Figura 3 – Fluxograma de procedimentos para o diagnóstico dos mastocitomas. ....	22
Figura 4 - Protocolo quimioterápico para o tratamento de mastocitomas. ....	25
Figura 5 – Fluxograma de conduta clínica e escolha de tratamento frente ao diagnóstico de mastocitoma. ....	26
Figura 6 - Sistema de graduação histológica de mastocitomas segundo Patnaik <i>et al.</i> 1984. ....	28
Figura 7 – Tela do programa AxioVision 3.1 Zeiss, utilizado para morfometria celular. ....	30
Figura 8 - Exemplo do procedimento para aferição da Morfometria (A) celular e (B) nuclear. ....	31
Figura 9 – Distribuição percentual quanto à localização anatômica dos mastocitomas em 80 animais. ....	34
Figura 10 – Distribuição de acordo com o sexo de 80 animais apresentando mastocitomas. ....	34
Figura 11 – Distribuição dos mastocitomas de acordo com a idade dos caninos acometidos. ....	36
Figura 12 – Distribuição dos mastocitomas de acordo com a raça dos caninos acometidos. ....	36
Figura 13 – Coloração de HE (A) Mastocitoma de grau I, (B) detalhe da morfologia do mastócito tumoral classificado como grau I, (C) Mastocitoma de grau II, (D) detalhe da morfologia do mastócito tumoral classificado como grau II, (E) Mastocitoma de grau III, (F) detalhe da morfologia do mastócito tumoral classificado como grau III. ....	39

Figura 14 – Impregnação argêntica para identificação e contagem de AgNORs  
(A) Mastocitoma de grau I, (B) detalhe da morfologia do mastócito tumoral classificado como grau I, (C) Mastocitoma de grau II, (D) detalhe da morfologia do mastócito tumoral classificado como grau II, (E) Mastocitoma de grau III, (F) detalhe da morfologia do mastócito tumoral classificado como grau III. ....41

Figura 15 - Coloração de Azul de Toluidina (A) Mastocitoma de grau I, (B) Mastocitoma de grau II, (C) Mastocitoma de grau III. Coloração de Tricrômico de Masson (D) Mastocitoma de grau I, (E) Mastocitoma de grau II, (F) Mastocitoma de grau III.....42

## **Lista de Tabelas**

Tabela 1 – Correlação do grau histológico dos mastocitomas com a contagem de AgNOR. ....	40
Tabela 2 – Correlação do grau histológico dos mastocitomas com a morfometria celular e nuclear. ....	43
Tabela 3 – Correlação entre a aparência do núcleo e a morfometria celular e nuclear.....	44
Tabela 4 - Correlações entre as variáveis do estudo segundo teste de Person. ....	44

## SUMARIO

Resumo .....	5
Abstract .....	6
Lista de Figuras .....	7
Lista de Tabelas .....	9
SUMARIO .....	10
1. INTRODUÇÃO .....	12
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	14
2.1. Mastócitos .....	14
2.2. Mastocitomas .....	17
2.2.1. Epidemiologia .....	17
2.2.2. Etiologia .....	17
2.2.3. Sinais Clínicos .....	18
2.2.4. Sinais paraneoplásicos .....	19
2.2.5. Comportamento biológico .....	20
2.2.6. Diagnóstico .....	21
2.2.7. Diagnóstico diferencial .....	23
2.2.8. Prognóstico .....	23
2.2.9. Tratamento .....	24
3. METODOLOGIA .....	27
3.1. Avaliação Epidemiológica .....	27
3.2. Avaliação Morfológica .....	27
3.2.1. Hematoxilina e eosina .....	28
3.2.2. Graduação histológica .....	28
3.2.3. Azul de toluidina .....	28
3.2.4. Tricrômico de Masson .....	29

3.2.5. AgNOR (argiophilic nucleolar organizer region).....	29
3.3. Morfometria .....	30
3.4. Avaliação estatística .....	32
4. RESULTADOS .....	33
4.1. Epidemiologia .....	33
4.1.1. Localização.....	33
4.1.2. Sexo .....	33
4.1.3. Idade.....	35
4.1.4. Raça .....	35
4.2. Graduação histológica dos mastocitomas .....	35
4.3. Avaliação da técnica de impregnação argêntica das regiões organizadoras de nucléolos (AgNOR) .....	40
4.4. Avaliação das fibras de colágeno através do Tricrômico de Masson.....	40
4.5. Morfometria.....	43
4.5.1. Morfometria celular .....	43
4.5.2. Morfometria nuclear.....	43
4.5.3. Correlação dos achados morfométricos e morfológicos .....	44
5. DISCUSSÃO .....	45
5.1. Epidemiologia .....	45
5.2. Graduação histológica .....	47
5.3. AgNOR .....	49
5.4. Morfometria.....	50
5.5. Correlações entre Avaliações Morfológicas e Morfométricas .....	51
6. CONCLUSÕES .....	52
7. BIBLIOGRAFIA .....	53
Apêndice .....	58
Apêndice 1 - Quadro dos resultados de todos os parâmetros em todas as amostras.....	59

## 1. INTRODUÇÃO

Mastocitomas estão entre os neoplasmas cutâneos mais freqüentes em caninos (JONES *et al*, 1997; KRAVIS *et al*, 1996) e são definidos como uma proliferação excessiva de mastócitos neoplásicos (PATNAIK *et al*, 1984). Estes tumores se originam na derme (SIMÕES, 1994) e representam 16 a 21% de todos os tumores cutâneos (VAIL, 1996). Geralmente apresentam recidivas, e mortes relacionadas com o tumor são freqüentes (KRAVIS *et al*, 1996). A escolha do tratamento depende da avaliação das condições físicas do paciente além de fatores como estágio clínico e classificação histológica ou graduação do tumor (PATNAIK *et al*, 1984).

Em cães, os tumores de mastócitos ocorrem com maior freqüência na parte posterior do corpo do animal, sendo flanco e bolsa escrotal os locais mais comuns. O tumor surge como uma massa cutânea saliente com cerca de 2 a 5 cm de diâmetro e altura de 1 a 3 cm. São comuns prurido, eritema, edema e úlceras na região do tumor, devido à liberação de histamina pelas células neoplásicas (SIMÕES, 1994).

O comportamento biológico dos mastocitomas é variável, e por isso, é difícil emitir um prognóstico acurado e determinar a melhor terapia. Diversos fatores são úteis para avaliar o comportamento biológico dos mastocitomas, tais como a taxa de crescimento, sinais sistêmicos, localização do tumor, estágio clínico e grau histológico. Destes, o grau histológico é o de maior importância (JONES *et al*, 1997), pois as células neoplásicas exibem graus variáveis de diferenciação. Essa característica, juntamente com o grau de pleomorfismo e índice mitótico das células, tem sido utilizada subjetivamente na classificação desses tumores com finalidade prognóstica, em três graus: grau I (bem diferenciado), grau II (moderadamente diferenciado) e grau III (pouco diferenciado) (SIMÕES, 1994).

Este trabalho tem por objetivos a avaliação de critérios morfológicos aliados ao uso de critérios morfométricos na busca de métodos mais fidedignos para auxiliar a graduação dos mastocitomas cutâneos em caninos.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Mastócitos

A pele se constitui basicamente de três camadas: epiderme, derme e hipoderme. Origina-se dos folhetos ectodérmico e mesodérmico. Do ectoderma derivam as estruturas epiteliais (epiderme, glândulas, pêlos e unhas) e neurais (melanócitos e nervos), enquanto do mesoderma derivam a derme e a hipoderme (AZULAY & AZULAY, 1997).

A epiderme é constituída por queratinócitos distribuídos em camadas ou estratos e separa-se da derme junção dermo-epidérmica. Já a derme, apresenta estruturas próprias, sendo constituída de substância fundamental, fibras, vasos e nervos, além de folículos pilossebáceos e glândulas sudoríparas. Pode ser dividida em três partes distintas: 1) derme superficial ou papilar, onde predominam as células e os feixes fibrilares colágenos, que são finos e dispostos em sentido vertical; 2) derme profunda, ou reticular, que fica entre a derme papilar e a hipoderme, constituída de feixes colágenos mais grossos, ondulados e dispostos horizontalmente e 3) derme adventicial, que se dispõe em torno dos folículos pilossebáceos, glândulas e vasos. Esta é constituída de feixes finos de colágeno como a derme papilar (AZULAY & AZULAY, 1997).

As células da derme são representadas por células mesenquimais primitivas, fibroblastos, histiócitos e mastócitos (AZULAY & AZULAY, 1997). Paul Erlich, em 1877, descobriu que algumas células denominadas até então plasmócitos quando coradas por corante de anilina, continham grânulos metacromáticos e as chamou de mastócitos (**mastzellen**) (ROMÁN, 2005).

Os mastócitos são as maiores células fixas do tecido conjuntivo, possuem 20 a 30  $\mu\text{m}$  de diâmetro, são ovóides e apresentam núcleo esférico (GARTNER &



HIATT, 1997). Eles possuem citoplasma levemente eosinofílico com núcleo basofílico e relativamente excêntrico (KATSAMBAS *et al*, 1999). Originam-se de células pluripotenciais da medula óssea que expressam o CD34 na sua membrana celular e circulam em baixos títulos no sangue periférico. Estas células migram para os tecidos atraídos por fatores microambientais como fator dos mastócitos, fator de crescimento celular dos mastócitos (SCF ou kit-ligante) e IL-3 (KATSAMBAS *et al*, 1999).

Mastócitos possuem grânulos característicos (GHADIALLY, 1984). Eles não são evidenciados pelas colorações rotineiras, sendo necessárias a colorações especiais. Podem ser poliédricos, fusiformes ou estrelados, entretanto possuem uma característica específica: a presença dos grânulos metacromáticos no citoplasma. Essa capacidade de modificar a cor do corante deve-se a presença de mucopolissacarídeos ácidos. Esses grânulos contêm heparina, uma glicosaminoglicana sulfatada, responsável pela metacromasia característica da célula (AZULAY & AZULAY, 1997). Além da heparina, os grânulos dos mastócitos contêm histamina, proteases neutras, aril-sulfatase, fator quimiotático para eosinófilos (ECF), fator quimiotático para neutrófilos (NCF). Estas substâncias são chamadas de mediadores pré-formados (LEPORI, 2004). Além dos produtos encontrados nos grânulos, os mastócitos sintetizam leucotrienos e prostaglandinas, a partir de precursores do ácido aracdônico. Estes mediadores chamados de secundários são sintetizados após a ativação dos mastócito (LEPORI, 2004), não sendo armazenados nos grânulos dos mastócitos, mas sim produzidos e imediatamente liberados (GARTNER & HIATT, 1997). (Fig.1)

Quanto à morfologia ultraestrutural verifica-se que mastócitos imaturos circulam no sangue como precursores agranulares e desenvolvem grânulos depois que migram para os tecidos conjuntivos. Possuem núcleo grande com cromatina dispersa, nucléolo grande e numerosos ribossomos arranjados em rosetas livres no citoplasma ou ligados ao retículo endoplasmático. Observa-se a presença de grânulos imaturos, os quais apresentam densidade centralmente condensada. Mastócitos maduros contêm grânulos secretores ligados à membrana, possuem núcleo único, com cromatina parcialmente condensada, porém com nucléolo pouco evidente, pequenos complexos de Golgi e dobras na membrana celular. Apresentam grande número de grânulos secretores, além de pequenos ribossomos, muitos dos quais não estão ligados ao retículo endoplasmático. (DVORAK, 1985).

<b>Substância</b>	<b>Tipo de mediador</b>	<b>Fonte</b>	<b>Ação</b>
Histamina	Primário	Grânulo	Aumento da permeabilidade vascular, vasodilatação; contração da musculatura lisa do brônquio; aumento da produção de muco
Heparina	Primário	Grânulo	Anticoagulante (função não esclarecida nos mastócitos)
Condroitino-sulfato	Primário	Grânulo	Função desconhecida
Aril-sulfatase	Primário	Grânulo	Inativação de leucotrienos C limitando a resposta inflamatória
Proteases neutras	Primário	Grânulo	Clivagem de proteína ativação do complemento e aumento da resposta inflamatória
Fator quimiotático de eosinófilos	Primário	Grânulo	Quimiotático para eosinófilos
Fator quimiotático de neutrófilos	Primário	Grânulo	Quimiotático para neutrófilos
Leucotrienos C4 e D4	Secundário	Membrana lipídica	Vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, contração da musculatura lisa do brônquio
Prostaglandinas D2	Secundário	Membrana lipídica	Contração da musculatura lisa brônquica, aumento da secreção de muco

Figura 1 - Mediadores primários e secundários liberados pelos mastócitos.

Mastócitos maduros estão localizados preferencialmente na pele, sistema respiratório, trato gastrintestinal e gênito-urinário próximos a vasos sanguíneos e linfáticos. São as células-chave nas reações alérgicas agudas e também têm um importante papel nas reações crônicas (MOTA, 1995).

Os grânulos característicos dos mastócitos humanos contêm estruturas lamelares ou membranosas que estão dispostas em rolos cilíndricos semelhantes a papiros, e formações membranosas laminadas freqüentemente vistas em uma matriz eletrodensa. Em raras ocasiões, os grânulos contêm material particulado (GHADIALLY, 1984).

Mastócitos são encontrados em peixes, anfíbios, répteis, pássaros e uma ampla variedade de mamíferos (GHADIALLY, 1988). Há dois tipos de mastócitos fenotipicamente diferentes. Mastócitos da mucosa (MM) e mastócitos dos tecidos conjuntivos (MC). Os MC contêm heparina e estocam grandes quantidades de histamina, não são T-dependentes e requerem a C-kit bem como outros fatores de crescimento (MOTA, 1995).

## **2.2. Mastocitomas**

Mastocitomas são definidos como uma proliferação excessiva de mastócitos neoplásicos (JONES *et al*, 1997) e originam-se na derme (GOLDSCHMIDT & HENDRICK, 2002). Compreendem um grupo de processos caracterizados por um aumento de mastócitos na pele e em outros órgãos e sistemas. O sítio mais freqüentemente afetado em pacientes com qualquer forma de mastocitoma é a pele (ROMÁN, 2005)

O crescimento tumoral de mastócitos pode ter várias denominações: tumor de células mastocitárias, mastocitoma ou sarcoma mastocitário (HOSPITAL VETERINÁRIO DO PORTO, 2003).

### **2.2.1. Epidemiologia**

Em um estudo da prevalência de tumores de pele em caninos, MERLO (2000) mostra que os mastocitomas estiveram entre os neoplasmas mais freqüentes com prevalência igual a 20%. Em estudo semelhante compreendendo um período de 18 anos, DIAS (2004) mostra uma incidência de 14%, sendo este o neoplasma mais freqüente em cães.

Mastocitomas podem ocorrer em qualquer raça, porém se descreve uma maior incidência em cães da raça Boxer, Boston terrier, Bullmastiff, Bulldog, Setter Inglês, Labrador, Golden Retriever, Teckel e Weimaraner (MACY, 1986; OGILVIE & MOORE, 1995). Aproximadamente 25% dos mastocitomas diagnosticados na clínica veterinária ocorrem em cães da raça Boxer (MERLO, 2000). Não existe predisposição por sexo (SCOTT *et al*, 1996). Estes neoplasmas são diagnosticados com maior freqüência em cães com idade média avançada, porém não se descarta sua ocorrência em animais jovens (MERLO, 2000). Ocorrem principalmente em cães com idade média de 9 anos, contudo existem relatos em cães com 3 semanas a 19 anos (SCOTT *et al*, 1996). Todos os animais jovens apresentaram mastocitomas bem diferenciados (MERLO, 2000).

### **2.2.2. Etiologia**

Não foi encontrado um padrão hereditário na prevalência dos mastocitoma e a sua etiologia é ainda desconhecida. Em raras ocasiões foi encontrada uma associação entre o tumor e inflamações crônicas ou irritativas da pele. Não existem evidências de causas virais (HOSPITAL VETERINÁRIO DO PORTO, 2003).

### 2.2.3. Sinais Clínicos

A aparência clínica do mastocitoma pode ser muito variada e assemelhar-se a numerosas lesões cutâneas, de etiologia neoplásica ou não. Por isso este tumor é denominado por muitos autores como “o grande imitador” (MERLO, 2000). Em geral a aparência clínica de um mastocitoma não permite estabelecer seu grau de malignidade e nem definir sua evolução. Existem tumores que se mantêm estáveis durante meses ou anos antes de desencadear um processo proliferativo. Em outras ocasiões se comportam de forma agressiva desde o princípio (DOBSON & GORMAN, 1988; OGILVIE & MOORE, 1995).

É habitual que os proprietários descrevam que as massas observadas no animal aumentam e diminuem de tamanho de forma periódica (ROGERS, 1993). Estas diferenças de tamanho são conseqüência do edema local e da inflamação produzida pela liberação de histamina e enzimas proteolíticas. Este dado na anamnese permite ao clínico suspeitar da presença de um mastocitoma (DOBSON & GORMAN, 1988).

Em algumas ocasiões a manipulação mecânica do tumor durante o exame físico e a retirada de amostras para exames complementares pode provocar a degranulação massiva dos mastócitos levando a uma rápida inflamação da região e surgimento de eritema (MACY, 1986). Esta reação é denominada “Sinal de Darier” e possui importante significado para o diagnóstico clínico do mastocitoma (OGILVIE & MOORE, 1995).

Na forma cutânea, os mastocitomas se apresentam como nodulações avermelhadas na derme, não encapsuladas e de tamanho variando de 1-30 cm de diâmetro (MADEWELL *et al*, 1987; GOLDSMIDT & HENDRICH, 2002; SHOFER, 1992). Mais raramente, o mastocitoma pode se apresentar na forma visceral disseminada e caracterizar-se principalmente por massas neoplásicas no baço, fígado, pulmão e linfonodos (POLLACK *et al*, 1991).

Em cães, os tumores de mastócitos ocorrem com maior freqüência na parte posterior do corpo do animal, sendo flanco e escroto os locais mais comuns. O tumor é percebido como uma massa saliente com cerca de 2 a 5 cm de diâmetro e altura de 1 a 3 cm. Também devido à liberação de histamina pelas células neoplásicas, são comuns: prurido, eritema e úlceras (JONES *et al*, 1997).

Os mastocitomas cutâneos aparecem de duas formas distintas. Uma consiste de uma massa de 1-10 cm de diâmetro, bem circunscrita, elevada e firme, podendo

ou não ser avermelhada. Os bordos desta massa podem se assemelhar a uma bolha e o centro pode ser amarelo ou ulcerado. Esta forma nodular ocorre com maior frequência nos membros posteriores, abdômem, tórax e membros anteriores (MADEWELL *et al.*, 1987; GOLDSMIDT & HENDRICH, 2002; SHOFER, 1992). A cabeça, o pescoço, escroto, períneo e cauda são menos afetados (GOLDSMIDT & HENDRICH, 2002; SHOFER, 1992).

A segunda forma da doença consiste de uma massa mole, pouco definida que geralmente possui pêlos. Raramente é ulcerada ou avermelhada e pode ser confundida com um lipoma (HOSPITAL VETERINÁRIO DO PORTO, 2003)

De um modo geral, as metástases ocorrem nos linfonodos regionais em aproximadamente 76% dos casos. Órgãos como o baço, fígado e medula óssea são freqüentemente afetados por metástases. Com menor freqüência, acomete pulmões, coração e rim (MACY, 1986, O'KEEFE, 1987).

#### **2.2.4. Sinais paraneoplásicos**

De forma semelhante aos mastócitos normais, os mastócitos neoplásicos apresentam granulações citoplasmáticas com quantidade variável de aminas vasoativas como heparina e histamina. Muitas vezes estas substâncias podem estar aumentadas 25 a 50 vezes em relação a um mastócito típico (ROGERS, 1986). A liberação maciça dessas substâncias pode causar graves efeitos sistêmicos como a ulceração gastrointestinal (VAN PELT, 1986), e coagulopatias (MACY, 1986). A liberação das substâncias químicas dos mastócitos também é responsável pelos sinais referidos na doença como hemorragias, inchaço, prurido, vômitos, diarreia e, em casos raros, choque e colapso (HOSPITAL VETERINÁRIO DO PORTO, 2003). É importante considerar que em algumas situações estes sinais descritos como paraneoplásicos podem chegar a provocar um quadro mais grave e urgente que o próprio tumor (MERLO, 2000).

Do ponto de vista clínico, as três conseqüências mais importantes do mastocitoma são: o surgimento de úlceras gastroduodenais, coagulopatias e o retardo nos processos de cicatrização (LEMARIE *et al.*, 1995). Assim em 83% dos casos de mastocitomas em caninos, ocorrem úlceras gastroduodenais, localizadas fundamentalmente no fundo gástrico, piloro e porção anterior do duodeno (LAMARIE *et al.*, 1995; MACY, 1986). A presença de úlceras pode cursar de forma assintomática e produzir anorexia, vômitos (com ou sem sangue), diarreia, melena e

anemia. Quando perfuradas, as úlceras podem produzir peritonite (ROGERS, 1993). Em certas ocasiões os sinais clínicos produzidos pelas úlceras gastroduodenais pode ser o primeiro motivo da consulta, visto que os proprietários não relacionam a presença de vômitos ao surgimento de uma massa cutânea que pode ter tido uma evolução lenta e pouco aparente (O'KEEFE, 1990).

Alterações na coagulação são freqüentemente associadas aos mastocitomas. Raramente aparecem coagulopatias sistêmicas com alterações nos fatores de coagulação (LEMARIE *et al*, 1995) a não ser que ocorra uma coagulação intravascular disseminada associada ao desenvolvimento do tumor (MERLO, 2000). A liberação de heparina por parte dos mastócitos neoplásicos provoca problemas locais de coagulação que se manifestam como tendência a hemorragias durante a retirada cirúrgica. Nesses casos, quando se realiza uma aspiração com agulha fina com finalidade diagnóstica, pode ocorrer sangramento persistente e de difícil controle (O'KEEFE, 1990).

### 2.2.5. Comportamento biológico

Diversos fatores são úteis para avaliar o comportamento biológico dos mastocitomas como a taxa de crescimento, sinais sistêmicos, localização do tumor, estadio clínico e grau histológico. Os critérios utilizados para o estadiamento dos tumores estão descritos na (Fig.2).

Estadio	Características
I	Lesão solitária na derme e tecido subcutâneo sem comprometimento ganglionar nem evidência de enfermidade sistêmica.
II	Lesão na derme e subcutâneo com comprometimento de gânglio regional ou várias lesões na derme sem evidência de metástase.
III	Lesões múltiplas e recorrentes ou uma grande massa infiltrante, com ou sem comprometimento ganglionar. Sem evidência de enfermidade sistêmica ou metástase.
IV	Tumores com metástase e enfermidade sistêmica

Figura 2 - Estádios clínicos do mastocitoma segundo a OMS.

O comportamento biológico dos mastocitomas varia de tumores de baixa malignidade até tumores extremamente malignos. Todos são considerados potencialmente malignos, sendo que 50% dos casos são realmente malignos (O'KEEFE, 1990).

### 2.2.6. Diagnóstico

O diagnóstico do mastocitoma é baseado essencialmente na citologia ou no exame histopatológico das lesões (MACY, 1986). (Fig.3)

Patnaik *et al* (1984) desenvolveram uma classificação baseada no grau de anaplasia celular, avaliando critérios como diâmetro de núcleo e citoplasma, frequência de figuras de mitose, grau de pleomorfismo celular, natureza dos grânulos citoplasmáticos e a celularidade. Estas características têm sido utilizadas subjetivamente na classificação desses tumores com finalidade prognostica. Eles tem sido classificados em três graus. Os tumores de grau I, representam 36% dos casos; os de grau II ou grau intermediário representam 45% dos casos e os de grau III, pouco diferenciados ou anaplásicos correspondem a 20-30% dos casos (PATNAIK *et al.* 1984).

Como métodos adicionais usados para o diagnóstico dos mastocitomas são utilizadas as colorações histoquímicas como azul de toluidina, tricrômico de Masson, azul alciano além da rotineira coloração de HE usada para graduação histológica dos tumores (SIMÕES *et al.*, 1994). Estes métodos são importantes principalmente para auxiliar o diagnóstico dos tumores pouco diferenciados (GOLDSCHMIDT & HENDRICK, 2002).

Novos métodos e critérios têm sido inseridos na definição prognóstica do tumor. Dentre eles estão os métodos imunohistoquímicos com especificidade para marcar mastócitos tumorais (OZAKI *et al.*, 2002). Além destes, tem sido de valia a coloração com nitrato de prata para evidenciar a presença de regiões organizadoras nucleolares argirofílicas (AgNOR), as quais possibilitam a mensuração da proliferação celular (GOLDSCHMIDT & HENDRICK, 2002). A técnica de AgNOR permite marcar o DNA ribossomal e seus níveis de transcrição e com isso, visualizar o nucléolo e avaliar a variação no tamanho do mesmo (PLOTON *et al.*, 1986). Estudos com a técnica em neoplasias humanas mostram que o número de AgNORs em cada núcleo possui correlação com o grau histológico. Quanto maior o número de pontos intranucleares impregnados pela prata, pior é o prognóstico (BOSTOCK *et al.*, 1989).

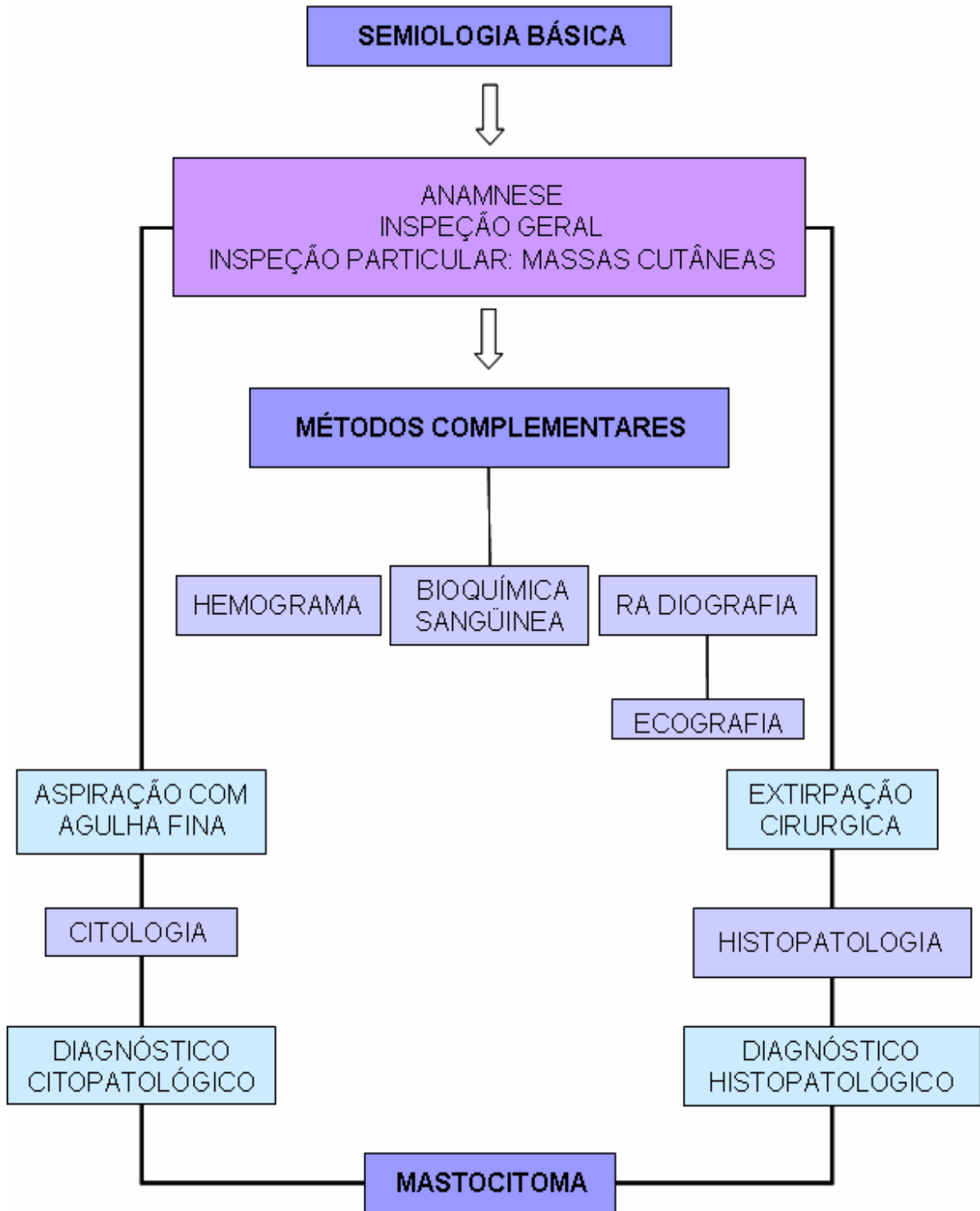


Figura 3 – Fluxograma de procedimentos para o diagnóstico dos mastocitomas.



### **2.2.7. Diagnóstico diferencial**

Em geral se define que os mastocitomas podem se “parecer com qualquer coisa e se comportar como qualquer coisa” (OGILVIE & MOORE, 1995) por isso devem ser incluídos na lista de diagnóstico diferencial de qualquer massa cutânea (MERLO, 2000).

Em algumas ocasiões os defeitos de coagulação local, causados pelos mastocitomas podem ser tão importantes que conferem à massa tumoral uma aparência de hematoma ou tumor vascular (MERLO, 2000).

### **2.2.8. Prognóstico**

Para determinação do prognóstico do paciente com mastocitoma é recomendado o exame físico, com palpação de linfonodos e investigação quanto à presença de esplenomegalia e hepatomegalia, com objetivo de definir o estágio clínico do tumor. Além do exame físico são aconselhados exames complementares como aspirado dos linfonodos com o uso de agulha fina, para avaliação citológica (LANGENBACH *et al.*, 2001), radiografias e ultrassonografias com a finalidade de detectar a neoplasia sistêmica (O’KEEFE, 1990).

De todos os fatores prognósticos avaliados, o grau histológico é o mais importante. Em cães existe uma correlação entre o grau histológico e o tempo de sobrevivência do animal (PATNAIK *et al.*, 1984; ROGERS, 1993). Os tumores mais anaplásicos têm um maior potencial metastático e maior tendência a se disseminar e produzir patologias sistêmicas que os tumores classificados como grau I e II. Os animais com mastocitomas de grau I têm um tempo de sobrevivência duas vezes maior que os que apresentarem o tumor de grau II e seis vezes maior que portadores do tumor de grau III (PATNAIK *et al.*, 1984).

Outros fatores que influenciam o prognóstico são a raça, localização e duração da enfermidade (MACY, 1986; ROGERS, 1993). Cães da raça Boxer possuem uma tendência maior a desenvolver mastocitomas bem diferenciados. Em cães, os tumores localizados na região perineal, inguinal, escrotal e prepúcio tendem a um comportamento mais agressivo, condicionando o portador a um menor tempo de sobrevivência. Quanto à duração da enfermidade, observa-se que massas pequenas crescem lentamente e permanecem localizadas durante longos períodos de tempo e apresentam melhor prognóstico que os tumores de crescimento rápido, com infiltração e com metástases (GERRITSEN *et al.*, 1998).

Os tumores de grau I são geralmente menos agressivos e podem ser tratados com cirurgia. Os de grau II possuem malignidade moderada e são tratados com cirurgia agressiva com amplas margens de ressecção. Estes tumores possuem uma reduzida taxa de metastização. Os de grau III são bastante agressivos e metastizam freqüentemente (HOSPITAL VETERINARIO DO PORTO, 2003).

Os tumores localizados nos membros possuem melhor prognóstico do que os localizados no tronco e pescoço, sendo que as neoplasias localizadas nas junções muco-cutâneas, como lábios, pálpebras, prepúcio e vulva são as que possuem pior prognóstico (HOSPITAL VETERINARIO DO PORTO, 2003).

### **2.2.9. Tratamento**

A busca de um protocolo terapêutico mais adequado para o tratamento dos mastocitomas caninos tem sido um dos principais objetivos da oncologia veterinária (MERLO, 2000).

Mastocitomas podem ser tratados com cirurgia, radioterapia, quimioterapia ou a combinação dos três (WILLEMSE, 1995; SCOTT *et al.*, 1996). O tratamento cirúrgico com amplas margens cirúrgicas é recomendado para mastocitomas localizados (TURREL *et al.*, 1988; VAIL, 1996). A radioterapia é utilizada em mastocitomas com excisão incompleta, recorrente e com metástases nos linfonodos regionais (FRIMBERGER *et al.*, 1997). Os agentes quimioterápicos, principalmente glicocorticóides, são usados para tratar mastocitomas sistêmicos ou quando não é possível realizar a ressecção dos mesmos (O'KEEFE, 1990; ROGERS, 1996).

Os mastocitomas geralmente apresentam recidivas e mortes relacionadas com o tumor são freqüentes (KRAVIS *et al.*, 1996). A escolha de tratamento vai depender das condições do paciente além de fatores como classificação histológica, estadio clínico e grau do tumor (VAIL, 1996). (Fig.5)

O tratamento de eleição para massas solitárias e bem delimitadas é a cirurgia, esta realizada com amplas margens cirúrgicas, no mínimo de 3cm nas laterais e em profundidade (FOX, 1998). Alguns autores recomendam ampliar a margem para 5cm se a zona de localização do tumor permitir (FRIMBERGER *et al.*, 1997). Com cirurgias conservadoras, mais de 50% dos mastocitomas apresentam recidivas (MACY, 1986). Com cirurgias agressivas o índice de recidivas alcança 30% dos casos (LAMARIE *et al.*, 1995; OGILVIE & MOORE, 1995). É recomendado re-

intervenção imediata caso as margens cirúrgicas da lesão mostrem infiltração após a avaliação histopatológica (ROGERS, 1996).

Em casos de mastocitoma de grau II ou de diferenciação intermediária, é recomendada a utilização de radioterapia quando não for possível a extirpação completa (FRIMBERGER *et al.*, 1997). Em mastocitomas múltiplos, disseminados, em casos de neoplasia sistêmica, tumores não operáveis e tumores anaplásicos extirpados se recomenda o uso de quimioterapia sistêmica (OGILVIE & MOORE, 1995; ROGERS, 1993).

Os corticóides são os fármacos que tem demonstrado maior eficácia no tratamento dos mastocitomas (Fig.4) (LEMARIE *et al.*, 1995; OGILVIE & MOORE, 1995). A maior parte dos animais manifesta uma resposta inicial positiva sendo uma boa alternativa de tratamento nos casos de mastocitomas de grande tamanho. Recomenda-se o uso de prednisona durante 10 a 15 dias para diminuir o tamanho do tumor e realizar o procedimento cirúrgico com abordagem mais segura (MERLO, 2002). Outros protocolos quimioterápicos sugerem o emprego de vinblastina, ciclofosfamida, hidroxiurea ou lomustina combinados com a prednisona (GERRITSEN *et al.*, 1998; TYLER *et al.*, 1999).

Fármaco		Dose
Prednisona	Protocolo A	50mg/ m <sup>2</sup> / 24h, por 7 dias. 20mg/ m <sup>2</sup> / 48h
	Protocolo B	2mg/ kg/ 24h, por 7 dias. 1mg/ kg/ 24h, por 7 dias. 0,5mg/ kg/ 24h, por 14 dias.
	Protocolo C	40 mg/ m <sup>2</sup> / 24h, por 7 dias. 20mg/ m <sup>2</sup> / 24h, por 14 dias. 20mg/ m <sup>2</sup> / 48h, por 14 dias. 10mg/ m <sup>2</sup> / 48h, por 6 meses.
Prednisona + vinblastina		Prednisona: 2mg/ kg/ 24h. Distribuição gradual em 12 a 26 semanas. Vinblastina: 2mg/ m <sup>2</sup> / semana durante 4 semanas e em semanas alternadas o resto do tratamento
Clorambucilo		0,2 mg/ kg/ 24h durante 10 dias; 0,1 mg/ kg/ 24h

Figura 4 - Protocolo quimioterápico para o tratamento de mastocitomas.

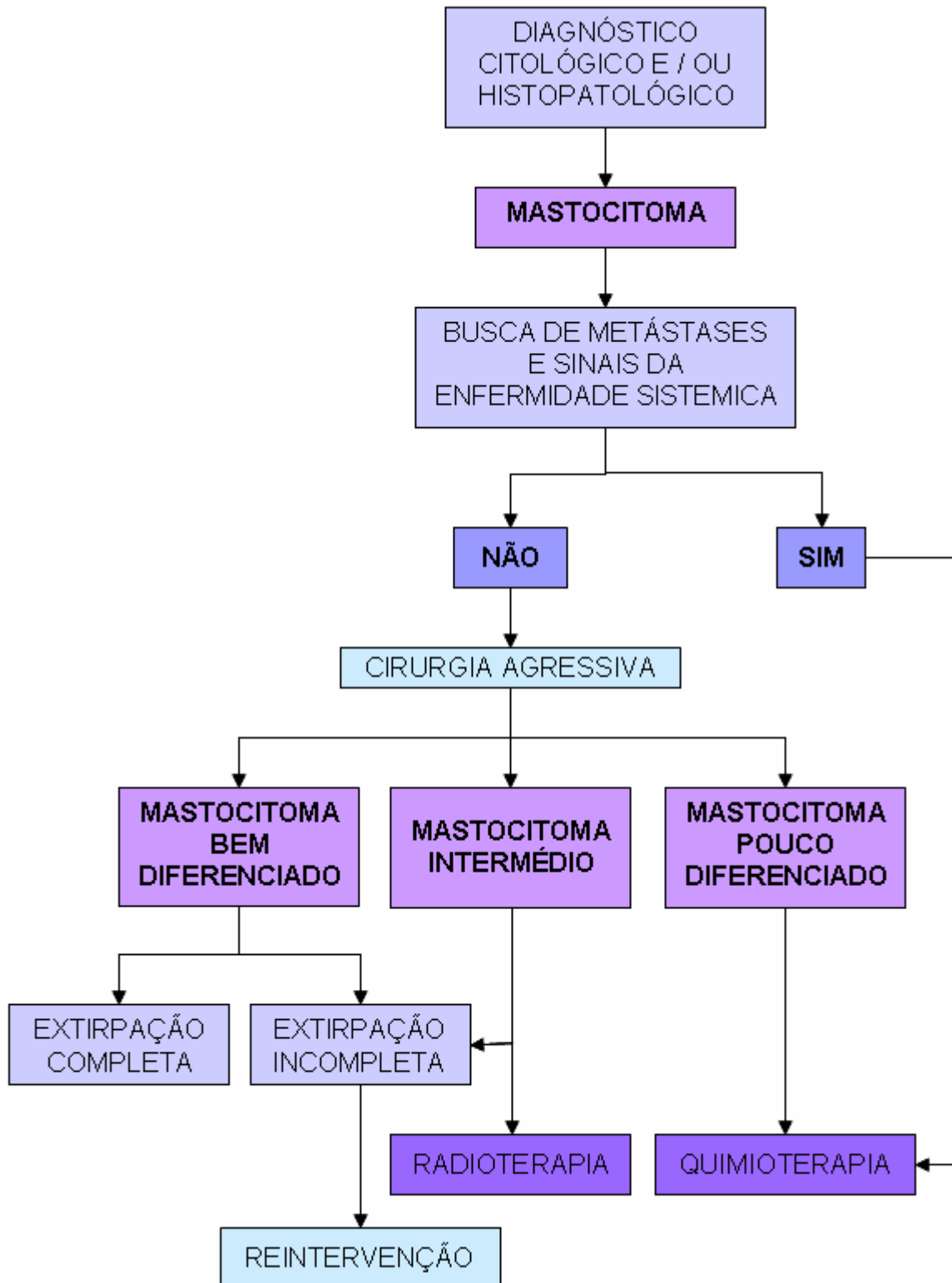


Figura 5 – Fluxograma de conduta clínica e escolha de tratamento frente ao diagnóstico de mastocitoma.

### **3. METODOLOGIA**

Foi realizada uma análise retrospectiva dos diagnósticos de neoplasmas de pele em caninos, provenientes de biópsias e necropsias enviadas ao Laboratório Regional de Diagnóstico (LRD) da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL), emitidos entre janeiro de 1986 e dezembro de 2005. A partir desta revisão foram realizadas duas abordagens, uma epidemiológica buscando os diagnósticos firmados ao longo dos 19 anos e outra morfológica realizada através avaliação das amostras de mastocitomas resgatadas nesse levantamento, no referido período.

#### **3.1. Avaliação Epidemiológica**

A partir da revisão desses diagnósticos, criou-se um banco de dados com objetivo de atender as necessidades de investigação propostas pelo trabalho. Para tal utilizou-se um protocolo de coleta de dados dividido em duas partes, a primeira referente à lesão, buscando-se dados sobre a localização anatômica, evolução e sinais clínicos. A segunda parte referiu-se aos dados de identificação do paciente como sexo, idade e raça.

#### **3.2. Avaliação Morfológica**

Dentre os casos diagnosticados como mastocitomas, foram resgatadas 25 amostras para realização de métodos histoquímicos. Foram utilizadas as colorações de hematoxilina e eosina, azul de toluidina e Tricrômico de Masson para determinação do grau histológico, avaliação da granulação metacromática e avaliação da degeneração das fibras colágenas, respectivamente. Realizou-se também a impregnação argêntica para avaliação da presença de regiões organizadoras de nucleolares argirofílicas (AgNORs).

### 3.2.1. Hematoxilina e eosina

A partir dos blocos de parafina foram obtidas secções de 5µm de espessura de cada material para coloração com hematoxilina e eosina (H&E) (CULLING *et al.*, 1985) e graduação histológica dos tumores.

### 3.2.2. Graduação histológica

Os mastocitomas foram graduados seguindo os critérios estabelecidos por Patnaik *et al.* (1984). Foram avaliados, entre os critérios propostos: quantidade de citoplasma, forma e diferenciação da célula, forma e cor do núcleo, número de nucléolos, número de figuras de mitose e outras alterações como edema, necrose e alterações vasculares. A partir da avaliação destes dados foi possível a diferenciação dos mastocitomas em três graus histológicos: grau I (bem diferenciado), grau II (moderadamente diferenciado) e grau III (pobrememente diferenciado). (Fig.6)

Grau	Critério de graduação histológica
I	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mastócitos bem diferenciados na derme superficial ou profunda dispostos em cordões ou pequenos grupos;</li> <li>• Células redondas a ovais ou uniformes com citoplasma abundante e bem delimitado;</li> <li>• Núcleo redondo e ausência de mitoses;</li> </ul>
II	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Moderada a altamente celular com invasão da derme profunda e subcutâneo;</li> <li>• Células redondas a ovais a moderadamente pleomórficas com raras células binucleadas;</li> <li>• Citoplasma distinto a indistinto;</li> <li>• Núcleo redondo com um ou mais nucléolos visíveis; Raras figuras mitóticas (0 a 2/ campo de maior aumento - 400X);</li> <li>• Áreas de edema e necrose;</li> </ul>
III	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Localização extensiva na derme e subcutâneo;</li> <li>• Células pleomórficas arranjadas em tapetes ou cordões estreitos;</li> <li>• Citoplasma indistinto;</li> <li>• Núcleo redondo com um ou mais nucléolos proeminentes; 3 a 6 mitoses/CMA;</li> <li>• Células multinucleadas e células gigantes;</li> <li>• Edema, hemorragia e necrose freqüentes;</li> </ul>

Figura 6 - Sistema de graduação histológica de mastocitomas segundo Patnaik *et al.* 1984.

### 3.2.3. Azul de toluidina

De cada amostra do tumor, incluído em parafina foram obtidos cortes com 5µm de espessura, os quais foram desparafinados, hidratados com água destilada e posteriormente imersos por 1 a 2 minutos em solução de toluidina a 0,1%. Após isso,

as lâminas foram lavadas em água destilada e os cortes desidratados e montados (CULLING *et al.*, 1985).

Através desta técnica torna-se possível a visualização dos grânulos presentes no citoplasma dos mastócitos, os quais exibem a propriedade de metacromasia (CULLING *et al.*, 1985). Este procedimento auxilia ou confirma a gradação histológica dos mastocitomas (KLATT *et al.*, 1983).

#### **3.2.4. Tricrômico de Masson**

Os cortes fixados em formalina 10% foram re-fixados em líquido de Bouin e aquecidos a 56° C por uma hora.

Cortes de 5µm de espessura foram obtidos de cada um dos mastocitomas, e após desparafinados, foram lavados em água corrente, até desaparecer a cor do fixador de Bouin. Posteriormente foram lavados em água destilada.

Após, os cortes foram corados com Hematoxilina férrica de Harris, lavadas em água da torneira e água destilada e coradas pela Fucsina Ácida-escarlata de Biebrich. Foram então submetidos à lavagem para retirada do excesso de corante e tratados pelo ácido fosfotúngstico-ácido-fosfolíbdico. Sem lavagem, foram corados pelo azul de anilina-acética, lavados em água destilada e após em solução de ácido acético 1% e em água destilada. Foram então desidratadas e montadas.

Através da técnica foi possível quantificar o tecido conjuntivo, bem como avaliar suas relações topográficas com os mastócitos. Buscou-se ainda uma correlação entre o grau atribuído ao tumor e a degeneração das fibras colágenas do mesmo.

#### **3.2.5. AgNOR (argiophilic nucleolar organizer region)**

Para demonstração das regiões organizadoras nucleolares argiofílicas foram obtidos cortes de 5µm de espessura de cada mastocitoma. Estes foram desparafinados e hidratados em água deionizada e posteriormente foram imersos em solução de gelatina a 2% e ácido fórmico a 1% em água deionizada e solução de nitrato de prata a 50% na proporção 1:2. As lâminas permaneceram imersas nesta solução durante 45 minutos em temperatura ambiente. Após, foram lavadas em água deionizada por 1 minuto, desidratadas, clarificadas e montadas (BOSTOCK *et al.*, 1989; SIMÕES *et al.*, 1994; KRAVIS *et al.*, 1996).

Para definir a frequência de AgNOR, foi escolhida uma área representativa do tumor, definida por uma área com pelo menos 10 células tumorais entre a junção

entre o tecido normal e as células neoplásicas. Foram contados os pontos escuros no interior dos nucléolos em 100 mastócitos tumorais, em campos aleatórios em aumento de 1000 vezes. A frequência foi obtida dividindo-se o número de AgNORs por 100 (KRAVIS et al.,1996).

### 3.3. Morfometria

As amostras obtidas através de processamento histoquímico foram analisadas num microscópio NIKON® Labophot, acoplado a um sistema de vídeo e câmera Nikon® Coolpix 4500. Foram avaliadas 20 células de cada amostra de tumor em campos variados e em aumento de 40X, coradas pela técnica de AgNOR através do programa AxioVision 3.1 Zeiss (Fig. 7). As imagens foram utilizadas no formato Zeiss Vision Image (\*.zvi) e as medições calibradas em micrômetros. De cada célula foi delimitada a área do núcleo e da célula. Dentre os parâmetros avaliados e oferecidos pelo software, utilizaram-se neste estudo a área e o perímetro do núcleo e da célula (Fig. 8).

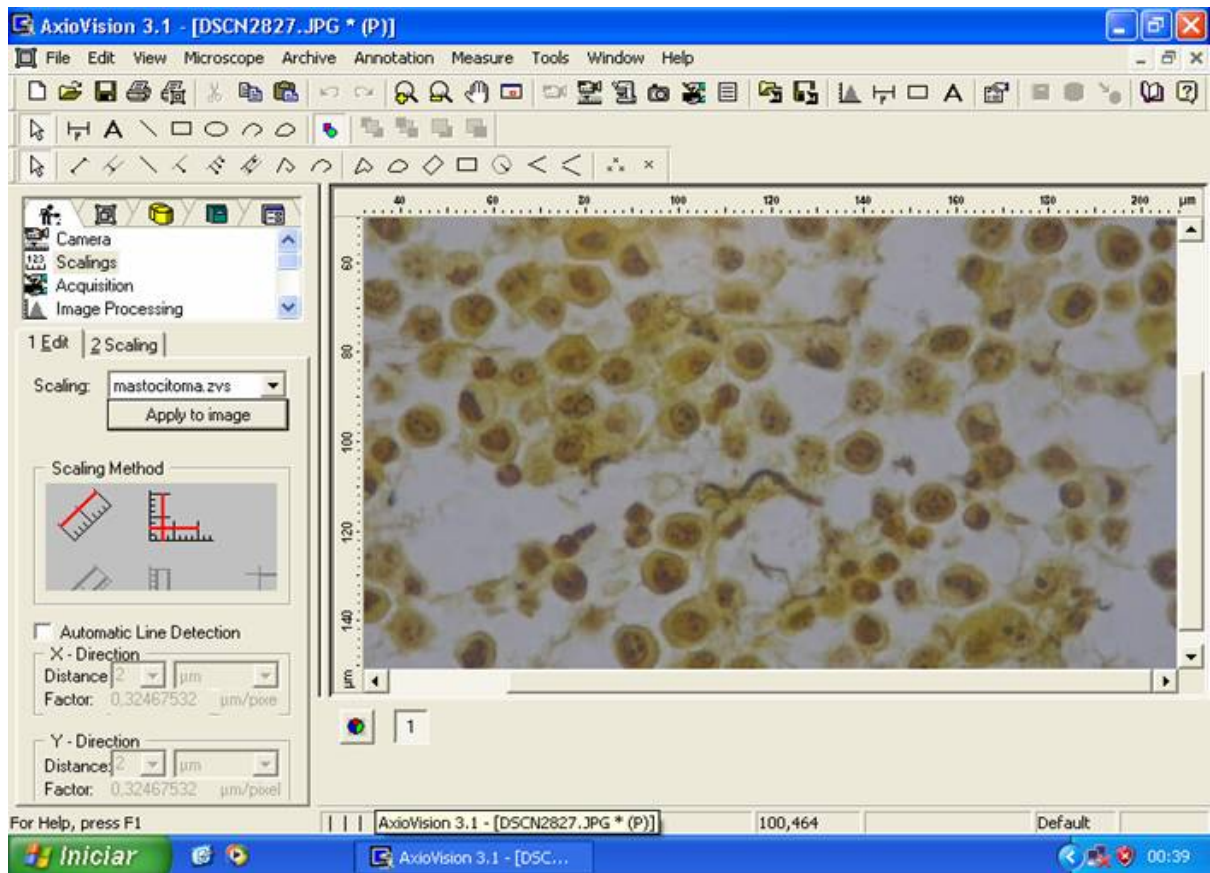


Figura 7 – Tela do programa AxioVision 3.1 Zeiss, utilizado para morfometria celular.



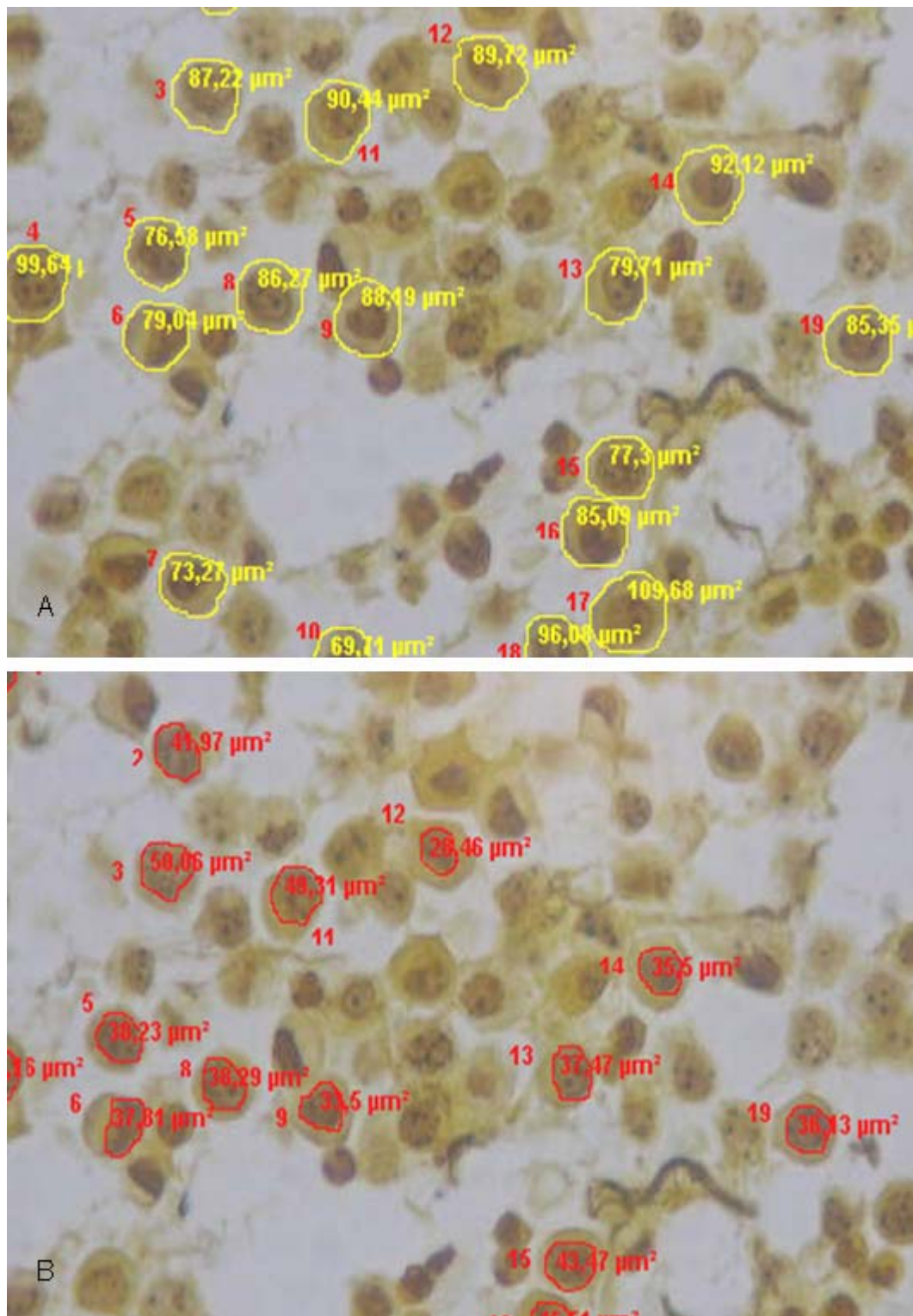


Figura 8 - Exemplo do procedimento para aferição da Morfometria (A) celular e (B) nuclear.

### **3.4. Avaliação estatística**

Foram correlacionadas as variáveis: grau histológico, contagem de AgNOR, medidas da área da célula, perímetro da célula, medidas da área do núcleo e perímetro do núcleo através do Teste de Pearson.

Para as variáveis independentes: grau histológico e aparência do núcleo foram analisadas as variáveis dependentes: medidas da área da célula, medidas do perímetro da célula, medidas da área do núcleo e medidas do perímetro do núcleo. Através de análise de variância com posterior comparação das medidas através do teste de Tukey.

Para gerar a análise foi utilizado o programa Statistix®.

## **4. RESULTADOS**

### **4.1. Epidemiologia**

A partir da análise retrospectiva de neoplasmas de pele foram obtidos 3.778 diagnósticos anatomopatológicos em caninos. Destes 1.120 referentes a processos dermatológicos, dentre os quais, 593 referiam-se a processos neoplásicos e 80 destes diagnósticos foram firmados como mastocitomas.

#### **4.1.1. Localização**

Do total de 80 casos estudados, os mastocitomas ocorreram com maior freqüência no tronco (33 casos), seguido de membros (15 casos) e região da cabeça (8 casos). Os tumores foram encontrados em 16 sítios anatômicos distintos.

Dos casos encontrados no tronco, 7 estavam localizados no abdômen, 5 no tórax, 5 no dorso, 3 no flanco, 1 no ventre, 2 na região inguinal, 6 na bolsa escrotal, 1 no prepúcio, 1 na vulva e 2 na cauda. Entre os casos que o tumor estava presente nos membros, 6 tiveram localização nos membros anteriores e 9 nos membros posteriores. Na região da cabeça, 1 caso foi localizado no pescoço, 3 na face, 3 na orelha e 1 na pálpebra. Dezesete animais apresentaram mastocitomas em múltiplas localizações e em oito casos este dado não foi informado. (Fig.9)

#### **4.1.2. Sexo**

Dos 80 mastocitomas obteve-se uma relação entre machos e fêmeas de 0,73:1, sendo que 33 (41,2%) representaram machos e 45 (56,2%) fêmeas. Em 2 (2,5%) animais o sexo não foi informado. Observou-se uma maior ocorrência de mastocitomas em fêmeas. (Fig.10)

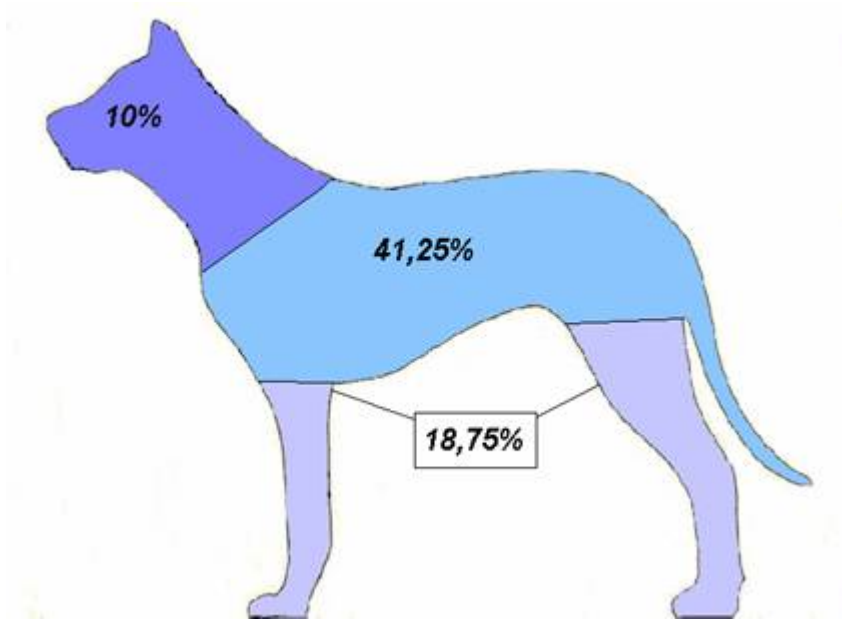


Figura 9 – Distribuição percentual quanto à localização anatômica dos mastocitomas em 80 animais.

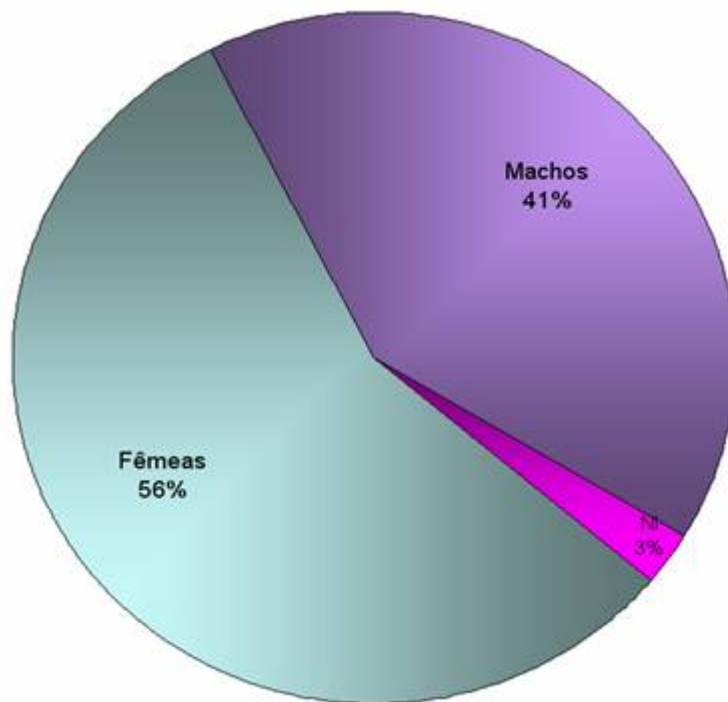


Figura 10 – Distribuição de acordo com o sexo de 80 animais apresentando mastocitomas.

### 4.1.3. Idade

Para avaliação da idade dos animais com mastocitoma, foram estabelecidos cinco grupos, correspondendo a faixas de idade. (Fig.11)

Quanto às idades dos cães com mastocitoma, 2 (2,5%) pertenciam a faixa de 0-1 ano, 22 (27,5%) estavam na faixa de 1-5 anos, 37 (46,2%) entre 6-10 anos e 14 (17,5%) apresentavam idade igual ou superior a 11 anos. Cinco (6,2%) das fichas de protocolos para encaminhamento do material ao laboratório não informavam a idade do animal. A idade média dos cães com mastocitoma foi de 6,4 anos.

### 4.1.4. Raça

Quanto à raça, mastocitomas foram diagnosticados em 16 raças, entre elas Boxer (14 – 17,5%), Beagle (3 – 3,75%), Bull Terrier (1 – 1,25%), Cocker (2 – 2,5%), Collie (1 – 1,25%), Daschshund (2 – 2,5%), Doberman (2 – 2,5%), Dogue Alemão (2 – 2,5%), Fila (8 – 10%), Fox (3 – 3,75%), Labrador (1 – 1,25%), Pastor Alemão (1 – 1,25%), Pequinês (1 – 1,25%), Pincher (3 – 3,75%), Pointer (1 – 1,25%) e Rotweiler (3 – 3,75%). Porém foi predominante em cães sem raça definida com 28 casos (35%), seguidos por cães das raças Boxer e Fila. (Fig.12)

## 4.2. Graduação histológica dos mastocitomas

Do total mastocitomas diagnosticados foram resgatados 25 casos para classificação pelo grau histológico através do método estabelecido, usando como referências os critérios definidos por Patnaik (1984).

As amostras examinadas em HE foram distribuídas conforme anaplasia celular e grau de diferenciação do tumor e assim classificadas em graus I, II e III (Fig. 13).

Foram encontrados 7 mastocitomas classificados como grau I, 11 de grau II e 7 classificados como grau III.

As amostras classificadas como de grau II foram mais numerosas (44%) e revelaram morfologicamente um grau intermediário de anaplasia em suas células. Nas classificadas como graus I e III foi observado um mesmo número de amostras, representando cada grupo 28% do total de materiais analisados.

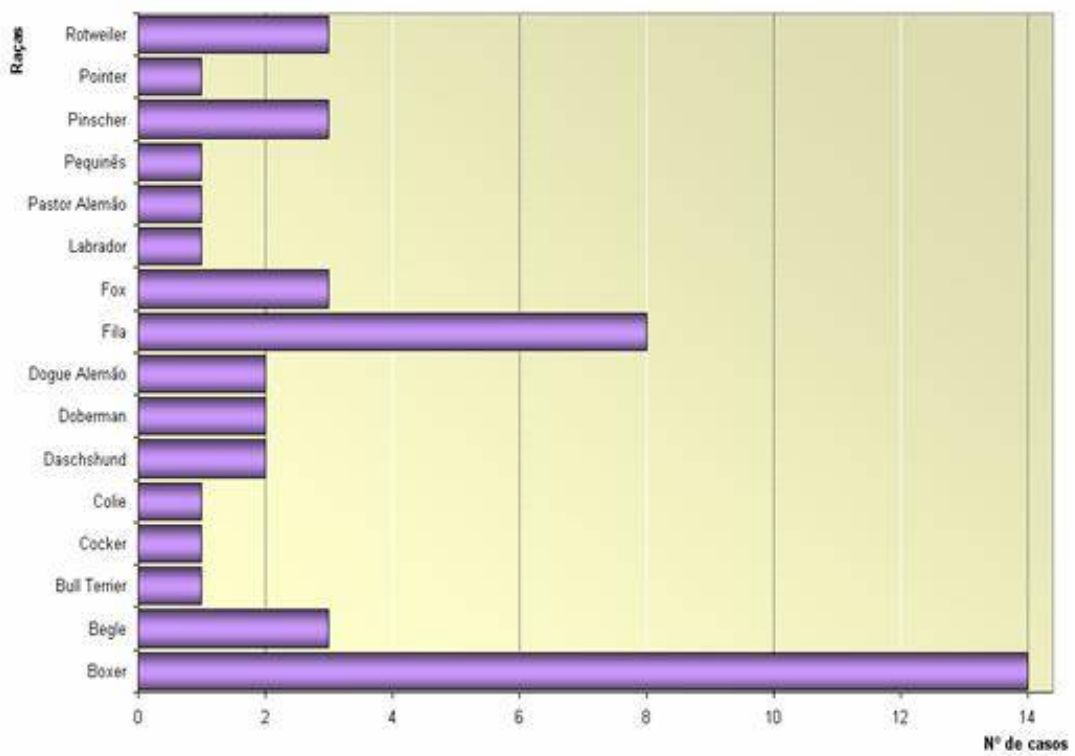


Figura 11 – Distribuição dos mastocitomas de acordo com a idade dos caninos acometidos.

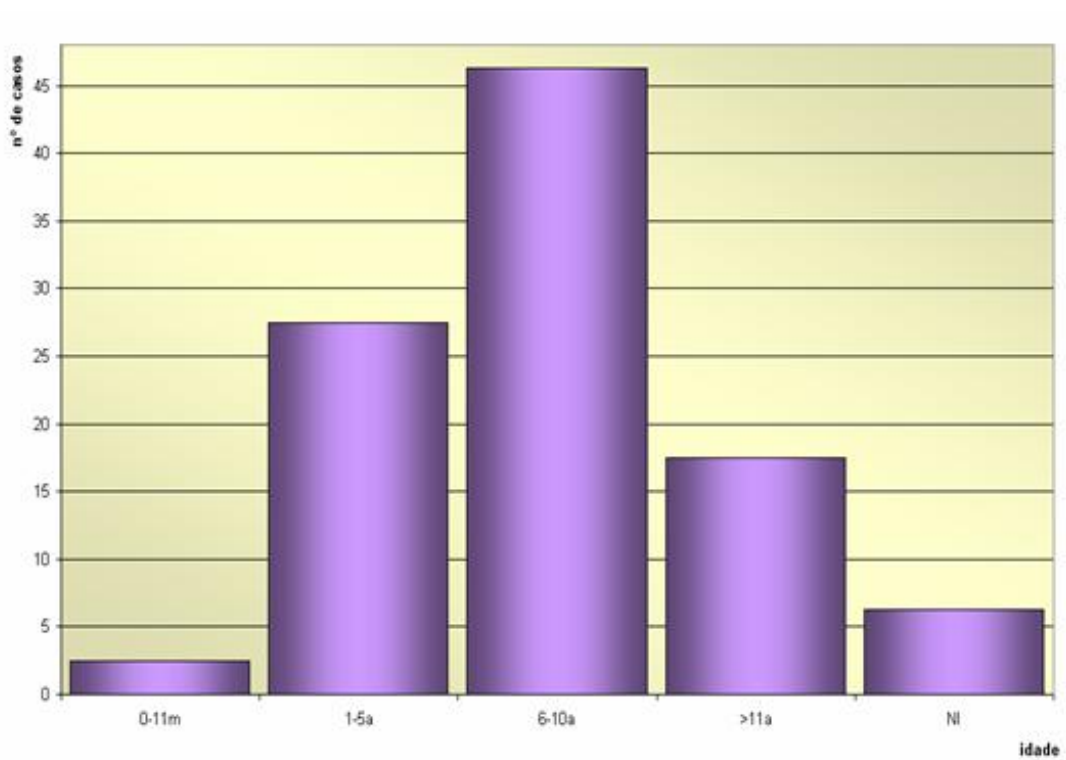


Figura 12 – Distribuição dos mastocitomas de acordo com a raça dos caninos acometidos.

Em 7/25 amostras classificadas como grau I observou-se moderada celularidade com distribuição predominante na derme profunda e observou-se invasão na quase totalidade das amostras, ou seja em 6/7 (85,7%) dos casos. O padrão de distribuição encontrado com maior frequência neste grupo foi do tipo misto (4/7 - 57,1%), seguido dos padrões difuso (2/7 - 28,5%) e em cordão (1/7 - 14,2%). Estas amostras apresentaram mastócitos bem diferenciados, com bordos bem definidos, núcleos arredondados e presença de grânulos citoplasmáticos em quantidades elevadas. Observou-se o predomínio de células de tamanho uniforme (4/7 - 57,1%) e de formato redondo a oval (6/7 - 85,7%), com citoplasma moderado (4/7 - 57,1%) a abundante (2/7 - 28,5%) apresentando grânulos metacromáticos. Os núcleos apresentaram aspecto vesiculoso (5/7 - 71,4%) como o padrão predominante entre as amostras deste grupo e mitoses foram observadas com moderada frequência (3/7 - 42,85%).

Os mastócitos neoplásicos mostraram-se entremeados por espessos feixes de fibras colágenas da derme profunda, circundados na maioria dos casos por pequenas quantidades de eosinófilos.

Das 11/25 amostras classificadas como grau II observou-se uma moderada a intensa celularidade com alta taxa de invasão presente em 9/11 (81,8%) dos casos. Quanto à distribuição foram observados nos três sítios analisados: derme superficial, derme profunda e subcutâneo, porém observou-se uma maior ocorrência envolvendo a derme profunda e subcutâneo. O padrão de distribuição mais freqüentemente encontrado neste grupo foi misto (5/11 - 45,4%) seguido do padrão difuso (3/11 - 27,2%), arranjos em cordões (2/11 - 18,1%) e tapete (1/11 - 9%). De um modo geral, neste grupo, as células neoplásicas apresentaram pleomorfismo moderado. Quanto ao tamanho da célula, quase a totalidade das amostras do grupo apresentou anisocitose (9/11 - 81,8%) e pleomorfismo foi observado em 6/11 (54,5%) casos quando analisada a forma das células. O citoplasma destas células apresentou-se ora moderado (7/11 - 63,6%) ora escasso (3/11 - 27,2%) com frequência e raramente abundante (1/11 - 9%) com moderada granulação e metacromasia variada. Os núcleos variaram, na maior parte das amostras encontravam-se vesiculosos (5/11 - 45,4%) e em menor quantidade observou-se núcleos com anisocariose (2/11 - 18,1%) e cromatina condensada (2/11 - 2,18%), com nucléolos evidentes na maioria dos casos. Figuras de mitoses foram observadas com pouca frequência 3/11 amostras (27,2%). Eosinófilos foram

observados com discreta a moderada freqüência. Os mastócitos neoplásicos são observados entre poucas a moderadas fibras colágenas da derme profunda e subcutâneo.

Dos 7/25 mastocitomas classificados como grau III observou-se elevada à moderada celularidade e invasão na totalidade das amostras com distribuição nos três sítios analisados, porém com predomínio na derme profunda, seguida da derme superficial e subcutâneo. O padrão de distribuição foi predominantemente misto (4/7- 57,1%) e em menor número observou-se arranjo difuso (3/7 - 42,8%). Essencialmente as células neoplásicas apresentaram elevado grau de pleomorfismo (5/7 - 71,4%) e células apresentando predominantemente anisocariose (6/7 - 87,7%). O citoplasma dos mastócitos neste grupo apresentou-se predominantemente escasso (5/7 - 71,4%), entretanto com menor freqüência observou-se uma moderada (2/7- 28,5%) quantidade de citoplasma e com marcada escassez de granulações e discreta a moderada metacromasia. Os núcleos variaram de vesiculares (4/7 - 57,1%) a núcleos em anisocariose (2/7 - 28,5%) e em poucos casos apresentaram-se uniformes (1/7 - 14,2%), com nucléolos evidentes e na maioria dos casos múltiplos (4/7 - 57,1%). Figuras de mitose atípicas foram observadas com pouca freqüência (2/7 - 28,5%).

Mastócitos tumorais classificados como grau III de diferenciação foram observados predominantemente entre fibras colágenas finas e rodeados por quantidades moderadas a escassas de eosinófilos.

As alterações teciduais associadas ao tumor, como necrose, edema e hemorragia estavam freqüentemente presentes, independente do grau de classificação do tumor e em proporções variadas, porém mais evidentes nos graus II e III. Colagenólise foi observada mais intensamente nos graus II e III. Outras alterações como vasculite, degeneração de pequenas artérias e dilatações de glândulas apócrinas estiveram presentes em quantidades variados independente da classificação.



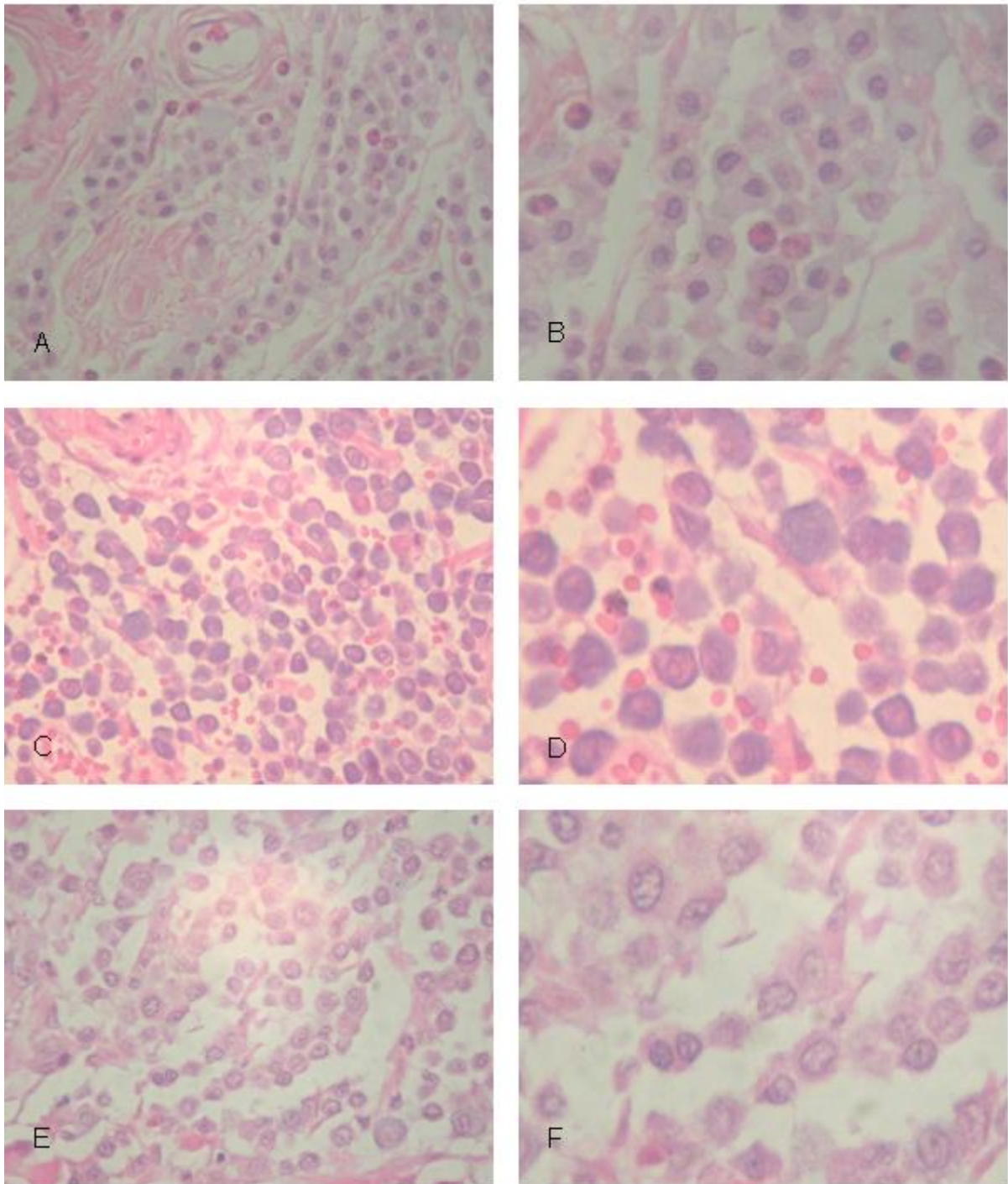


Figura 13 – Coloração de HE (A) Mastocitoma de grau I, (B) detalhe da morfologia do mastócito tumoral classificado como grau I, (C) Mastocitoma de grau II, (D) detalhe da morfologia do mastócito tumoral classificado como grau II, (E) Mastocitoma de grau III, (F) detalhe da morfologia do mastócito tumoral classificado como grau III.

### 4.3. Avaliação da técnica de impregnação argêntica das regiões organizadoras de nucléolos (AgNOR)

As regiões organizadoras nucleolares argirofílicas coraram-se como pontos marrons escuros a castanhos intranucleares. A média geral das contagens de AgNOR dos mastocitomas pesquisados foi de 2,8 com uma amplitude de 1,33 a 3,6.

Os tumores classificados como grau I (Fig. 14A e B) apresentaram uma média de 1,69, com amplitude de 1,33 a 2,33 na contagem de AgNOR em 100 células, contadas em 10 campos distintos. Nos tumores de grau II (Fig. 14C e D) esta contagem apresentou uma média de 2,37 e amplitude de 1,59 a 3,7 e nos tumores de grau III (Fig. 14E e F) a média foi de 3,17 sendo que as médias variaram de 2,85 a 3,6. Através do Teste de Person observa-se uma correlação positiva, porém baixa (0,57%) ao analisarmos grau histológico e AgNOR (tab.1).

Tabela 1 – Correlação do grau histológico dos mastocitomas com a contagem de AgNOR.

Grau Histológico	Contagem de AgNOR
I	2,11 <sup>a</sup>
II	2,37 <sup>b</sup>
III	3,16 <sup>c</sup>

### 4.4. Avaliação das fibras de colágeno através do Tricrômico de Masson

Através da técnica histoquímica do Tricrômico de Masson foi possível a observação do predomínio e distribuição do colágeno adjacente às células tumorais (Fig. 15). Os tumores de grau I apresentaram discreta destruição das fibras colágenas, sendo os mastócitos tumorais observados entre fibras espessas, integras e numerosas. Em tumores classificados como grau II observou-se uma menor densidade de fibras em locais infiltrados pelos mastócitos tumorais, bem como a presença de fibras rompidas e de espessura reduzida.

Nos tumores classificados como grau III houve predomínio de fibras finas, apresentando rompimentos nos sentidos longitudinal e transversal e em quantidades escassas nas áreas infiltradas por células neoplásicas.

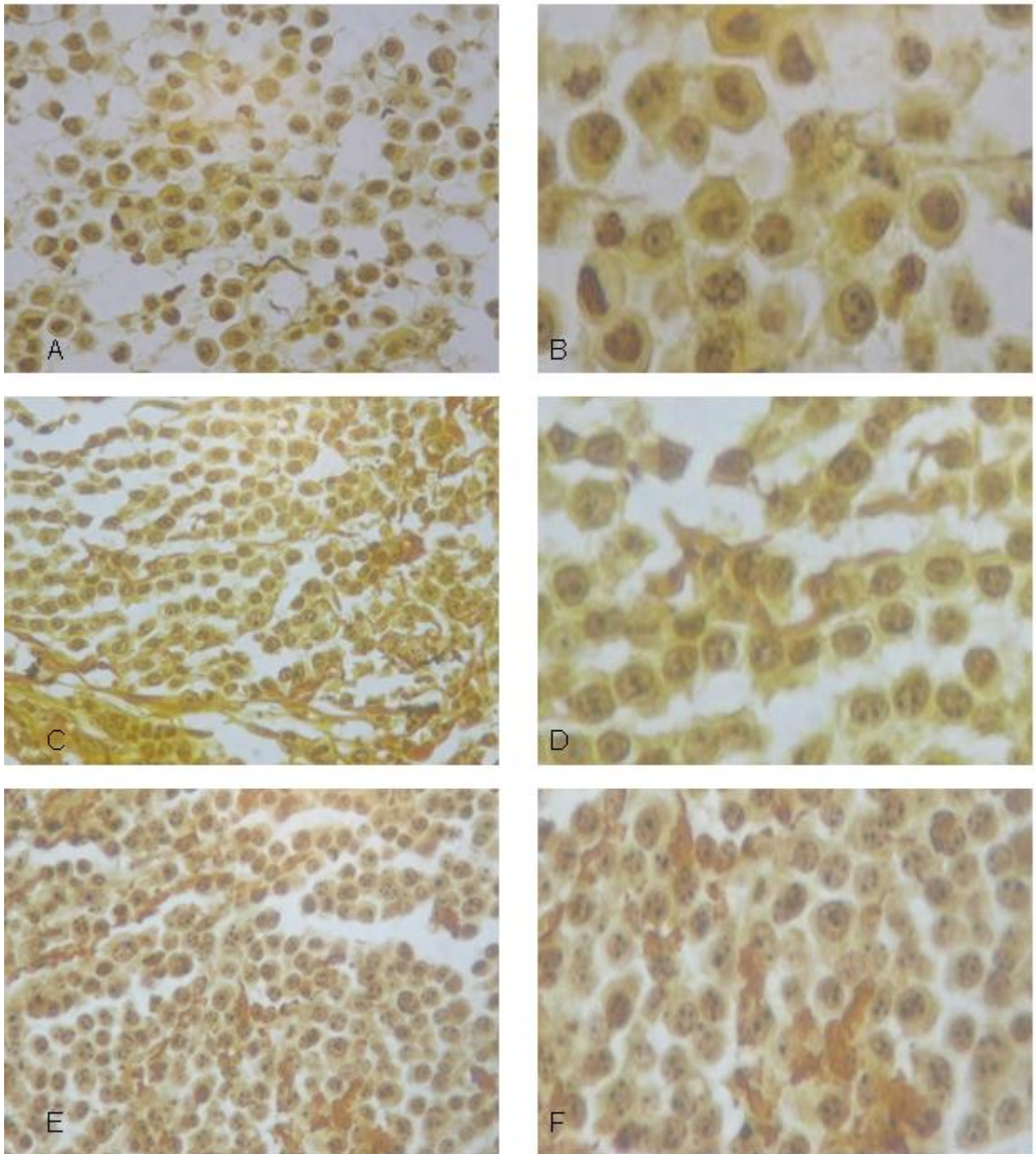


Figura 14 – Impregnação argêntica para identificação e contagem de AgNORs (A) Mastocitoma de grau I, (B) detalhe da morfologia do mastócito tumoral classificado como grau I, (C) Mastocitoma de grau II, (D) detalhe da morfologia do mastócito tumoral classificado como grau II, (E) Mastocitoma de grau III, (F) detalhe da morfologia do mastócito tumoral classificado como grau III.



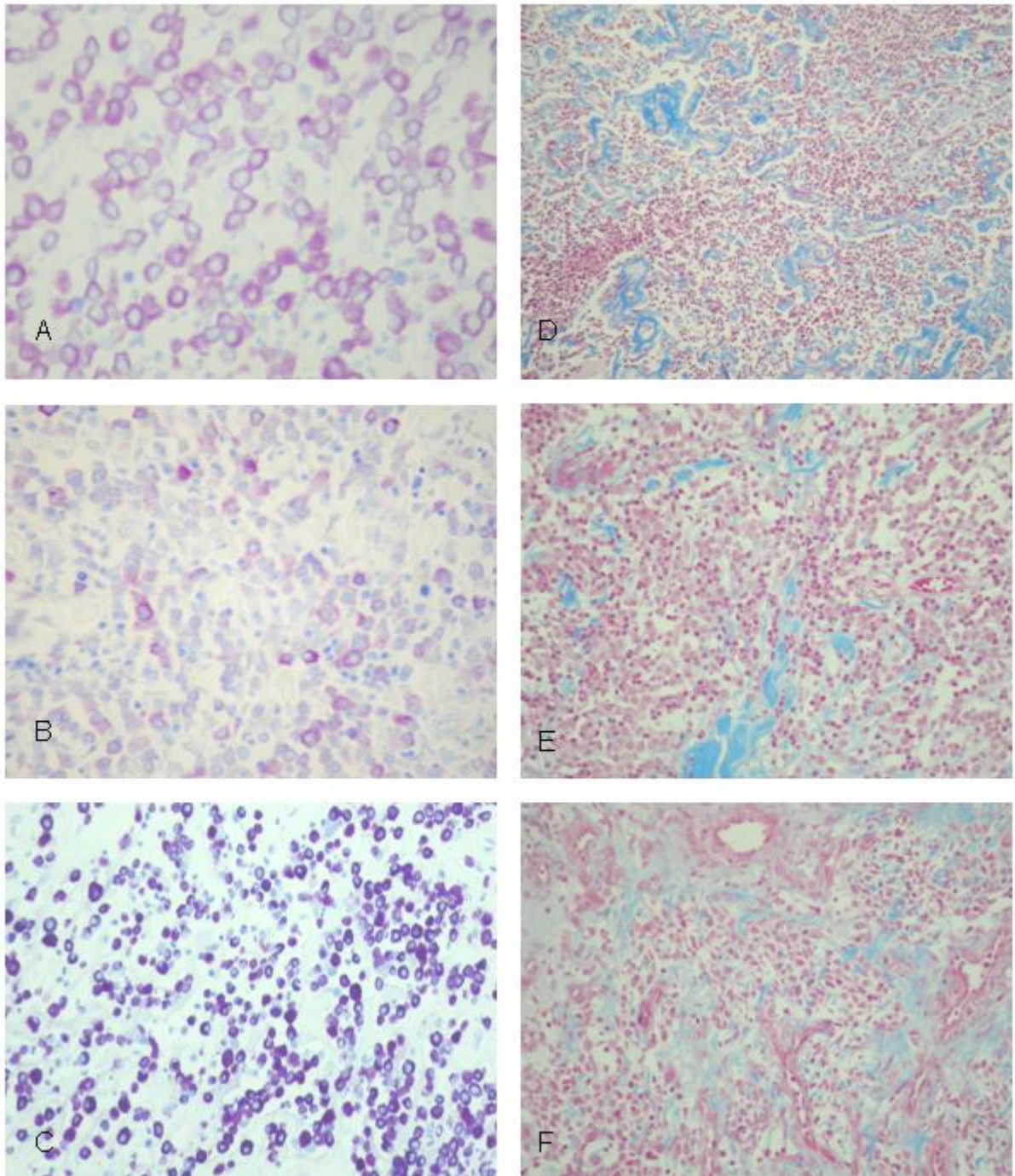


Figura 15 - Coloração de Azul de Toluidina (A) Mastocitoma de grau I, (B) Mastocitoma de grau II, (C) Mastocitoma de grau III. Coloração de Tricrômico de Masson (D) Mastocitoma de grau I, (E) Mastocitoma de grau II, (F) Mastocitoma de grau III.

## 4.5. Morfometria

### 4.5.1. Morfometria celular

De cada uma das 25 amostras previamente classificadas quanto ao grau, foram obtidas as medidas de área e perímetro em 20 células, atribuída como as médias das medidas encontradas para cada tumor.

Nos tumores de grau I observamos uma amplitude de 55,66 a 96,84  $\mu\text{m}$ , quando avaliadas as médias das áreas tomadas em 20 células. Quando avaliado o perímetro observou-se uma amplitude nas médias de 34,38 a 46,58  $\mu\text{m}$ . Os tumores de grau II apresentaram variação nas médias da área de 33,50 a 86,15  $\mu\text{m}$  e quando observados os perímetros, estes apresentaram uma amplitude de 27,81 a 42,05  $\mu\text{m}$  em suas médias. Mastocitomas de grau III apresentaram as médias das áreas variando entre 45,76 a 127,49  $\mu\text{m}$  e as médias de perímetro com variação de 30,42 a 51,56  $\mu\text{m}$  (tab.2).

Tabela 2 – Correlação do grau histológico dos mastocitomas com a morfometria celular e nuclear.

Grau Histológico	Área da célula	Perímetro da célula	Área do núcleo	Perímetro do núcleo
I	78,31 <sup>a</sup>	40,48 <sup>a</sup>	28,49 <sup>a</sup>	25,0 <sup>a</sup>
II	63,68 <sup>b</sup>	36,95 <sup>b</sup>	22,94 <sup>b</sup>	22,44 <sup>b</sup>
III	77,03 <sup>a</sup>	39,73 <sup>a</sup>	31,22 <sup>c</sup>	26,19 <sup>c</sup>

### 4.5.2. Morfometria nuclear

Dos 25 tumores estudados foram determinadas às medidas de área e perímetro dos núcleos em 20 células de cada tumor. Nos tumores classificados com grau I a amplitude de médias foi de 19,63 a 34,86  $\mu\text{m}$ , quando avaliada a área e 20,51 a 27,50  $\mu\text{m}$  quando avaliados os perímetros. Mastocitomas de grau II apresentaram as médias de área com amplitude entre 14,00 a 39,41  $\mu\text{m}$  e de perímetro entre 18,33 a 29,48  $\mu\text{m}$ . Mastocitomas classificados com grau III apresentaram médias entre 23,31 a 50,63  $\mu\text{m}$  quando avaliados quanto à área e entre 22,74 a 33,20  $\mu\text{m}$  quando avaliados quanto ao perímetro (tab.3).

Tabela 3 – Correlação entre a aparência do núcleo e a morfometria celular e nuclear.

Aparência do núcleo	Área da célula	Perímetro da célula	Área do núcleo	Perímetro do núcleo
Vesiculoso	84,67 <sup>a</sup>	42,14 <sup>a</sup>	33,37 <sup>a</sup>	27,30 <sup>a</sup>
Misto	81,94 <sup>a</sup>	41,22 <sup>a</sup>	31,66 <sup>a</sup>	26,17 <sup>a</sup>
Anisocariótico	71,35 <sup>b</sup>	38,77 <sup>b</sup>	25,66 <sup>b</sup>	23,74 <sup>b</sup>
Cromatina Condensada	54,71 <sup>c</sup>	34,72 <sup>c</sup>	20,84 <sup>c</sup>	21,13 <sup>c</sup>
Uniforme	45,57 <sup>c</sup>	30,43 <sup>c</sup>	22,86 <sup>b c</sup>	22,75 <sup>b c</sup>

#### 4.5.3. Correlação dos achados morfométricos e morfológicos

Através da correlação de Pearson, aplicada as variáveis do estudo, constatou-se que a área e perímetro tanto da célula quanto do núcleo possuem uma alta correlação, 0,92 e 0,91 respectivamente. Grau histológico e contagem de AgNOR apresentou correlação positiva, porém mais baixa. As demais variáveis não apresentaram correlações significativas segundo Person.

Tabela 4 - Correlações entre as variáveis do estudo segundo teste de Person.

Parâmetro	AgNOR	Área da célula	Perímetro da célula	Área do núcleo	Perímetro do núcleo
Área da célula	0,0704	-	-	-	-
Perímetro da célula	0,0494	<b>0,9210</b>	-	-	-
Área do núcleo	0,2884	0,6606	0,5997	-	-
Perímetro do núcleo	0,2389	0,6120	0,5753	<b>0,9144</b>	-
Grau histológico	<b>0,5761</b>	-0,0180	-0,0405	0,1079	0,1059

Quando avaliado o grau histológico e suas correlações com as medidas de área e perímetro da célula e do núcleo observou-se que os mastocitomas de grau I apresentam maior área e perímetro celular, seguidos dos mastocitomas de grau III e grau II. Quando avaliado núcleo observa-se que mastocitomas de grau III possuem maior área e perímetro, seguidos de mastocitomas de grau I e II.

Quando avaliadas as correlações entre a aparência do núcleo e as medidas da célula e do núcleo, observa-se que núcleos vesiculosos ou que reúnem mais de uma alteração, e por isso caracterizados como mistos, possuem maior área e perímetro de célula e de núcleo, 71,4%, 45,4% e 57,1% nos graus I, II e III respectivamente.

## 5. DISCUSSÃO

Verifica-se que a pele é o principal local de neoplasias nos animais domésticos especialmente nos caninos. Existem diversos estudos com números expressivos de neoplasmas histologicamente confirmados, que ressaltam a supremacia dos originários da pele e subcutâneo (NIELSEN & COLE, 1960; CONROY, 1983; JUBB *et al.*, 1985; MOULTON 1990).

### 5.1. Epidemiologia

De acordo com os dados levantados no período de 19 anos (1986-2005) a partir dos laudos de diagnóstico do Laboratório Regional de Diagnóstico (LRD), da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL), as neoplasias de pele representam 15,6% do total de diagnósticos realizados no período. Existe o relato de que as neoplasias cutâneas podem representar até 30% das neoplasias em cães (GORMAN & DOBSON, 1995).

Os mastocitomas representaram 7,1% do total de processos dermatológicos e 13,4% dos neoplasmas de pele diagnosticados no referido período. Dentre os neoplasmas de pele, os mastocitomas destacam-se pela alta ocorrência e características de malignidade em pequenos animais (VAIL, 1996). Estão entre os neoplasmas cutâneos mais freqüentes diagnosticados em cães (YANGER *et al.*, 1993; SCOTT *et al.*, 1996; ZEMKE *et al.*, 2002), entretanto patologias que envolvem mastócitos são conhecidas em diversas espécies (TIZARD, 1998).

Nossos resultados demonstraram que mastocitomas foram mais freqüentemente diagnosticados em fêmeas, onde se observou uma relação macho: fêmea de 0,5:1. Embora pareça não existir predisposição sexual para o desenvolvimento da neoplasia em cães (SCOTT *et al.*, 1996; VAIL, 1996), alguns autores relatam maior incidência em fêmeas (SIMÕES *et al.*, 1994), e outros

ênfatizam que os mastocitomas tem predileção por fêmeas castradas e machos intactos (FOX, 1998). Takahashi *et al.*, (2000) mostram que os principais cães acometidos por mastocitoma visceral são machos de raças miniaturas puras.

Como já relatado anteriormente, o mastocitoma cutâneo já foi relatado em todas as raças caninas (MELEO, 1997), entretanto animais das raças Boxer, Boston Terrier, Basset Hound, Weimaraner, Begle, Pointer e Pastor Alemão são mais acometidos (FOX,1998). Neste estudo observamos predomínio em cães das raças Boxer, Fila, Pinscher, Rotweiler, Beagle e cães sem raça definida. Recentemente, oncologistas relataram um aumento na ocorrência em Labradores e Labradores dourados, sendo o primeiro mais predisposto ao desenvolvimento do mastocitoma múltiplo cutâneo (ROGERS, 1996). Rech (2003) ressalta que a diferença na prevalência de mastocitomas em algumas raças pode estar relacionada à popularidade da mesma na região geográfica estudada. Algumas raças são predispostas a essa neoplasia, particularmente aquelas que originaram o Bulldog, sugerindo uma predisposição hereditária (ROGERS,1996).

Buscando uma explicação para esta incidência alguns estudos apontam sítios frágeis de expressão cromossômica como possível causa predisponente para o desenvolvimento dos mastocitomas em cães Boxer. A expressão cromossômica de sítios frágeis aparece como um fenômeno genético que predispõe, em seres humanos o desenvolvimento de certos tumores, e está incrementado nos cães Boxer com mastocitomas (SCOTT, 1996), mesmo não havendo identificação de síndrome de fragilidade cromossômica familiar ou racial (STONE, 1991). Assim afirma-se que cães Boxer e Boston Terrier possuem oncogenes que se transmitem aos descendentes, o que combinado com uma deficiência genética de vigilância imunológica, determina uma maior incidência de mastocitomas nestas raças (SCOTT, 1996).

A mudança do modo de vida dos animais, pelo fato da domesticação, é um dos principais fatores para o aumento da incidência de tumores. Este “novo modo de vida” cria situações pré-malignas, que unidas a outros fatores facilitam o surgimento de neoplasias (MISDORP,1990). Observamos em nosso estudo que os tumores de mastócitos foram diagnosticados em animais entre 8 meses e 17 anos de idade, sendo que a idade média dos cães foi 6,4 anos.

Nos animais domésticos, a prevalência das neoplasias aumenta com a idade (DORN & GORMAN,1987). Fatores relacionados com danos genéticos ao longo do



tempo (VAIL, 1996) e diminuição da função imune colaboram para esta suscetibilidade (CULLEN *et al.*, 2002). Com poucas exceções, esta relação entre idade e ocorrência das neoplasias aplica-se a maioria dos tumores e respectivos locais de ocorrência (MISDORP, 1990).

Mastocitomas tendem a afetar animais maduros, com idade média de 8,5 anos. Por outro lado, não se deve descartar sua presença em animais mais jovens (MERLO, 2000), pois podem ocorrer em qualquer idade, desde 4 meses até 18 anos (PULLEY & STANNARD, 1990). Nossos resultados corroboram com essa afirmativa.

Quanto à localização anatômica dos tumores observamos, que os mastocitomas foram mais freqüentemente observados no tronco, seguido de membros e região da cabeça. Ressalta-se ainda que detalhando melhor estas localizações, baseado nos protocolos dos animais, observamos na região do tronco uma maior ocorrência no abdômen, seguido de escroto, tórax e dorso. Segundo Turrel *et al.* (1988) mastocitomas localizados nas regiões perineal, inguinal e do prepúcio apresentam tendência à malignidade.

Entre os mastocitomas localizados nos membros, observamos uma maior ocorrência nos membros posteriores. Reforçando nossos achados, também Madewell *et al.* (1987) relatam que a forma nodular dos mastocitomas ocorre com maior freqüência nos membros posteriores, abdômen, tórax e membros anteriores.

## **5.2. Graduação histológica**

A definição do grau histológico é um parâmetro importante para a definição do tratamento (GOLDSCHIMIDT & HENDRICK, 2002).

Quando classificados quanto ao grau histológico, observamos que os 25 casos estudados apresentaram uma distribuição de 7 (28%) mastocitomas de grau I, 11 (44%) de grau II e 7 (28%) de grau III. Patnaik *et al.*, (1984) relataram em seu estudo porcentagens para classificação histopatológica semelhantes às observadas em nosso estudo. Eles descrevem uma distribuição de 36% de mastocitomas de grau I, 43% de grau II e 20% de grau III. Mota (2005) relata uma distribuição encontrando predomínio de tumores classificados como grau III (72,2%). Vail (1996) faz referência a grande variação nas porcentagens dos tumores para cada um dos três graus histológicos.

Nosso estudo mostra uma predominância de mastocitomas de diferenciação intermediária ou grau II. Este é o grupo que representa uma maior dificuldade na

definição histopatológica e prognóstica. Embora baseada em critérios previamente definidos fica mais evidente em tumores classificados com grau II a subjetividade da classificação histológica e, como já mencionado anteriormente, este é um dado importante para definição prognóstica e escolha de tratamento. Para estes, se observa uma maior amplitude de escolhas terapêuticas quando comparados aos de graus I e III. Mota (2005) ressalta que as neoplasias classificadas como grau II revelam um comportamento imprevisível quando considerados os resultados do tratamento cirúrgico, normalmente associados a recursos quimioterápicos e neste caso podem ser alvo de maior investigação para o estudo do comportamento desta neoplasia.

Bostock *et al.* (1989) chamam a atenção para o fato de que apesar do sistema de graduação histológica seguir parâmetros pré-definidos, muitas vezes a classificação é subjetiva, pois um mesmo tumor pode ter classificações diferentes determinadas por patologistas distintos. Esta subjetividade é maior quando se trata de mastocitomas classificados como grau II, sendo o prognóstico mais difícil de ser definido e as mortes entre estes animais variarem entre 20 a 50%. A sobrevivência dos animais com diagnóstico de mastocitoma de diferenciação intermediária é bastante variável, 44% segundo Patnaik *et al.*, (1984) a 94% segundo relatam Séguin *et al.* (2001). Estes valores vão depender do tempo de avaliação do curso clínico após o diagnóstico (SÉGUIN *et al.*, 2001), sendo importante este registro clínico para possível avaliação quanto a estes parâmetros (RECH, 2003).

Confrontando os resultados encontrados em nosso estudo quanto à definição histológica com os critérios estabelecidos por Patnaik *et al.* (1984) observamos que estes têm características similares. Os mastocitomas bem diferenciados, classificados como grau I, apresentaram moderada celularidade com mastócitos que possuíam bordos bem definidos, de formato redondo a oval e tamanho uniforme, com citoplasma moderado e presença de granações em quantidades elevadas e corados metacromaticamente. Os núcleos eram arredondados, e observaram-se baixos índices de mitoses atípicas. Simões *et al.* (1994) afirmam que em mastocitomas, a interação dos corantes básicos com os grânulos citoplasmáticos tem relação positiva com o grau de diferenciação. Yager & Wilcock, 1994 ressaltam que mastocitomas pouco diferenciados podem ser confundidos com outros tumores de células redondas. Em nosso estudo o método de azul de toluidina foi importante como auxílio na confirmação do diagnóstico e diferenciação de mastocitomas de

outros tumores de células redondas. A propriedade de metacromasia das células, diferenciada entre os três graus foi observada, sobretudo a diferença entre os graus I e III.

Em mastocitomas que receberam grau II na classificação histológica observamos elevação na celularidade e freqüente invasão adjacente de tecidos. As células apresentaram pleomorfismo, citoplasma moderado a escasso e com moderada quantidade de grânulos exibindo metacromasia e núcleos em anisocariose com variações evidentes quanto ao aspesto, com nucléolos visíveis e pouca freqüência de mitoses bizarras. Com moderada freqüência foram observados eosinófilos. Goldschmidt e Hendrick (2002) afirmam que a presença de eosinófilos pode auxiliar no diagnóstico de mastocitomas pouco diferenciados, evitando o diagnóstico de tumor de células redondas, sem conhecimento da célula de origem. Simões *et al* (1994) afirmam ser a presença e distribuição de eosinófilos e outras células inflamatórias não significativamente diferentes entre os três graus, sobretudo entre os graus I e III, porém neste estudo não observamos diferenças significativas entre os três graus quanto à presença de eosinófilos.

Os mastocitomas classificados como grau III apresentaram invasão com elevada celularidade. Células pleomórficas com anisocitose e anisocariose estavam presentes em todas as amostras analisadas. O citoplasma destes mastócitos apresentava-se escasso e com pequena quantidade de granulações e estas com discreta metacromasia, os núcleos mostravam nucléolos evidentes e na maioria dos casos múltiplos e com pouca freqüência foram observadas mitoses atípicas. Simões *et al* (1994) mostram em seu estudo uma significativa variação nos índices mitóticos, nos diferentes graus 4,2, 8,3 e 11 respectivamente. Goldschmidt & Hendrick (2002) apontam resultados similares na distribuição quanto à classificação histológica propondo os mesmos critérios utilizados por Patnaik *et al* (1984).

### **5.3. AgNOR**

Séguin *et al* (2001) afirma que uma proporção de mastocitomas de grau II possui comportamento biológico de mastocitoma de grau I e outros de grau III. O índice mitótico pode ser considerado diferencial nestes casos, outra alternativa é a quantificação de AgNORs, índice que mede a proliferação celular (SIMÕES *et al*, 1994).

É importante a busca de meios alternativos que permitam a diferenciação dos mastocitomas e que auxiliem no aumento da precisão do diagnóstico e definição de prognóstico com meios rápidos e econômicos e sobretudo eficientes. As NORs coradas com prata (AgNORS) representam um marcador sensível e eficiente da proliferação celular e malignidade (DERENZINI,1991). Através da coloração com prata, uma série de proteínas associadas as NORs e relacionadas diretamente com a atividade proliferativa e de transcrição das células se tornam evidentes ao microscópio de luz como pontos escuros (CROCKER, 1989).

Neste estudo a média geral nas contagens de AgNORS foi 2,81 e observada uma amplitude de 1,33 a 3,6. Rech (2003) em estudo semelhante mostra uma média geral de 1,9, mostrando uma amplitude de 1,2 a 4,3. Resultados semelhantes foram observados por Bostock *et al*, (1989), onde obteve uma média geral de 1,9, com amplitude de 1,2 a 4,3. Giraldo *et al.*, (2003) mostra em seu estudo, em tumores de pele uma média de 3,23 com amplitude de 2,82 a 3,75 para mastocitomas, 3,95 para tumores espinocelulares e 2,76 para tumores basocelulares. Os valores obtidos neste estudo foram 1,69, 2,37 e 3,17 para os graus I, II e III respectivamente sendo que os valores variaram de 1,33 a 2,33 nos tumores de grau I, 1,59 a 3,7 nos de grau II e 2,8 a 3,6 nos de grau III. Bostock *et al*, (1989) quando descreveu pela primeira vez o uso da técnica de AgNOR para mastocitomas caninos, observou médias 1,5, 3,2 e 6,3 para graus I, II e III respectivamente. As diferenças quanto a frequência de AgNOR quando comparadas a descrita por Bostock *et al*, (1989), principalmente ao avaliar mastocitomas de grau III se deve, provavelmente, ao baixo índice mitótico encontrado nos tumores avaliados neste estudo. Segundo Meuten (2002) a esperada nos tumores de grau III é de 8 figuras mitóticas/CMA. Em semelhante estudo Rech (2003) relata a variação na amplitude dos valores de AgNOR nos mastocitomas de grau II, onde os valores se sobrepõem aos de grau I e III, atribuindo esta oscilação ao seu comportamento biológico variável.

#### **5.4. Morfometria**

É importante a busca de meios que agreguem confiabilidade aos diagnósticos de mastocitomas, e neste sentido tem-se tentado diminuir a subjetividade presente nos métodos atualmente utilizados. Giraldo *et al.*, (2003) sugere o uso da morfometria como parâmetro quantitativo para melhorar esta avaliação. Neste estudo buscamos aliar métodos qualitativos de investigação, tais como métodos

histoquímicos a métodos quantitativos, avaliando o mastócitos tumoral e seu núcleo quanto à área e perímetro. Nas descrições histopatológicas usadas para diferenciar tumor de mastócitos quanto ao grau de malignidade, são mencionadas as dimensões e formas da célula (STREFEZZI *et al.*, 2003). Medidas quantitativas como diâmetro nuclear foram relatadas por Hoterford & Nielsen (1967), enquanto Bostock, (1973) preconiza o uso da relação citoplasma e núcleo para caracterizar mastocitomas em diferentes graus. Neste estudo observamos uma correlação altamente positiva entre área e perímetro da célula com a área e perímetro do núcleo, independente da classificação atribuída ao tumor, concluindo que estas comparações não são adequados para classificação.

A taxa de proliferação de células neoplásicas reflete uma desordem no equilíbrio entre células em divisão, tempo de ciclo celular, diferenciação e senescência, ou seja, e a expressão de mais do que simplesmente replicação celular. A proliferação celular de tumores tem sido alvo de interesse como forma de compreender a biologia tumoral bem como permitir estimativas de prognóstico e tratamento (MADEWELL, 2001). Neste sentido procuramos correlacionar aparência do núcleo observada na coloração de HE, com área e perímetro do núcleo de mastócitos tumorais onde observamos uma correlação entre área e perímetro aumentados e aparência vesiculosa dos núcleos, 71,4%, 45,4% e 57,1% nos graus I, II e III respectivamente ou ainda quando estes apresentavam mais de uma alteração.

### **5.5. Correlações entre Avaliações Morfológicas e Morfométricas**

Strefezzi *et al.*, (2003) em seus estudos citam as medidas de área, diâmetro médio e perímetro do núcleo como parâmetros mais apropriados para a diferenciação dos mastocitomas cutâneos em cães. Em nosso estudo, comparando graus histológicos dos mastocitomas com medidas de área e perímetro de célula e núcleo, observamos que quanto às medidas da célula, mastocitomas de grau I e III não diferem estatisticamente, enquanto que as medidas de núcleo diferem estatisticamente nos três graus, portanto conclui-se ser a medida de núcleo a mais apropriada para estudos morfométricos e ser dispensável o uso das duas medidas (célula e núcleo).

## 6. CONCLUSÕES

O presente estudo pode determinar que:

- 1) Considerando avaliação morfológica, critérios como distribuição, padrão de distribuição, número de mitoses, presença de eosinófilos e colagenólise são menos fidedignos para graduação dos mastocitomas, por ocorrerem em todos os graus e apresentarem proporções variáveis dentro de cada grupo.
- 2) O pleomorfismo celular é um parâmetro importante, sendo observados nos mastocitomas de grau I células predominantemente redondas e um aumento no número de amostras apresentando pleomorfismo conforme o aumento do grau de malignidade.
- 3) A avaliação de AgNOR é um parâmetro mais fidedigno quando comparada a avaliação do padrão nucleolar em HE.
- 4) A proporção de coloração de Azul de Toluidina é um parâmetro importante, onde se observa uma coloração mais intensa nos tumores melhor diferenciados, ou seja, os classificados como grau I.
- 5) Considerando a avaliação morfométrica, não houve diferença de resultados quando utilizados como parâmetros área e perímetro. Desta forma verifica-se ser o uso concomitante das duas avaliações desnecessário.
- 6) A avaliação morfométrica do núcleo apresenta maior validade quando comparada a avaliação da célula. Desta forma é preferível o uso das medidas do núcleo.
- 7) Parâmetros morfométricos aliados a parâmetros morfológicos de graduação dos mastocitomas conferem maior confiabilidade ao diagnóstico.

## 7. BIBLIOGRAFIA

- AZULAY, R. D. & AZULY, D. R. Oncologia dermatológica. In:\_\_\_ **Dermatologia**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. cap. 30, p.320-64.
- BOSTOCK, D. E. The prognosis following surgical removal of mastocytomas in dogs. **Journal of Small animals**, v. 77 p.362-66, 1987.
- BOSTOCK, D.E.;CROCKER, J.; HARRIS, K.; SMITH, P. Nucleolar organiser regions as indicators of post-surgical prognosis in canine spontaneous mast cell tumors. **British Journal of Cancer**, v.59, p.915-918, 1989.
- BOSTOCK, E.D. The prognosis following surgical removal of mastocytomas in dogs. *Journal Small Animal Practice*, v.14, n. 1, p.27-41, 1973.
- CONROY, J. D. Canine skin tumors. **Journal of the American Animal Hospital Association.**, v.19, p.91-114, 1983.
- CULLEN, J.M.; PAGE, R.; MISDORP, W. An overview of câncer pathogenesis, diagnosis and management. In: MEUTEN, D.J. **Tumors in domestic animals**. 4<sup>th</sup> ed. Ames: Iowa Press, cap. 1 p. 3-44. 2002.
- DIAS, M. C. F. Neoplasias de pele em caninos e felinos. Estudo comparativo com processos idênticos na espécie humana. Monografia ( Especialização em Agentes Infecto Parasitários de Interesse Humano) Fundação Universidade Federal de Rio Grande, Rio Grande.2004
- DOBSON, J.M.; GORMAN, N.T. A clinical approach to the management of skin tumors in the dog and cat. In: **Practice**, 10 p. 55-68, 1988.
- DORN, C.R., PRIESTER, W.A. Epidemiology. In: GORDON, H.T., BRUCE, R. M., LEA & FEBIGER. **Veterinary Canine Medicine**. Philadelphia: p.27-35. 1987.
- DVORAK, A.M. Ultrastructural Analysis of Human Mast cells: Biological Aspects. **Chemical Immunology**. Basel: Karger, v. 61, p. 1-33. 1985.
- FOX, E.L. Mast cell tumors. In: MORRISON, B.W. **Cancer in dogs and cats medical and surgical management**. 1.ed. Philadelphia: Williams & Wilkins, p.479-488. 1998
- FRIMBERGER, A.E.; MOORE, A.S.; LaRUE, S.M.; GLIATTO, J.M.; BENGSTON, A.E. Radiotherapy of incompletely resected, moderately differentiated mast cell tumors in the dog; 37 cases (1989-1993). **Journal of the American animal Hospital Association**, v.33, p.320-324, 1997.

- GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. **Tratado de Histologia: em cores**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 93-97p. 1997.
- GERRITSEN, R.J.; TESKE, E.; KRAUS, J.S.; RUTTERMAN, G.R. Multiagent chemotherapy for mast cell tumors in the dog. **Veterinary Quality**, v. 20, p. 28-31, 1998.
- GHADIALLY, F.N. **Diagnostic Ultrastructural pathology. A self evaluation manual**. Tiptree: Butterworths, 50 p. 1984.
- GHADIALLY, F.N. **Ultrastructural pathology of the cell and matrix**. 3<sup>th</sup>. Tiptree: Butterworths, 587 p. 2 v. V.1, cap.4: Golgy complex and secretory granules. P.396-402.1988.
- GIRALDO, G. E.; ARANZAZU, D. A.; RODRIGUES, B. J.; PÉREZ, M. M.; RAMÍREZ, M. C.; Caracterización de las Regiones Organizadoras Nucleolares coloreadas con Plata ( AgNORs) en tumores cutáneos caninos: **Revista Colombiana de Ciencia**, Medellin, v.16, n.2, p.132, 2003. Disponível em: <<http://kogi.udea.edu.co/revista/16/16-2-4.pdf>> Acesso em: jan.2006.
- GOLDSCHMIDT, M.H., HENDRICK, M. J. Tumors of the skin and soft tissues. In: MAUTEN, D. J. **Tumors in domestics animals**. 4<sup>th</sup> ed. Ames: Iowa States Press, cap.3 p.105-109. 2002.
- GORMAN, N.T., DOBSON, J. M. The skins and associates tissues. In: WHITE, R. A. S. **Manual of small animal oncology**. Shurdington: British Small Animal Veterinary Association, p.187-99. 1985.
- GORMAN, N.T., DOBSON, J. M. The skins and associates tissues. In: WHITE, R. A. S. **Manual of small animal oncology**. Shurdington: British Small Animal Veterinary Association, p.187-99. 1995.
- HOSPITAL VETERINÁRIO DO PORTO. Mastocitoma/Oncologia. Disponível em: <<http://www.hospvetporto.pt/artigos/detalhe/52>> Acesso em: 23 jan. 2006.
- JONES, T. C.; HUNT, R. D.; KING, N. W. **Patologia Veterinária** 6<sup>a</sup> edição ed. Manole. p.880-881. 1997.
- JUBB, K. V. F. et al. **Patology of domestic animals**. 3.ed. New York: Academic Press, 3v.1985
- KATSAMBAS, A.D.; KARPOUZIS, A.J.; KOUMANTAKI-MATHIOUDAKI, E.; JORRIZZO, J.L. Mastocytosis with skin manifestations: current status. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v.13, p.155-165, 1999.
- KRAVIS, L. D.; VAIL, D. M.; KISSEBERT, W. C. et. al. Frequency of argyrophilic nucleolar organizer regions in fine-needle aspirates and biopsy specimens from mast cell tumors in dogs. **Journal of American Veterinary Medical Association**. Vol 209, n. 8, p. 1418-1420, 1996.
- LANGENBACH, A.; MCMANUS, P.M.; HENDRICK, M.J.; SHOFER, F.S.; SORENMO, K.U. Sensitive and specificity of methods of assessing the regional lymph nodes for evidence of metastasis in dogs and cats with solid tumors. **Journal of American Medical Association**, v.218, n. 9, p.1424-1428, 2001.



- LEMARIÉ, J.R.; LEMARIÉ, L.S.; HEDLUND, S.C. Mast cell tumors: Clinical management. **The Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v.17, n.9, p1085-1101, 1995.
- LÉPORI, L. R. **Miniatlas: Alergia**. 1.ed. Buenos Aires: E.C.S.A. 2005.
- MACY, D.W. Canine and feline mast cell tumors. In: KAL KAN SYMPOSIUM,10, 1986 **Proceedings**, p.101-111, 1989.
- MADEWELL, B. R., THEILEN, G. R. Tumors and tumor- like conditions of epithelial origin. In: THEILEN, G.H., MADEWELL, B. R. **Veterinary cancer medicine**. Philadelphia: Lea & Febiger, p.240-325. 1987.
- MADEWELL, B.R. Celular Proliferation in tumors: a review of methods, interpretation, and clinical applications. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Lakewood, v.15, p. 334-340, 2001.
- MELEO, K.A. Tumors of the skin and associated structures. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v.27, n. 1, p. 73-94, 1997.
- MERLO, E. M. Mastocitoma Cutâneo Canino: Un Reto Para El Veterinário. **Profesión Veterinaria**, año 12 n. 47, mayo-junio 2000. Disponível em: <[http://www.colvet.es/Madrid/revista/may\\_jun\\_00/casoclinico.htm](http://www.colvet.es/Madrid/revista/may_jun_00/casoclinico.htm)> Acesso em: 23 jan. 2006.
- MEUTEN, D.J. Appendix: Diagnostic Schemens and Algorithms. In:\_\_\_\_\_.**Tumors in domestic animals**. 4<sup>th</sup> ed. Ames: Iowa State Press p.755-769. , 2002.
- MISDORP, W. General Considerations. In: MOULTON, J. E. Tumors in domestic animals. University of California Press 4<sup>th</sup> ed., 672 p. 1990.
- MOTA, E. F. F.; Estudo da expressão de moléculas de adesão, de junções comunicantes, e da matriz extra celular de mastocitomas da espécie canina. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental e Comparada) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- MOTA, I. The mast cell revisited. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.28, p.895-901, 1995.
- MOULTON, J. E. **Tumors in domestic animals**. 3.ed. University of California Press, p. 672. 1990.
- NIELSEN, S.W., COLE, C.R. Cutaneous epithelial neoplasm of the dog: a report of 153 cases. **American Journal Veterinary Reserch.**, v.21, p.931-48, 1960.
- O'KEEFE D.A. Canine mast cell tumors.**Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**. V.20, n.4, p.1105-1115, 1990.
- O'KEEFE D.A. Systemic mastocytosis in 16 dogs. **Journal of the veterinary intern. medicine**. V.1 (2), p.75-80, 1987.
- OGILVIE, G.K.; MOORE, A.S. Managing the veterinary câncer patient. **Veterinary Learning System**, Treton (NJ) p. 503-510, 1995.
- OZAKI, K.; YAMAGAMI, T.; NOMURA, K.; NARAMA.I. Mast cell Tumors of the Gastrointestinal Tract in 39 Dogs. **Veterinary Pathology**, v.39, p.557-564, 2002.

- PATNAIK, A.K.; EHLER, W. J.; MacEWEN, E. G. Canine cutaneous mast cell tumors: morphologic grading and survival time in 83 dogs. **Veterinary Pathology**, v. 21, p. 469-474, 1984.
- PLOTON, D.; MENAGER, M.; JEANNESSON, P.; HIMBER, G.; PIGEON, F.; ADNET, J.J. Improvement in the staining and in the visualization of the arguophilic proteins of the nucleolar organizer region at the optical level. **Histochemical Journal**, v.18, p. 5-14, 1986.
- POLLACK, J.M.; FLANDERS, A.J.; JOHNSON, C.R. Disseminated malignant mastocytoma in a dog. **The Journal of the American Animal Hospital Association**, v.27, n.4, p.435-440, 1991.
- PULLEY, L. & STANNARD, AA. Tumor of the skin and soft tissues. In: MOULTON, J. **Tumors in domestic animals**. 3<sup>rd</sup> ed. Berkeley: University of Califórnia,. 672 p, cap.3. p.23-87. 1990
- RECH, R. R.; Mastócitos em condições normais e patológicas com ênfase em mastocitomas de cães. Dissertação (Mestrado em Patologia Veterinária) Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria. 2003.
- ROGERS, K.S. Common question about diagnosing and treating canine mast cell tumors. **Veterinary Medicine**., v.88, p.246-250, 1993.
- ROGERS, K.S. Mast cell tumors: dilemmas of diagnosis and treatment. **The Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v.26, n.1, p.87-102, 1986.
- ROMÁN, G. Z. Mastocitosis. Disponível em : <[www.med.ucv.ve/ftproot/RondonLugo/capitulo22.pdf](http://www.med.ucv.ve/ftproot/RondonLugo/capitulo22.pdf)> Acesso em jun.2005
- SCOTT, W.D.; MILLER, H.W.; GRIFFIN, E.C. **Dermatologia de pequenos animais**. Tradução: Cid Figueiredo. 5. ed. Rio de Janeiro: Interlivros. Tradução de Small Animal Dermatology. 1996.
- SEGUIN, B.; LEIBMAN, N.F.; BREGAZZI, V.S.; OGILVIE, G.K.; POWERS, B.E.; DERNELL, W.S.; FETTMAN, M.J.; WITHROW, S.J. Clinical outcome of dogs with grade II mast cell tumors treated with surgery alone: 55 cases (1996-1999). **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 218, n.7, p. 1120-1123, 2001.
- SIMÕES, J. P. C.; SCHONING, P. AND BUTINE, M. Prognosis of canine mast cell tumors: A comparison of three methods. **Veterinary Pathology**, v.31 p.637-647, 1994.
- SIMÕES, J. P. C.; SCHONING, P. Canine mast cell tumors: a comparison of staining techniques. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 6, p. 458-465, 1994.
- STATISTIX,,. Statistix,, 8 Analytical Software. User's manual. Tallahassee. FL. 2003. 396 p.
- STREFEZZI, F. De R.; XAVIER, J. G. AND CATÃO-DIAS; J. L. Morphometry of canine cutaneous mast cell tumors. **Veterinary Pathology**, v. 40, p. 268-275, 2003.
- TAKAHASHI, T.; KADOSAWA, T.; NAGASE, M.; MATSUNAGA, S.; MOCHIZUKI, M.; NISHIMURA, R.; SASAKI, N. Visceral mast cell tumors in dogs: 10 cases (1982-

1987). **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 216, n. 2, p. 222-226, 2000.

- TIZARD, I.R. **Imunologia Veterinária: uma introdução**. 5<sup>a</sup> ed. São Paulo: Roca,. 545 p. cap. 26: Hipersensibilidade do tipo I: p. 357-372. 1998
- TURREL, J.M.; KITCHELI, B.E.; MILLER, L.M.; THÉON, A. Prognostic factors for radiation treatment of mast cell tumors in 85 dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.193,n.8, p.936-940, 1988.
- TYLER, R.D.; COWELL,R.L.; MEINKOTH J.H. Cutaneous and subcutaneous lesions. In: Cowell, R.L.; Tyler,R.D.; Meinkoth, J.H. (ed): **Diagnostic cytology and hematology of the dog and cat**. Mosby, San Luis. P. 20-51, 1999.
- VAIL, D. M. Mast cell tumors. In WITHROW, S. J. & MACEWEN, E. G. **Small Animal Clinical Oncology**. 2<sup>dn</sup> ed. Philadelphia: WB Saunders, 589 p. cap. 16. p 192-210. 1996.
- WILLENSE, T. **Dermatologia clinica de cães e gatos: guia para o diagnostico e terapêutica**. São Paulo: Manole, 141 p. cap.6: Doenças imunológicas: p.44-74. 1995.
- YANGER, J.A.; SCOTT, D.W.; WILCOCK, B.P. The skin and apendages. In: JUBB, K.V.; KENNEDY, P.C.; PALMER, N. **Pathology of domestic animals**, 4<sup>th</sup> ed. San Diego: Academic, 780 p. 3v.V.1, cap 5. p.531-737. 1993.
- ZEMKE, D.; YAMINI, B.; YUZBASIYAN-GURKAN, V. Mutations in the juxtamembrane domain of c-kit are associated with higher grade mast cell tumors in dogs. **Veterinary Pathology**, v.39, p. 529-535, 2002.

## **Apêndice**

## Apêndice 1 - Quadro dos resultados de todos os parâmetros em todas as amostras

Parâmetro		255/97	68/91	38/00	2071	2108	2606	3665	220/86	343/96	4515	2545	4369	4836	5161	5303	5261	5253	5225	3047	4906	28/91	108/1	5435	5449	m
Invasão	+/-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	
Distribuição	Derme superficial Derme profunda Subcutâneo	dp	ds dp s	dp	dp, s	dp:s	ds;dp	dp	ds	dp	dp; s	dp	dp	dp; s	dp	dp;s	dp;s	ds; d	dp;s	ds	dp	dp:s	ds;dp	ds;dp	ds;dp	ds;dp
Padrão	difuso / cordões/ ninhos/ tapete	c,d,n	di	c	d	d	c;n	d	ta	c	di	c,d	d	c	d	n	d	d; c	d	d	d	d	d	d; n	n;c	d
Tamanho Célula	uniforme/anisocitose	u	u	a	a	u	u	a	a	a	a	a	a	a	a	u	a	a	a	a	a	a	u	a	a	u
Forma célula	redonda a oval/ pleomórfica	r	r	r	r	p	r	p	r	p	p	p	p	r	r	r	r	p	p	p	p	r	p	p	p	r
Citoplasma	escasso/moderado/ abundante	a	m	m	m	p	m	e	m	e	m	m	a	m	m	m	e	e	m	e	m	e	e;m	m	e	e
Núcleo	uniforme/anisocariose/ vesicular/cromatina condensada	v	v	v	cc	v	v	a; v	a	a	v	cc	v	v	v; a	v	v	v; a	cc	v	v; a	v; a	u	v	v	v
Nucléolo	não visível / 1/ >1	1	2	1	1	>1	>1	1	1	>1	>1	1	1	nv	>1	1	>1	1	1	1	>1	>1	>1	>1	1	>1
Mitose/ Campo	nº	nv	nv	nv	nv	3	2	1	nv	+5	nv	1	nv	nv	5	nv	nv	nv	nv	nv	4	nv	nv	nv	nv	5
Estroma	pouco/moderado/ abundante	m	m	m	p	p	m	p	p	p	a	m	m	ab	p	m	m	e	m	m	p	a	a	m	p	e
Eosinófilos	ausente/<50/campo/ >50/campo	<50	<50	<50	>50	a	a	<50	>50	<50	<50	<50	<50	<50	<50	a	>50	<50	<50	<50	<50	<50	<50	>50	>50	a
Alterações Associadas	necrose	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-
	hemorragia	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+
	edema	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+
	colagenólise	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	degeneração de pequenas artérias	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-
	vasculite	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+
	degranulação	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-
dilatação de gl. Apócrinas	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+
Azul de Toluidina	+ / + + / + + +	+++	++	++	+++	+	+	+++	+	+++	++	++	+	+++	+++	++	+++	++	++	+	+	+	++	++	++	+
Degeneração de fibra colágena	+ / + + / + + +	+	+	+	++	++	++	++	+++	+++	++	+++	++	+++	++	+	+	++	+	+++	+++	+	+	++	++	++
AgNDR		1,33	1,93	1,57	2,33	2,6	2,17	1,83	1,59	3,7	2,15	2,33	2,75	2,8	2,26	1,34	2,74	2,05	2,49	2,88	3,7	3,12	2,85	2,9	3,1	3,6
Grau hist.		I	I	I	I	I	I	I	II	II	II	II	II	II	II	II	II	II	II	III	III	III	III	III	III	III
Morfometria Celular	Area	84,4	74	96,8	59,4	56	89	89	83,2	86,159	67,8	49,8	71	49	60,5	34	75	59	50	82,32	127	63	46	99	69	52,8
	Perimetro	43	38	46,6	36	34	42	43	41,8	42,5	38,5	33,3	39	34	36,8	28	40	35	33	42,55	51,6	36	30	45	38	33,3
Morfometria Nuclear	Area	28,5	35	26,3	19,6	31	27	32	26,7	39,4	19,1	20,9	27	18	24,5	14	20	19	21	26,78	50,6	32	23	35	28	23,3
	Perimetro	25,4	28	24,5	20,5	26	24	27	25,1	29,5	20,8	21,7	23	21	23,4	18	21	20	22	24,68	33,2	27	23	28	25	22,8