



**CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**ISABELA LUIZA AUGUSTO**

**AVALIAÇÃO DA INCIDÊNCIA DE MUTAÇÃO NO EXON 11 DO GENE  
C-KIT E DA CORRELAÇÃO DA MUTAÇÃO COM OS PADRÕES  
IMUNOISTOQUÍMICOS DE MARCAÇÃO DO RECEPTOR KIT EM  
MASTOCITOMAS CUTÂNEOS CANINOS NO BRASIL**

**DESCALVADO**

**2019**



**CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**ISABELA LUIZA AUGUSTO**

**AVALIAÇÃO DA INCIDÊNCIA DE MUTAÇÃO NO EXON 11 DO GENE  
C-KIT E DA CORRELAÇÃO DA MUTAÇÃO COM OS PADRÕES  
IMUNOISTOQUÍMICOS DE MARCAÇÃO DO RECEPTOR KIT EM  
MASTOCITOMAS CUTÂNEOS CANINOS NO BRASIL**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à Banca Examinadora, como parte das exigências da matriz curricular do curso de graduação em Medicina Veterinária da UNIVERSIDADE BRASIL Campus de Descalvado – SP.

Orientador: Prof. Dr. Paulo César Jark

**Descalvado**

**2019**

Augusto, Isabela Luiza  
A936a Avaliação da incidência de mutação no exon 11 do gene c-KIT e da correlação da mutação com os padrões imunistoquímicos de marcação do receptor KIT em mastocitomas cutâneos caninos no Brasil / Isabela Luiza Augusto. – Descalvado, 2019.  
xii, 19f. : il. ; 29,5cm.

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Banca Examinadora, como parte das exigências da matriz curricular do Curso de Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Brasil - Campus Descalvado - SP.

Orientador: Prof. Dr. Paulo César Jark

1. Oncologia. 2. Cães. 3. Imunoistoquímica. 4. c-KIT.  
I. Título.

CDD 636.70896994

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

Acadêmico (a): ISABELA LUIZA AUGUSTO

Título do Trabalho: Aplicação da incidência de mutação no exon 11  
do gene c-KIT e da correlação da mutação com os padrões  
imunistoquímicos de marcação dos receptores Kit em mastócitos  
cutâneos caninos no Brasil

Data da avaliação pela Banca Examinadora: 19 de novembro de 2019.

Banca:

Orientador (a): Paulo Cesar Jark  
Prof. Dr. Paulo Cesar Jark

Examinador 1: [Assinatura]  
Prof. MSc. Thiago Henrique M. Vargas

Examinador 2: [Assinatura]  
Prof. MSc. Thiago Andre Salvitti de Sá Rocha

APROVADO(A) pelo SESMEV em \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ com Nota: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. Luciano Melo de Souza  
Supervisor Geral TCC – SESMEV.  
Campus de Descalvado, SP.

Dedico este trabalho ao meu pai Antonio e a minha mãe Marcilia (*in memoriam*). Ao meu namorado Jonas. Meus irmãos e a todos familiares e amigos.

## AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dado saúde e força para superar as dificuldades, por minha vida, família e amigos, por permitir que tudo isso acontecesse ao longo de minha vida.

A Nossa Senhora Aparecida minha padroeira protetora que protege e ilumina todos os meus passos.

Ao meu Pai Antonio, que é meu ombro direito em todos os momentos da minha vida, sem o seu apoio nada disso seria possível, é mais que um pai é um grande amigo para toda vida.

A minha mãe Marcília (*in memoriam*) sei que de onde estiver sempre esteve comigo e iluminou cada passo dessa caminhada, é dolorido não poder comemorar essa conquista nesse plano, mas meus pensamentos sempre estarão em você.

Ao meu namorado Jonas, meu amigo, meu grande amor, por toda parceria e cumplicidade ao longo de todos esses anos, por apoiar e incentivar quando decidi ingressar ao mundo universitário com todo amor e carinho do mundo.

Aos meus irmãos Jucelaine, Valério e Vagner, quando penso em vocês a sensação que me contagia é aconchego, paz e felicidade com vocês aprendi o verdadeiro significado da palavra família. Ao meu cunhado e padrinho Carlos obrigada por estar presente em todos os momentos de minha vida, agradeço também a minha cunhada Cibele.

Aos meus Sobrinhos Bá, Cau, Vi, Ana, Le, Lulu e Fe vocês são fundamentais em minha vida, sempre estão ao meu lado cheios luz e alegria, a vocês todo meu amor e carinho.

Ao meu orientador Paulo César Jark por todo apoio, paciência e disponibilidade ao longo da elaboração do meu projeto final, por possibilitar a execução deste trabalho. Uma pessoa incrível e iluminada que tive o privilégio de trabalhar, apoia, incentiva, tem prazer em passar todo conhecimento é um profissional brilhante, um espelho de como seguir com amor e competência a profissão escolhida.

Aos meus amigos em especial Susana, Natan, Cris, Clara, Isa, Marina e Fafa por toda parceria e apoio durante essa jornada, serei sempre grata a todos vocês.

A Universidade Brasil, todos os professores que tive privilégio em conhecer, meus sinceros agradecimentos.

*“Seu nível de sucesso raramente excederá seu nível de desenvolvimento pessoal, pois o sucesso é algo que você atrai pela pessoa que se torna.”*

(Jim Rohn)

# **AVALIAÇÃO DA INCIDÊNCIA DE MUTAÇÃO NO EXON 11 DO GENE C-KIT E DA CORRELAÇÃO DA MUTAÇÃO COM OS PADRÕES IMUNOISTOQUÍMICOS DE MARCAÇÃO DO RECEPTOR KIT EM MASTOCITOMAS CUTÂNEOS CANINOS NO BRASIL**

## **RESUMO**

O mastocitoma é considerado a principal neoplasia cutânea maligna em cães. O comportamento clínico e biológico do mastocitoma é bastante variável, podendo se apresentar como uma lesão de caráter pouco agressivo à lesões localmente infiltrativas e com alto potencial metastático. Estas características dos mastocitomas os tornam tumores com comportamento biológico imprevisível. Devido a isto, alguns fatores prognósticos podem ser utilizados na tentativa de melhor prever o comportamento desta neoplasia. Estes incluem fatores clínicos como, tamanho do tumor, localização, velocidade de crescimento e presença de metástases, além de características histopatológicas como grau de Kiupel, Patnaik e índice mitótico. Porém muitas vezes mesmo com todos esses critérios anteriormente citados o MCT ainda pode apresentar comportamento imprevisível tornando necessária a busca de outros marcadores prognósticos como o padrão de marcação imunoistoquímica para o KIT e o teste de mutação por reação em cadeia da polimerase (PCR) do gene c-KIT. Até o momento não existem dados na literatura brasileira sobre a real incidência de mutação no gene c-KIT em mastocitomas cutâneos caninos no Brasil e também não há informações a respeito da correlação da mutação avaliada através de exame de PCR com os dados imunoistoquímicos de padrão de marcação do receptor KIT. Portanto o objetivo será avaliar a incidência de mutação no exon 11 do gene c-KIT em mastocitomas cutâneos no Brasil e correlacionar os mastocitomas com mutação no gene c-KIT com o padrão de marcação imunoistoquímica de acordo com os critérios já estabelecidos: perimembranoso (KIT I), intracitoplasmático focal (KIT II) ou intracitoplasmático difuso (KIT III). Para isso serão utilizadas informações do banco de dados do Laboratório VETPAT- Campinas que faz as análises de mutação por PCR também os padrões de marcação por imunoistoquímica. A taxa de mutação no gene c-kit em mastocitomas caninos no Brasil foi de 6,7% o que é inferior a dados publicados em outros países e houve uma correlação significativa entre mutação do gene c-KIT com padrões imunoistoquímicos citoplasmáticos II e III e ki67>23,

corroborando que essas variáveis são importantes na determinação do prognóstico de cães com mastocitoma cutâneo.

**Palavras-chave:** oncologia, cães, imunohistoquímica, c-KIT.

# SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	vi
RESUMO.....	viii
SUMÁRIO.....	x
LISTA DE GRÁFICOS.....	xi
LISTA DE FIGURAS.....	xii
LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS E SIGLAS.....	xiii
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>2</b>
2.1 Mastocitoma cutâneo canino.....	2
2.2 c-KIT.....	4
<b>3. JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>6</b>
<b>4. OBJETIVOS.....</b>	<b>7</b>
4.1 Objetivos gerais.....	7
4.2 Objetivos Específicos.....	7
<b>5. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>7</b>
<b>6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>8</b>
<b>7. CONCLUSÃO.....</b>	<b>14</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>15</b>

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1.</b> Classificação dos animais com mastocitoma segundo o gênero.....	9
<b>Gráfico 2.</b> Distribuição dos 359 animais com mastocitoma segundo o padrão racial..	10
<b>Gráfico 3.</b> Taxa de mutação no gene c-KIT através da técnica de PCR em 359 cães avaliados.....	12
<b>Gráfico 4.</b> Índice descritivo do padrão KIT em 22 dos 24 animais mutados.....	13
<b>Gráfico 5.</b> Índice descritivo KI-67 em 22 dos 24 animais mutados.....	14

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Padrões de coloração imunoistoquímica de MCT cutâneo canino. **A.** Padrão de coloração KIT I: localização da proteína KIT perimembranoso; **B.** Padrão de coloração KIT II: localização da proteína KIT intracitoplasmática focal; **C.** Padrão de coloração KIT III: localização intracitoplasmática difuso do KIT.....5

## LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Por cento
<	Menor
±	mais ou menos
c-KIT	gene codificador de tirosina quinase
MCT	Mastocitoma cutâneo
PCR	Reação em cadeia da polimerase
SRD	Sem raça definida
H2	Receptor de Histamina
Ki - 67	Marcador
ITD	Duplicações internas em tandem
SCF	Stem cell factor
VET PAT	Laboratório de patologia veterinária
GrafPad Instat	Programa análise de significância estatística

## 1. INTRODUÇÃO

A Oncologia representa uma especialidade de grande destaque na Medicina Veterinária e o aumento da expectativa de vida dos animais de companhia está diretamente relacionado ao aumento da incidência de neoplasias (WITHROW et. al, 2013).

A prevenção de doenças infecciosas e parasitárias, associada às melhorias na nutrição, terapêutica e prática médica resultou em grande aumento na expectativa de vida dos animais de companhia, o que infelizmente aumentou a probabilidade de desenvolvimento de doenças relacionadas à senilidade, como o câncer (WITHROW et. al, 2013). Estudos realizados no Brasil apontam o câncer como a segunda maior causa de mortes em animais de companhia (BENTUBO et. al, 2007) e como a primeira, em animais idosos (FIGHERA et. al, 2008).

A relação aos animais de companhia mudou ao longo dos anos, hoje eles são incluídos na estrutura familiar, onde o diagnóstico de uma neoplasia gera muita comoção pelos tutores desses animais, muitos dos quais tiveram experiências pessoais ou com membros da família.

O mastocitoma cutâneo canino é uma neoplasia frequente com comportamento clínico variável, podendo ser baixo ou alto grau sendo o último associado com altas taxas de mortalidade (PATNAIK et. al, 1984; KIUPEL et. al, 2011). Esta neoplasia representa entre 7 a 21% dos tumores de pele em cães e de 11 a 27% de todas as neoplasias malignas cutâneas dos cães (VAIL et. al, 1996).

Cães de raças braquiocefálicas, como Boxer, Boston terrier, Bullmastiff e Bulldog inglês possuem uma pré disposição para o desenvolvimento do mastocitoma cutâneo canino. A faixa etária próxima aos oito anos, são os fatores que mais predis põem essa neoplasia, a literatura não relata uma predisposição sexual para a incidência de mastocitoma cutâneo em cães (VAIL et. al, 1996).

Pesquisas atuais têm indicado que mutações no gene c-KIT contribuem para a gênese desta neoplasia. As alterações neste gene que codifica o receptor tirosina-quinase, também conhecido como KIT ligand ou stem cell factor, que está

relacionado ao aumento da proliferação celular dos mastócitos neoplásicos em cães (LONDON et. al, 1996; REGUERA et al, 2002, TURIN et al, 2006; WEBSTER et al, 2006).

Mutações no éxon 11 do gene c-KIT foram associados a um maior risco a desenvolver a doença e pior prognóstico em cães com mastocitoma cutâneo. (WEBSTER et al, 2006; LETARD et al, 2008; TAKEUCHI et al, 2013). O receptor KIT de tirosina quinase desempenha um papel central na sobrevivência, proliferação, diferenciação e migração de mastócitos. A expressão aberrante da proteína KIT demonstrou um indicador prognóstico negativo para MCT cutâneos caninos.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Mastocitoma cutâneo canino**

O mastocitoma cutâneo (MCT) é um tumor de células redondas derivado de mastócitos, com alta incidência em cães, representando cerca de 7% a 21% das neoplasias cutâneas em cães. Na literatura não há relatos de predisposição sexual, a idade de ocorrência é de 8 a 9 anos em média (VAIL et. al, 1996).

A etiologia do MCT não está completamente elucidada, e embora tenha sido frequentemente associado à lesões inflamatórias crônicas e à exposição da pele a substâncias irritantes (VAIL et. al, 1996), pesquisas têm indicado que mutações no gene c-KIT contribuem para a gênese desta neoplasia. As alterações neste gene que codifica o receptor tirosina-quinase (SCF também conhecido como KIT ligand, KL ou stem cell factor) que está relacionado ao aumento da proliferação celular dos mastócitos neoplásicos em cães (LONDON et. al, 1996; REGUERA et al, 2002; TURIN et al, 2006; WEBSTER et al, 2006). A mutação no gene c-KIT justificariam seu crescimento descontrolado e diferentes graus de malignidade (ZEMKE et. al, 2002).

O MCT é comum em todas as raças caninas, porém raças como Boxer, Boston Terrier, Bulldog, Labrador Retriever, Basset Hound, Beagle, Pointer, Terrier Escocês e Pastor Alemão, são descritas como as mais acometidas. Em estudos que envolvem casuística nacional, uma grande incidência de animais sem raça definida (SRD) apresentando essa formação foi descrito. (STREFEZZI et. al, 2007; MELO et al, 2012).

O MCT não tem um padrão em seu aspecto clínico. Em geral, apresentam-se clinicamente como massas teciduais pequenas, firmes e bem circunscritas, podendo ou não serem eritematosos, alopecicos e/ou ulcerados, formando nódulos ou placas. (GOLDSCHIMIDT et. al, 2002). Porém, podem também se apresentar com formas pouco definidas, macias e como lesões flutuantes, assemelhando-se a outros tumores, como o lipoma, por exemplo. Podem também ser grandes, difusas e envolver outros órgãos (LAVALLE et al, 2003). O MCT sempre deve estar incluso na lista de diferenciais de qualquer nódulo cutâneo, pois sua aparência pode variar muito se assemelhando a outros tumores e outras afecções não neoplásicas. Piores prognósticos geralmente estão associados a edema, eritema, ulceração e prurido. A derme e o subcutâneo são os sítios primários de maior importância e de maior frequência, manifestações primárias em outros locais como órgãos viscerais são raras em cães (LAVALLE et al., 2003).

O MCT na forma cutânea já foi relatado em diversos locais de acometimento, porém as regiões mais afetadas são tronco e perineo em 50% a 63% dos casos; as extremidades correspondem a 33-40% dos casos, cabeça e pescoço de 10% a 15%. As lesões múltiplas em apenas 3-14% dos relatos (SIMÕES et al., 1994; ABADIE et. al., 1999; LONDON et. al., 2003).

A palpação do MCT durante o exame físico pode levar a uma degranulação com liberação de histamina e outras substâncias vasoativas que levam a edema, eritema e formação de pápulas denominado Sinal de Darier (THAMM et. al., 2007). Hemorragia local é frequentemente encontrada durante a excisão cirúrgica e citologia por agulha fina isso ocorre devido a liberação de heparina que leva a um prejuízo na coagulação (THAMM et. al., 2007).

Úlceras gastrointestinais é uma complicação importante, afetam com maior frequência o estômago em relação ao duodeno. Geralmente levam a lesões múltiplas e superficiais, mas em algumas situações podem ocorrer perfurações. Acontecem devido ao aumento de histamina no sangue, que irá estimular o receptor H2 das células parietais, isso resulta em produção excessiva de ácido gástrico e aumento da motilidade gástrica (LONDON et. al, 1996).

A avaliação do diagnóstico dos animais com suspeita de MCT geralmente tem três metas: 1) diagnóstico definitivo por exame citológico e/ou histopatológico; 2)

estadiamento clínico; 3) documentação de síndromes paraneoplásicas (JOHNSON et al., 2002 ; RECH et al., 2004).

Das neoplasias de células redondas, o mastocitoma apresenta um padrão morfológico caracterizado por ser uma tumor de célula redonda com presença de grânulos basofílicos intracitoplasmáticos finos a grosseiros, evidenciados por corantes como o Romanowsky e seus derivados (DENICOLA et. Al., 2009; STREFEZZI et al., 2007; MACNEILL, 2011).

A graduação histopatológica (PATNAIK et al., 1984; KIUPEL et al., 2011) tem sido a ferramenta primordial para prever o comportamento biológico dos mastocitomas cutâneos (PATNAIK et al., 1984; KIUPEL et al., 2011). Atualmente as classificações de Kiupel e Patnaik são as mais amplamente utilizadas para previsão do comportamento clínico dos mastocitomas.

Apesar de inúmeros fatores prognósticos estarem estabelecidos para o MCT canino, o seu comportamento biológico altamente variável faz com que a previsão exata da evolução da neoplasias seja um dos maiores desafios na oncologia veterinária atual. Dessa forma, a busca de outros marcadores e da correlação dos mesmos tem se tornado uma ferramenta muito útil na caracterização prognóstica (JARK et al. 2013).

Além dos fatores clínicos e histopatológicos anteriormente citados, a utilização de imunistoquímica e técnicas moleculares de reação em cadeia da polimerase (PCR) têm sido utilizadas como características importantes na determinação do prognóstico. No caso de MCT a imunistoquímica para os marcadores c-KIT e ki-67 assim como o teste de mutação de PCR para gene KIT são os mais utilizados atualmente (JARK et al. 2013).

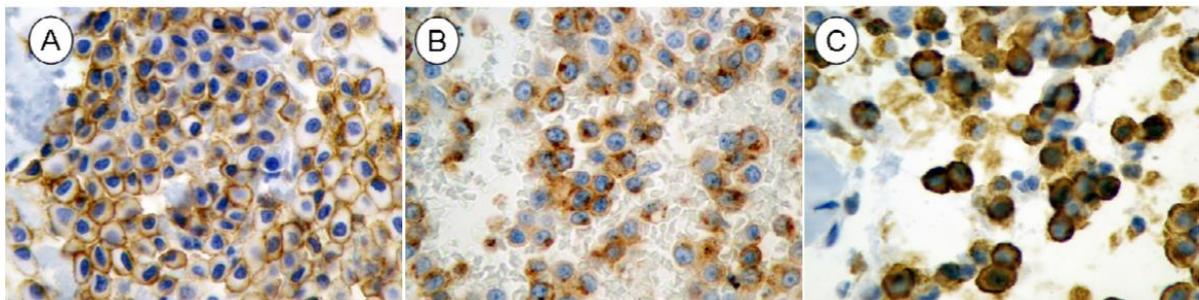
## **2.2 c-KIT**

KIT é um receptor de fator de crescimento localizado na membrana da célula que desencadeia proliferação e diferenciação celular. Normalmente é expresso nas células hematopoiéticas e mastócitos e codificado pelo proto-oncogene c-KIT (MISDORP, 2004).

A ativação contínua de KIT em certas linhagens celulares de rato levou a crescimento celular descontrolado e comportamento agressivo típico de desenvolvimento tumoral (KITAYAMA et al., 1995).

Pesquisas mostram que 15-40% dos cães com mastocitoma apresentam mutações no domínio justamembrana no gene do c-KIT (REGUERA et al., 2002; DOWNING et al., 2002; KIUPEL et al., 2004; WEBSTER et al., 2006;) e que a presença dessas mutações está altamente relacionada com o grau de diferenciação tumoral (LONDON et al., 2009).

Há basicamente duas formas de utilização do KIT como fator prognóstico. A primeira delas através da imunohistoquímica, que avalia a localização do receptor KIT no mastócito. Nesse sistema, o receptor pode apresentar 3 padrões distintos: perimembranoso (KIT I), intracitoplasmático focal (KIT II) ou intracitoplasmático difuso (KIT III). Diversos estudos imunohistoquímicos correlacionaram a presença de padrão citoplasmático (II e III) com piores sobrevidas dos pacientes (ZEMKE et al. 2002; WEBSTER et al. 2006).



**Figura 1.** Padrões de coloração imunohistoquímica de MCT cutâneo canino. **A.** Padrão de coloração KIT I: localização da proteína KIT perimembranoso; **B.** Padrão de coloração KIT II: localização da proteína KIT intracitoplasmática focal; **C.** Padrão de coloração KIT III: localização intracitoplasmática difuso do KIT (WEBSTER et al, 2006).

Além da localização do receptor KIT no mastócito neoplásico, outro fator importante correlacionado com o prognóstico dos pacientes é o teste de PCR para mutação no gene c-KIT.

Alguns trabalhos (LONDON et al., 1996; MA et al., 1999) descreveram a presença de mutações no gene c-KIT no MCT canino principalmente mutações do tipo duplicações internas em tandem (ITD). Estas mutações foram encontradas dentro de exons 11 e 12 do gene. Quando o SCF se liga ao receptor KIT sem mutação, a porção citoplasmática do receptor sofre autofosforilação. Na presença de ITD no exon 11, o

receptor é constitutivamente fosforilado, independentemente da presença do SCF. Essa fosforilação do KIT, ativa vias de sinalização que estimulam o crescimento dos mastócitos neoplásicos (LONDON et al., 1996).

Portanto, a presença desta mutação é diretamente responsável pela proliferação descontrolada do tumor, que nestes casos apresentam um pior prognóstico (WEBSTER et al., 2007). Com a descoberta de que alguns mastocitomas podem se tornar agressivos por ativação constitutiva pela sinalização de um receptor tirosina quinase, investigadores começaram a pesquisar a utilização de inibidores da tirosina quinase nos mastocitomas (LONDON et al., 2009; YAMADA et al., 2011).

Após uma década de estudos em populações caninas, a mutação ITD foi encontrada em aproximadamente 30% dos mastocitomas cutâneos nos EUA (LONDON et al., 1999; REGUERA et al., 2002; WEBSTER et al., 2006a; WEBSTER et al., 2006b). Até o momento não existem dados na literatura brasileira sobre a real incidência da mutação no gene c-KIT em MCT cutâneos caninos.

### **3. JUSTIFICATIVA**

O comportamento clínico e biológico do mastocitoma é bastante variável, podendo se apresentar como uma lesão de caráter pouco agressivo à lesões localmente infiltrativas e com alto potencial metastático.

Estas características dos mastocitomas os tornam tumores com comportamento biológico imprevisível. Devido a isto, alguns fatores prognósticos podem ser utilizados na tentativa de melhor prever o comportamento desta neoplasia. Estes incluem fatores clínicos como, tamanho do tumor, localização, velocidade de crescimento e presença de metástases, além de características histopatológicas como grau de Kiupel, Patnaik e índice mitótico.

Porém muitas vezes mesmo com todos esses critérios anteriormente citados o MCT ainda pode apresentar comportamento imprevisível tornando necessária a busca de outros marcadores prognósticos como o padrão de marcação imunoistoquímica para o KIT e o teste de mutação por PCR do gene c-KIT.

Apesar de vários estudos avaliarem a ocorrência da mutação em países europeus e nos EUA, ainda não há dados na literatura nacional sobre a incidência de mutação

do gene c-KIT em mastocitomas cutâneos no Brasil nem a correlação da mutação genética avaliada por PCR em relação aos padrões imunohistoquímicos de marcação do receptor KIT (perimembranosos, intracitoplasmático focal e intracitoplasmático difuso). A hipótese é que cerca de 15-30% dos MCT apresentam mutação no gene c-KIT e que essa é mais comum em MCT com padrões imuno-histoquímicos KIT II e III.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivos gerais**

Avaliar a incidência de mutação no exon 11 do gene c-KIT em mastocitomas cutâneos no Brasil.

### **4.2 Objetivos Específicos**

Correlacionar os mastocitomas com mutação no gene c-KIT com o padrão de marcação imunohistoquímica de acordo com os critérios já estabelecidos: perimembranoso (KIT I), intracitoplasmático focal (KIT II) ou intracitoplasmático difuso (KIT III).

## **5. MATERIAL E MÉTODOS**

O projeto foi desenvolvido através da avaliação de banco de dados de uma parceria realizada entre a Universidade Brasil e o Laboratório VETPAT Campinas – SP sob orientação do Dr. Felipe Sueiro que realiza a análise histopatológica, painel imunohistoquímico do MCT cutâneo e PCR para avaliação da mutação no gene c-KIT no Brasil.

As informações analisadas desse banco de dados são exclusivamente sobre o mastocitoma cutâneo canino sendo excluídas outras formas da doença como MCT subcutâneo ou formas viscerais da doença.

Dados a respeito da resenha do paciente como raça, gênero, idade, foram planejados e avaliados em conjunto com os dados do exame, imunohistoquímica e mutação.

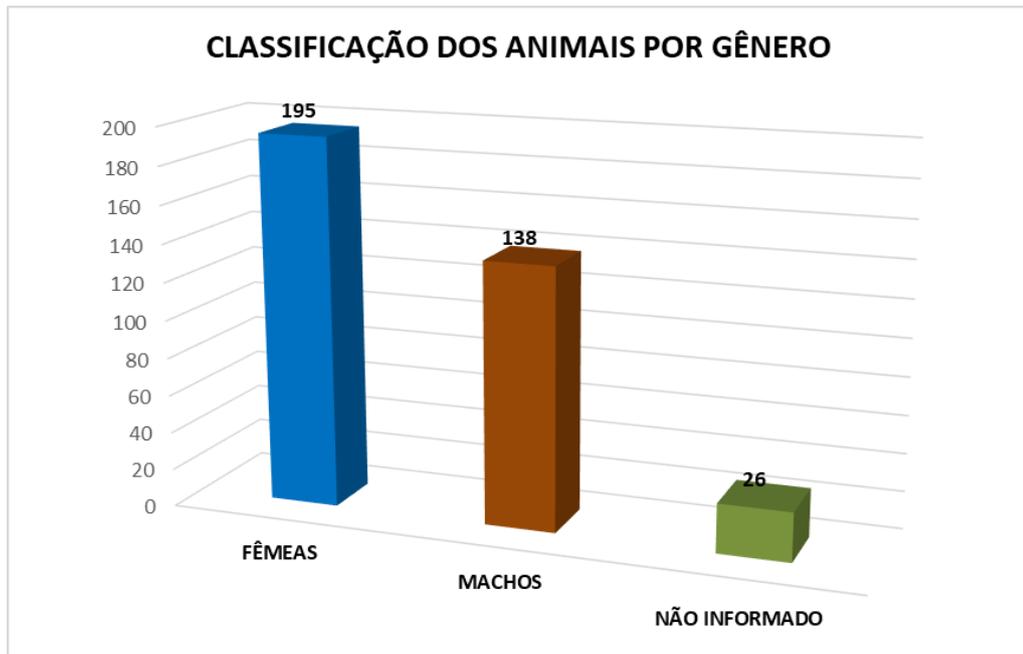
Para análise de significância estatística entre a mutação do gene c-KIT, e a correlação com padrões de marcação KIT na imunohistoquímica dos achados de cães com mastocitoma cutâneo, foi realizado teste de correlação não paramétrico de Spearman, utilizando o programa GrafPad InStat, versão 3.0, com valor de significância (0,05).

## **6. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Realizamos uma análise no banco de dados em uma parceria entre a Universidade Brasil e o Laboratório VETPAT Campinas.

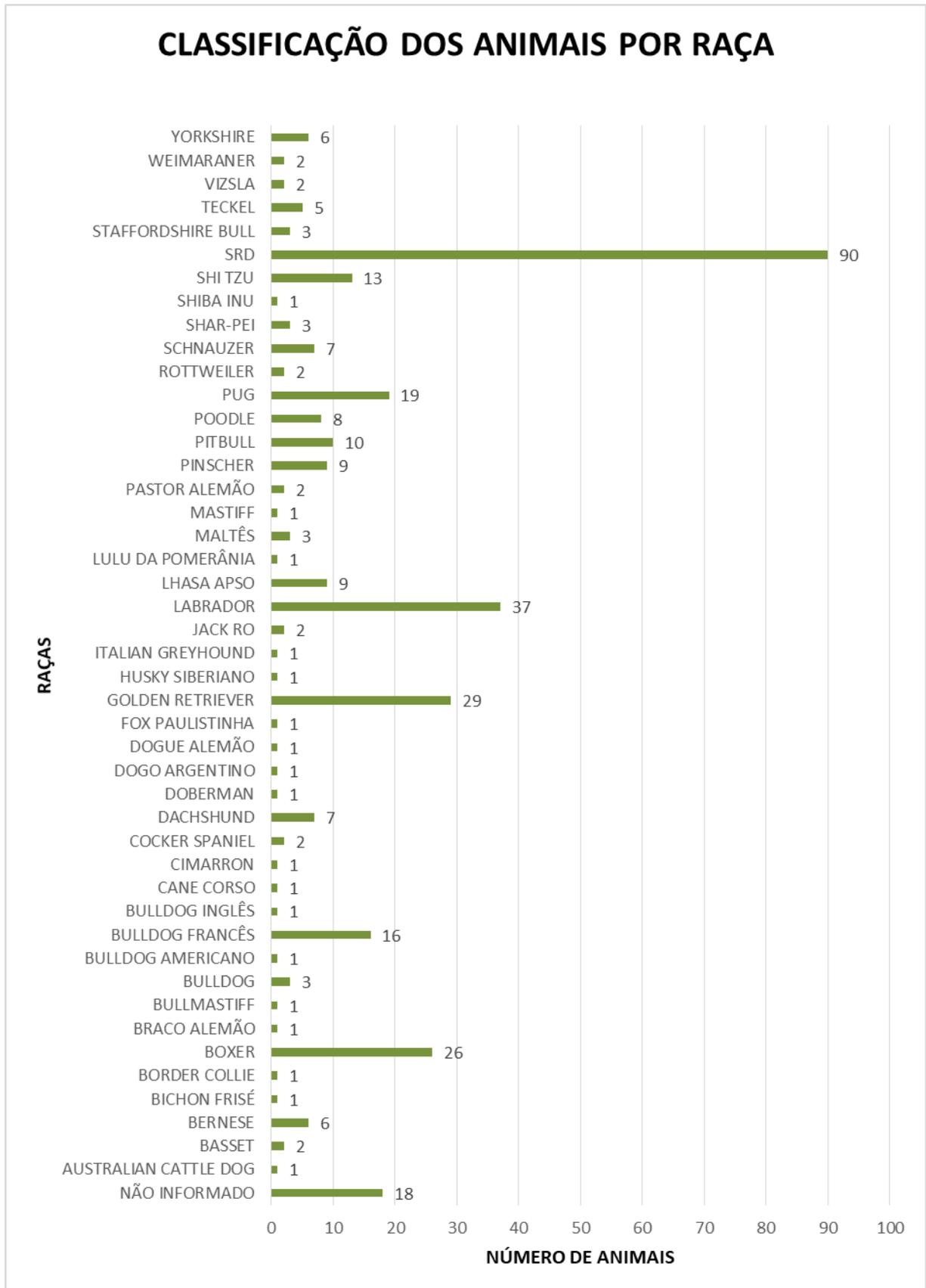
Foram avaliados dados a respeito de 359 animais da espécie canina com mastocitoma cutâneo, um número superior ao demais estudos. Em relação à distribuição do gênero dos animais foram identificadas 195 fêmeas, 138 machos e 26 não informaram o gênero (Gráfico 1).

Diversos autores, não observaram correlação entre o gênero e a incidência do tumor, neste estudo observamos uma predisposição por fêmeas como observado pelos autores (O'CONNEL & THOMSON M. 2011). No presente estudo houve uma correlação com significância estatística entre gênero e idade entre os 359 animais com mastocitoma, sendo a correlação entre fêmeas mais velhas ( $p < 0,002$ ). Neste estudo, verificou-se que a idade variou entre 1 a 17 anos com média de 8 anos, corroborando com a maioria dos relatos (VAIL et. al., 1996, WELLE et. al., 2008, STREFEZZI et al. 2010).



**Gráfico 1.** Classificação dos animais com mastocitoma segundo o gênero.

Em relação ao padrão racial, houve predomínio de animais (SRD) sem raça definida (90/359), corroborando com os autores (STREFEZZI et. al., 2007; MELO et al., 2012), seguido de Labrador (37/359), Golden (29/359) e Boxer (26/359), similar ao relatado por diversos autores (LONDON & SEGUIN 2003, WELLE et. al., 2008, STREFEZZI et. al., 2007) (Gráfico 2).

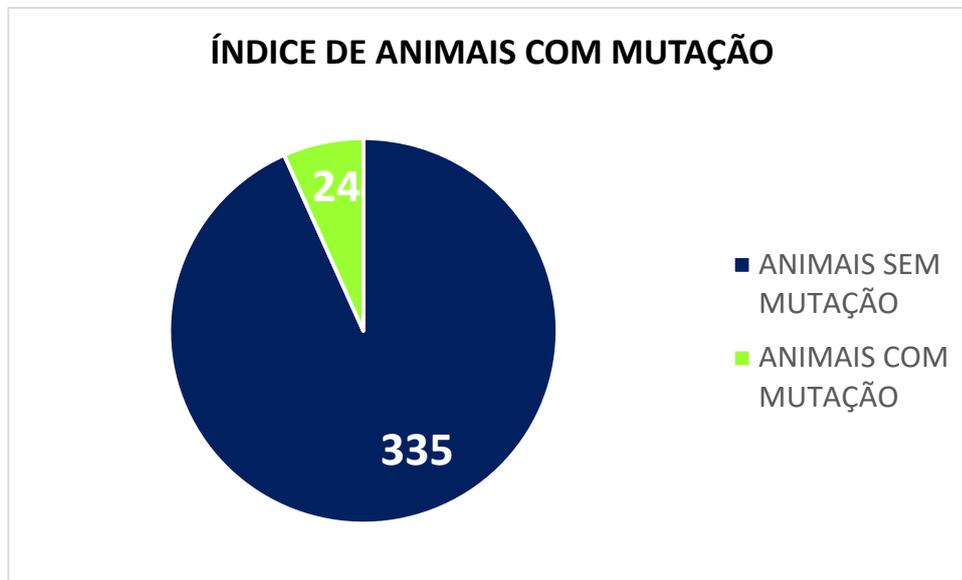


**Gráfico 2.** Distribuição dos 359 animais com mastocitoma segundo o padrão racial.

O presente trabalho avaliou 359 casos, o que é considerado um número superior aos demais estudos. Em relação a incidência de mutação no éxon 11 do gene c-KIT em mastocitoma cutâneo através da técnica de PCR utilizando primers específicos, dos 359 cães com mastocitoma do nosso estudo, 24 apresentaram mutação (24/359), representando uma taxa de mutação no gene c-KIT de 6,7%, um número menor do que o relatado pela literatura (Gráfico 3). Em estudo realizado por Webster et al., 2006b com um número de 60 cães com mastocitoma, a taxa de mutação foi de 15%. Webster et. al. 2008 realizou um estudo com 28 cães com mastocitoma, e a taxa de mutação apresentada foi de 14%. Riva et. al. 2005 realizou um estudo com 32 cães com mastocitoma e apresentou uma taxa de 25% de mutação. Em estudo realizado por Webster et. al. 2007 com um número de 56 cães com mastocitoma a taxa de mutação foi de 16%. A duplicação no éxon 11 é a mutação mais frequente em cães como relatado por Webster et al. 2006b, mas em um estudo recente Amagai et al. 2013 relataram que a duplicação no éxon 11 está presente apenas em uma pequena quantidade de mastocitomas, e se os indivíduos apresentarem mais de um tumor, a mutação pode não estar presente em todos os tumores.

O presente estudo não teve como enfoque avaliar as taxas de sobrevida, porém estudo realizado por Webster et al. 2007 com 56 cães com taxa de mutação no éxon 11 do gene c-KIT em 16%, mostrou que cães com mutações no c-KIT foram associados com tempo de sobrevida menor, com maior risco de desenvolverem recidivas e metástases que cães sem as mutações. Segundo Webster et al. 2007 isso pode ocorrer devido um aumento na proliferação celular, aumentando a taxa na qual as células entram no ciclo celular e aumentando a taxa de progressão das células neoplásicas através do ciclo celular.

O número de fêmeas com mutação do presente estudo foi de 17 (17/22) representando 77,2% dos animais mutantes, a média de idade dos animais com mutação foi de 8,8 anos.



**Gráfico 3.** Taxa de mutação no gene c-KIT através da técnica de PCR em 359 cães avaliados.

Em relação aos padrões imunohistoquímicos, dos 24 animais que apresentaram mutação, 22 continham análise imunohistoquímica. Os índices de padrões KIT analisados foram, 3 animais (13,6%) com padrão de marcação I, 11 animais (50%) possuíam padrão de marcação II e 8 animais (36,4%) eram padrão de marcação III (Gráfico 4).

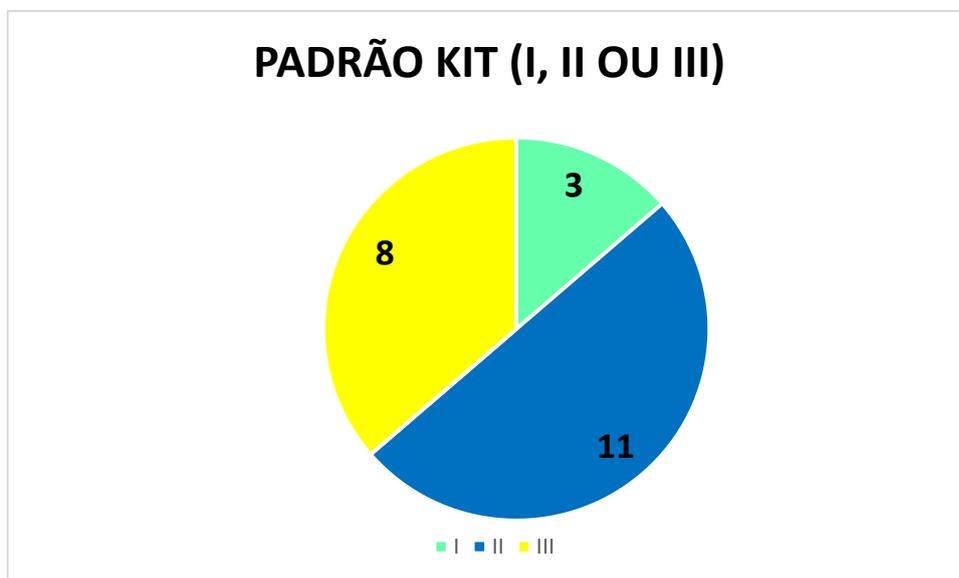
No presente estudo, os animais com a mutação no gene c-KIT avaliado pelo PCR, na imunohistoquímica 19 (86,3%) apresentavam padrão de marcação KIT II e III. Animais com a mutação no gene c-KIT, com Ki-67 >23 e padrão de marcação II e III representaram 50% dos animais com a mutação.

Dentre os animais com mutação no éxon 11 do gene c-KIT, houve correlação estatística entre cães com padrão de marcação KIT II e III e Ki-67 >23 ( $p^3 0,7313$ , Prob > |p|<sup>3</sup> <.0001), corroborando com os resultados de Webster et al. 2006, que mostraram correlação significativa entre a presença de mutação e a localização do KIT na imunohistoquímica.

Em estudo realizado por Webster et al. 2006 com um número de 60 cães com idade média de 7,8 anos, as mutações c-KIT foram identificadas em 9 dos 60 cães (15%). Ainda de acordo com o estudo de Webster et al. 2006, sete dos nove mastocitomas com mutações c-KIT tiveram localização II e III da proteína KIT e pacientes com mastocitoma contendo mutações no éxon 11 do gene c-KIT e localização do KIT II e III tiveram tempos de sobrevida significativamente menores variando de 0,5 a 2

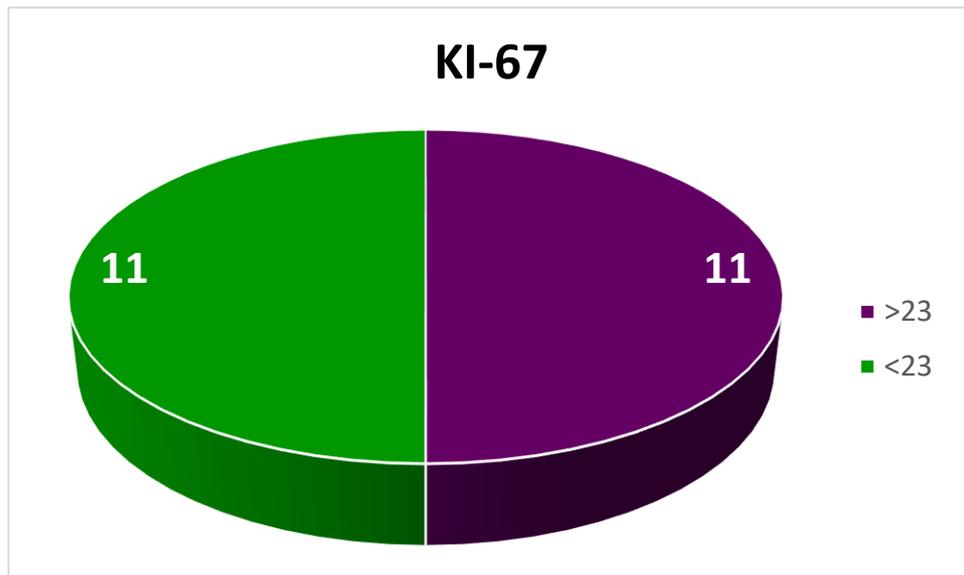
meses. Dos 9 animais com mutação no éxon 11 do gene c-KIT e localização do KIT II e III, 6 morreram durante o período de estudo. A recorrência do tumor nos animais com mutação ocorreu em 3 dos 9 animais com mutação, e variou de 0,5 a 2 meses (WEBSTER et al. 2006).

Cães com mastocitoma que apresentam mutação em c-KIT especificamente quando a marcação segue um padrão II e III apresentam prognóstico desfavorável, tendo maior chances de recidivas e menores taxas de sobrevida (WEBSTER et al., 2004).



**Gráfico 4.** Índice descritivo do padrão KIT em 22 dos 24 animais mutados.

No presente estudo avaliamos 359 cães com mastocitoma cutâneo, 24 apresentaram mutação no gene c-KIT, 22 possuíam imunohistoquímica. A imunohistoquímica desses 22 animais nos mostrou que 11 animais apresentaram Ki-67 >23 o que representa 50% dos animais com a mutação (Gráfico 5). Todos os animais mutados com o Ki-67 >23 apresentaram um padrão de marcação KIT II e III, mostrando uma correlação estatística significativa entre cães com mutação no gene c-KIT, padrão de marcação KIT II e III e com Ki-67 >23 ( $p^3$  0,7313, Prob > |p|<sup>3</sup> <.0001).



**Gráfico 5.** Índice descritivo KI-67 em 22 dos 24 animais mutados.

Em um estudo realizado por Webster et al. 2007 com 56 cães com MCT, mostrou que 22 cães que apresentaram Ki-67 > 23 tiveram um tempo significativamente menor até a recorrência local em comparação com os 34 cães com Ki-67 <23. O estudo ainda mostrou que os 22 cães com Ki-67 > 23 tiveram uma sobrevida significativamente menor e uma taxa maior de ocorrência de MCT em locais distantes, em comparação com os 34 cães com Ki-67 <23 (WEBSTER et al. 2007).

Em um estudo feito por Webster et al. 2008, com 28 cães com mastocitoma cutâneo, mostrou que apenas 2/14 cães com índices Ki-67 <23 morreram ao final do estudo, enquanto 8/14 cães com índices Ki67> 23 morreram, mostrando que índices de Ki67> 23 possuem uma sobrevida significativamente menor.

## 7. CONCLUSÃO

Com os dados coletados e analisado no presente estudo concluímos que a porcentagem de mutação no gene c-KIT em MCT no Brasil é inferior a dados americanos e europeus, sugerindo que outros fatores etiológicos estão implicados no desenvolvimento de mastocitoma cutâneo em cães no Brasil. Em relação aos padrões imunoistoquímicos, o KIT II e III foram os mais comuns em animais com a mutação, sendo compatível com dados relatados em literatura.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABADIE, J. J.; AMARDEILH, M. A.; DELVERDIER, M. E. Immunohistochemical detection of proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 in mast cell tumors from dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 215, n. 11, p. 1629-634, Dec. 1999.

AMAGAI Y., TANAKA A., MATSUDA A., JUNG K., OIDA K., NISHIKAWA S., JANG H. & MATSUDA H. 2013. Heterogeneity of internal tandem duplications in the c-kit of dogs with multiple mast cell tumours. **J. Small Anim. Pract.** 54:377-380.

BENTUBO, H.D.L.; TOMAZ, M.A.; BONDAN, E.F. et al. Expectativa de vida e causas de morte em cães na área metropolitana de São Paulo (Brasil). **Ciênc. Rural**, v.37, n.4, p.1021-1036, 2007.

DENICOLA DB. Células redondas. COWELL RL., TYLER RD., MEINKOTH JH., DENICOLA DB. **Diagnóstico Citológico e Hematologia de Cães e Gatos**. 3 ed. São Paulo: Medvet, 2009: 68-77

DOWNING, S.; CHIEN, M.B.; KASS, P.H.; MOORE, C.E.; LONDON, C.A. ; Prevalence and importance of internal tandem duplication in exons 11 and 12 of c-kit in mast cell tumors in dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v.63, p. 1718-1723, 2002.

FIGHERA, R.A.; SOUZA, T.M.; SILVA, M.C. et. al. Causas de morte e razões para eutanásia de cães da Mesorregião do Centro Ocidental RioGrandense (1965-2004). **Pesq. Vet. Bras.**, v.28, n.4, p.223-230, 2008.

GOLDSCHMIDT, M.H.; HENDRICK, M.J. Tumor of the skin and soft tissues. In: MEUTEN, D.J. **Tumors in domestic animals**. 4. Ed. Iowa State Press. Iowa, 2002. P. 105-107.

JARK, P.C.; RAPOSO, T.M.M.; ALVES, C.E.F.; DE NARDE, A.B.; LAUFER-AMORIN, R.; TINUCCI-COSTA, M. Quimioterapia neoadjuvante com vimblastina e lomustina no tratamento de um caso de mastocitoma cutâneo canino com múltiplos fatores prognósticos negativos e sobrevida superior a dois anos. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**. V.18, p.587-588, 2013.

KITAYAMA, H. ;KANAKURA, Y. ; FURITSU, T. ; TSUJIMURA, T. ; ORITANI, K. ; IKEDA, H. ; SUGAHARA, H. ; MITSUI, H. ; KANAYAMA, Y. ; KITAMURA, Y. ; MATSUZAWA, Y. Constitutively activating mutations of c-kit receptor tyrosine kinase confer factor-independent growth and tumorigenicity of factor-dependent hematopoietic cell lines. **Blood**, v.85, p. 790-798, 1995.

KIUPEL M., WEBSTER J.D., MILLER R. & KANEENE J. 2005. Impact of tumour depth, tumor location and multiple synchronous masses on the prognosis of canine cutaneous mast cell tumours. **J. Vet. Med.** 52:280-286.

KIUPEL, M.; WEBSTER, JD.; BAILEY, KL.; BEST, S.; DELAY, J.; DENTRISAC, CJ.; FITZGERALD, SD.; GAMBLE, D.; GINN, PE.; GOLDSCHMIDT, MH.; HENDRICK, MJ.; HOWERTH, EW.; JANOVITZ, EB.; LANGOHR, I.; LENZ, SD.; LIPSCOMB, TP.; MILLER, MA.; MISDORP, W.; MOROFF, S.; MULLANEY, TP.; NEYEN, I.; O'TOOLE, D.; RAMOS-VARA, J.; SCASE, TJ.; SCHUMAN, FY.; SLEDGE, D.; SMEDLEY, RC.; SMITH, K.; SNYDER, PW.; SOUTHORN, E.; STEDMAN, NL.; STEFICEK, BA.; STROMBERG, PC.; VALLI, VE.; WEISBRODE, SE.; YAGER, J.; HELLER, J.; MILLER, R. Proposal of 2-tier histologic grading system for canine cutaneous mast cell tumors to more accurately predict biological behavior. **Veterinary Pathology**. 2011, 48 (1), 147-55

KIUPELL, M.; WEBSTER, J. D.; KANEENE, J. B.; MILLER, R.; YUZBASİYAN-GURKAN, V. The use of kit and tryptase expression. Patterns as prognostic tools for canine cutaneous mast cell tumors. **Veterinary Pathology**, v.41, p.371-377, 2004.

LAVALLE, G. E.; ARAÚJO, R. B.; CARNEIRO, R. A. Tratamento clínico e cirúrgico de mastocitomas em cães. **A Hora Veterinária**, v. 22, p. 6-14. 2003.

LETARD, S., YANG, Y., HANSSENS, K., PALMERINI, F., LEVENTHAL, P. S., GUERY, S., DUBREUIL, P. (2008). Gain-of-Function Mutations in the Extracellular Domain of KIT Are Common in Canine Mast Cell Tumors. **Molecular Cancer Research**, 6(7), 1137–1145.

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

LONDON, C. A.; KISSEBERTH, W. C.; GALLI, S. J.; GEISLER, E. N.; HELFAND, S. C. Expression of stem cell factor receptor (KIT) by malignant mast cells from

spontaneous canine mast cell tumours. **Journal of Comparative Pathology**, v. 115, p. 399-414, 1996.

LONDON, C. A.; SEGUIN, B. Mast cell tumors in the dog. *Veterinary Clinics of North America*. **Small Animal Practice**, v. 33, n. 3, p. 473-89, May 2003

LONDON, C.A. et al. Multi-center, placebo-controlled, double-blind, randomized study of oral toceranib phosphate (SU11654), a receptor tyrosine kinase inhibitor, for the treatment of dogs with recurrent (either local or distant) mast cell tumor following surgical excision. **Clinical Cancer Research**, v.15, p.3856-3865, 2009.

MACNEILL AL. Cytology of canine and feline cutaneous and subcutaneous lesions and lymph nodes. **Top. Companion Anim. Med.**,2011, 26 (2), 67-76

MELO, S.R.; COSTA-CASAGRANDE, T.A; MATERA, J.M. Evaluation of Collection and Distribution of Samples for Histological, Stereological Analysis and cell culture of canine mast cell tumors. **Open Journal of Veterinary Medicine**, v. 2, p216-224, 2012.

MISDORP, W. Mast cell and canine mast cell tumours. A review. *The VeterinayQuartely*, v. 26, n. 4, p. 156-69, Dec. 2004.

O'CONNELL K. & THOMSON M. 2011. Evaluation of prognostic indicators in dogs with multiple, simultaneously occurring cutaneous mast cell tumours: 63 cases. **Vet. Comp. Oncol.** 11:51-62.

PATNAIK, AK.; EHLER, WJ.; MACEVEN, EG.; Canine cutaneous mast cell tumor: morphologic grading and survival time in 83 dogs. **Veterinary Pathology**. 1984, 21, 469-74

REGUERA, M.J. ; RABANAL, R.M. ; PUIGDEMONT, A. ; FERRER, L. ; Canine mast cell tumors express stem cell factor receptor. **American Journal of Dermatopathology**, v.22, p. 49-54, 2002.

RIVA, F., BRIZZOLA, S., STEFANELLO, D., CREMA, S., & TURIN, L. A Study of Mutations in the c-kit Gene of 32 Dogs with Mastocytoma. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, 17(4), 385–388, 2005.

SIMOES, J. P.; SCHONING, P.; BUTINE, M. Prognosis of canine mast cell tumors: a comparison of three methods. **Veterinary Pathology**, v. 31, n. 6, p. 637-47, Nov. 1994.

STREFEZZI, R.F.; Indicadores prognósticos para Mastocitomas: Estudo Morfométrico e imunohistoquímico, 2007. 93 f. Tese de doutorado (Doutorado em Patologia Experimental Comparada)- **Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**, 2007.

TAKEUCHI, Y., FUJINO, Y., WATANABE, M., TAKAHASHI, M., NAKAGAWA, T., TAKEUCHI, A., TSUJIMOTO, H. (2013). Validation of the prognostic value of histopathological grading or c-kit mutation in canine cutaneous mast cell tumours: A retrospective cohort study. **The Veterinary Journal**, 196(3), 492–498.

THAMM, D.H. ; VAIL, D.M. Mast cell tumors. In: WITHROW & MACEWEN'S, **Small animal clinical oncology**, 4<sup>a</sup> ed. St Louis, MO: Saunders Elsevier, 2007, p. 402-424.

TURIN L., ACOCELLA F., STEFANELLO D., OSELIERO A., FONDRINI D., BRIZZOLA S., RIVA F. Expression of c-KIT proto-oncogene in canine mastocytoma: a kinetic study using real-time polymerase chain reaction. **J. Vet. Diagn. Invest.**, 2006, 18 (4), 343-49

VAIL DM., WITHROW SJ. Tumors of the skin and subcutaneous tissues. WITHROW SJ., MACEWEN EG. *Small Animal Clinical Oncology*. Philadelphia: **W. B. Saunders**, 1996: 167-91

WEBSTER J., KIUPEL M., KANEENE J., MILLER R. & YUZBASIYAN-GURKAN V. 2004. The use of kit and tryptase expression patterns as prognostic tools for canine mast cell tumors. **Vet. Pathol.** 41:371-377.

WEBSTER JD., YUZBASIYAN-GURKAN V., MILLER R., KANEENE JB., KIUPEL M. Cellular proliferation in canine cutaneous mast cell tumors: associations with c-KIT and its role in prognostication. **Vet. Pathol.**, 2007, 44, 298-308.

WEBSTER JD., YUZBASIYAN-GURKAN V., THAMMS DH., HAMILTON E., KIUPEL M. Evaluation of prognostic markers for canine mast cell tumors treated with vinblastine and prednisone. **BMC Vet. Res.**, 2008, 4, 32-8

WEBSTER, J.D.; KIUPEL, M.; YUZBASIYAN-GURKAN. Evaluation of the kinase domain of c-KIT in canine cutaneous mast cell tumors. **BMC Cancer.**, 2006 a, 6, 85

WEBSTER, J.D.; YUZBASIYAN-GURKAN, V.; KANEENE, J.B.; MILLER, R.; RESAU, J.H.; KIUPEL, M. The role of c-Kit in tumorigenesis: evaluation in canine cutaneous mast cell tumors. **Neoplasia.**, 2006b, 8, 104-111.

WELLE, M.M. ; BLEY, C.R. ; HOWARD, J. ; RÜFENACHT , S. Canine mast cell tumours: a review of the pathogenesis, clinical features, pathology and treatment. **Veterinary Dermatology**, v.19, n. 6, p. 321-339, 2008.

WITHROW, S.J.; Vail, D.M.; PAGE, R.L. Why worry about cancer in pets? In: WITHROW, S.J.; VAIL, D. M.; PAGE, R.L. **Withrow e MacEwen's Small Animal Clinical Oncology**, 5.ed., introduction, p. XV-XVI, 2013.

ZEMKE, D.; YAMINI, B.; YUZBASİYANGURKAN, V. Mutations in the juxtamembrane domain of c-KIT are associated with higher grade mast cell tumors in dogs. **Vet. Pathology**. v.39, p.529-535, 2002.