

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

Alex dos Santos

**AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA, HISTOQUÍMICA E IMUNO-HISTOQUÍMICA
DE MASTOCITOMAS CUTÂNEOS EM CÃES**

Santa Maria, RS
2018

Alex dos Santos

**AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA, HISTOQUÍMICA E IMUNO-HISTOQUÍMICA
DE MASTOCITOMAS CUTÂNEOS EM CÃES**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária na Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito para a obtenção do título de **Mestre em Medicina Veterinária.**

Orientadora: Prof^a Dr^a. Glauca Denise Kommers

Santa Maria, RS
2018

Alex dos Santos

**AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA, HISTOQUÍMICA E IMUNO-HISTOQUÍMICA
DE MASTOCITOMAS CUTÂNEOS EM CÃES**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária na Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito para a obtenção do título de **Mestre em Medicina Veterinária**.

Aprovado em 5 de Fevereiro de 2018:

Glauca Denise Kommers, PhD (UFSM)
(Presidente/Orientadora)

Cristina Gevehr Fernandes, Dra. (UFPel)

Mariana Martins Flores, Dra. (UFSM)

Santa Maria, RS
2018

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, que nunca mediram esforços para que eu tivesse o melhor que eles podiam proporcionar, começando com o amor incondicional, carinho, educação e apoio a todas as minhas decisões. Eu amo vocês.

A minha irmã, por toda a ajuda, apoio e incentivo.

A minha namorada, Isabel, apesar da distância, sempre se fez presente de uma forma ou de outra, me incentivando e apoiando em todos os momentos importantes.

Ao pessoal do Laboratório de Patologia Animal da UPF, Tanise, Cláudia, Gabriela Fagundes, Gabriela Dalmora e Prof. Adriana, meu muito obrigado pela amizade e apoio no início da minha “vida patológica”.

Aos meus colegas de laboratório, Taiara, Harlan, Pamela, Walter, Tatiane, Flávia e Renata, que sempre me auxiliaram e permitiram que este trabalho fosse possível.

A todos os estagiários do LPV (Stella, Eryca, Betina, Douglas e Alana) e aos que já passaram por aqui (Bianca, Cristina, Fabi, Gabriela) que de forma direta ou indireta me auxiliaram durante esse período no laboratório.

Aos professores do LPV - Glaucia Kommers, Mariana Flores, Luiz Francisco e Rafael Figuera, e a ex-professora Márcia Cristina Silva, pelos ensinamentos e todos os conhecimentos repassados, sem dúvidas todos foram importantes para o meu crescimento profissional.

Ao Programa de Pós-Graduação pela oportunidade e ao CNPq pelos recursos financeiros.

Agradeço em especial a minha orientadora, Prof. Dr^a. Glaucia Kommers, pelo acompanhamento durante toda a pós-graduação, pela confiança, amizade, conselhos e paciência durante esses dois anos. Por ter me cobrado nos momentos certos e incentivando nos momentos difíceis. Por ter me aceito e confiado em mim, sem que me conhecesse direito. Sem dúvidas você foi importante para meu crescimento pessoal e profissional.

Às demais pessoas que contribuíram e incentivaram de alguma forma a realização deste trabalho,

A TODOS, MEU SINCERO, MUITO OBRIGADO!

“É melhor tentar e falhar, que preocupar-se e ver a vida passar. É melhor tentar, ainda que em vão que sentar-se, fazendo nada até o final. Eu prefiro na chuva caminhar, que em dias frios em casa me esconder. Prefiro ser feliz embora louco, que em conformidade viver”.

Martin Luther King

RESUMO

AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA, HISTOQUÍMICA E IMUNO-HISTOQUÍMICA DE MASTOCITOMAS CUTÂNEOS EM CÃES

AUTOR: Alex dos Santos
ORIENTADORA: Glaucia Denise Kommers

O mastocitoma é o tumor mesenquimal cutâneo mais prevalente do cão. Na região de Santa Maria, RS, este neoplasma corresponde a 20% dos tumores malignos de pele diagnosticados na rotina laboratorial. O diagnóstico clínico-patológico pode ser realizado através da citologia, exame histopatológico e imuno-histoquímico. A técnica de imuno-histoquímica é empregada para diferenciar tumores biologicamente mais agressivos de tumores menos agressivos. Entretanto, alguns dos imunomarcadores atualmente disponíveis sofrem influência pela fixação em formol, interferindo nos resultados. O principal objetivo deste estudo foi avaliar em mastocitomas cutâneos caninos a interferência do formol na imunomarcagem para a proteína KIT e a proteína Ki67 em quatro tempos de fixação pré-estabelecidos (24, 48, 72 e 96h). Foram utilizados ainda, dois sistemas de amplificação para determinar possíveis diferenças na detecção para cada um dos dois anticorpos estudados. Este estudo foi dividido em duas partes: um estudo retrospectivo, analisando amostras de tecidos de 25 casos de biópsias sem conhecimento do tempo de fixação; e um estudo prospectivo, analisando amostras de tecidos de 12 casos com tempos de fixação conhecidos. Em ambos os estudos foram aplicados dois sistemas de gradação histológica (Patnaik e Kiupel), a coloração especial de Azul de Toluidina e a imuno-histoquímica para as proteínas KIT e Ki67. Adicionalmente, no estudo prospectivo, foram testados dois sistemas de amplificação para a proteína Ki67 (biotinilado e não biotinilado) e a técnica de AgNOR (contagem das regiões organizadoras nucleolares argirofílicas). Foi observado que a fixação por até 96h não interferiu na avaliação imuno-histoquímica para a proteína KIT. Porém, para a proteína Ki67, houve marcada interferência quando a fixação foi superior a 24h. Ambos os sistemas de amplificação utilizados mostraram resultados satisfatórios. Porém, não houve diferenças e/ou melhora nos resultados da imunomarcagem para o Ki67, quando comparados os dois sistemas de amplificação. A utilização adicional do método histoquímico de AgNOR, para avaliar a taxa de proliferação celular, é sugerida quando o tempo de fixação do neoplasma for desconhecido ou superior a 24h.

Palavras-chave: Cão. Pele. Neoplasma. Mastocitoma. Comportamento biológico. AgNOR. Imuno-histoquímica. Ki-67. KIT.

ABSTRACT

HISTOLOGICAL, HISTOCHEMICAL AND IMMUNOHISTOCHEMISTRY EVALUATION OF SKIN MAST CELL TUMORS IN DOGS

AUTHOR: Alex dos Santos
ADVISOR: Glaucia Denise Kommers

Mast cell tumors (MCTs) is the most prevalent cutaneous mesenchymal tumor of the dog. In the region of Santa Maria, RS, this neoplasm corresponds to 20% of the malignant skin tumors diagnosed in the laboratory routine. The clinical-pathological diagnosis can be made through cytology, histopathological examination and immunohistochemistry. The immunohistochemical technique is used to differentiate biologically more aggressive tumors from less aggressive tumors. However, some of the currently available immunomarkers are influenced by formalin fixation, interfering with the results. The main objective of this study was to evaluate the interference of formaldehyde in the immunostaining of KIT protein and Ki67 protein in four pre-established fixation times (24, 48, 72 and 96h) in MCTs. Two amplification systems were also used to determine possible differences in detection for each one of the antibodies studied. This study was divided into two parts: a retrospective study, analyzing tissue samples from 25 cases of biopsies without knowledge of fixation time; and a prospective study, analyzing tissue samples from 12 cases with known fixation times. In both studies, two histological grading systems (Patnaik and Kiupel), the special staining of toluidine blue and the immunohistochemistry for KIT and Ki67 proteins were applied. Additionally, in the prospective study, two amplification systems (biotinylated and not biotinylated) for the Ki67 protein and the AgNOR technique (counting of the argiophilic nucleolar organizing regions) were tested. It was observed that the fixation for up to 96h did not interfere in the immunohistochemical evaluation for the KIT protein. However, for Ki67 protein, there was marked interference when the fixation was greater than 24h. Both amplification systems showed satisfactory results. However, there were no differences and/or improvement in the results of immunostaining for Ki67 when compared the amplification systems. The additional use of the AgNOR method to evaluate the rate of cell proliferation is suggested when the fixation time of the neoplasm is unknown or greater than 24 hours.

Keywords: Dog. Skin. Neoplasm. Mast Cell Tumors. Biological behavior. AgNOR. Immunohistochemistry. Ki-67. KIT.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	9
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	11
2.1	MASTÓCITO.....	11
2.2	MASTOCITOMA CUTÂNEO CANINO.....	11
2.2.1.	Definição.....	11
2.2.2.	Epidemiologia.....	12
2.2.3.	Aspectos clínicos.....	12
2.2.4.	Diagnóstico.....	14
2.2.4.1.	<i>Graduação histológica.....</i>	14
2.2.4.2.	<i>Técnicas histoquímicas.....</i>	16
2.2.4.3.	<i>Imuno-histoquímica.....</i>	17
2.2.4.4.	<i>Reação em cadeia de polimerase.....</i>	21
3	ARTIGO - Utilização de diferentes tempos de fixação e aplicação de dois sistemas de amplificação imuno-histoquímicos na detecção das proteínas KIT e Ki67 em mastocitomas cutâneos caninos.....	23
4	CONCLUSÃO.....	37
	REFERÊNCIAS.....	38
	APÊNDICE A.....	40
	APÊNDICE B.....	41

1 INTRODUÇÃO

Na medicina veterinária, a oncologia é a especialidade que mais se destacou nos últimos anos, principalmente em decorrência da alta prevalência dos tumores cutâneos nos animais domésticos (SOUZA et al., 2006). Este crescimento deve-se ao fato da maior aproximação afetiva entre cães e o homem (FIGHERA, 2008). A prova deste avanço é demonstrada nos inúmeros trabalhos, livros e estudos retrospectivos atualmente disponíveis, que fornecem informações detalhadas sobre os mais variados tumores, abrangendo tanto a patogênese, quanto características clínico-epidemiológicas regionais e achados histológicos e imuno-histoquímicos (FURLANI et al., 2008; MEIRELLES et al., 2010; MEUTEN, 2017; SLEDGE et al., 2016).

Em um levantamento sobre causas de morte e razões para eutanásia em cães realizado no Laboratório de Patologia Veterinária (LPV) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), durante um período de 39 anos, as neoplasias corresponderam a 7,8% dos casos (FIGHERA et al., 2008). Foi demonstrado que o que o mastocitoma é o tumor de pele mais prevalente na rotina diagnóstica deste laboratório, perfazendo 21% dos casos (SOUZA et al., 2006). Este percentual elevado estimula patologistas e clínicos na investigação do comportamento biológico deste tumor (FURLANI et al., 2008; PATNAIK et al., 1984; SLEDGE et al., 2016).

A graduação histológica segue sendo o principal método complementar ao diagnóstico dos mastocitomas cutâneos caninos (MCC) na rotina de grande parte dos laboratórios brasileiros, numa tentativa de agregar elementos prognósticos ao diagnóstico histopatológico (NATIVIDADE et al., 2014; SILVA et al., 2014). Porém, devido à crescente afetividade dos proprietários pelos seus animais de estimação, a procura de técnicas auxiliares que forneçam elementos mais precisos no diagnóstico, prognóstico e terapia para seus cães vem aumentando (KIUPEL, 2017; SLEDGE et al., 2016).

As técnicas imuno-histoquímicas (IHQ) e moleculares (PCR) já mostraram valor inestimável, sendo fundamentais para diferenciar tumores biologicamente mais agressivos de um grupo dos tumores biologicamente menos agressivos, influenciando na escolha do tratamento e no prognóstico (KIUPEL et al., 2004, LONDON et al., 2009; SLEDGE et al., 2016). Entretanto, alguns marcadores utilizados sofrem interferência pela fixação em formol, podendo vir a dificultar a avaliação prognóstica dos MCCs em uma rotina diagnóstica (FLORES et al., 2016; RAMOS-VARA & MILLER, 2014).

Com base nisso, os objetivos principais deste estudo foram: (1) através de um estudo retrospectivo, aplicar dois sistemas de graduação histológica e avaliar a eficácia

da imunomarcção para KIT e Ki67 em MCCs com tempos de fixação desconhecidos; (2) através de um estudo prospectivo, avaliar a imunomarcção para KIT e Ki67 em MCCs em quatro tempos determinados de fixação no formol e utilizar dois sistemas de amplificação diferentes (biotinilado e não biotinilado) durante a IHQ, na tentativa de determinar possíveis diferenças na detecção para cada um dos anticorpos utilizados. A finalidade do estudo foi fornecer subsídios técnicos para a aplicação de métodos imunohistoquímicos de valor prognóstico na rotina diagnóstica de laboratórios que apresentem dificuldades com relação à variação nos tempos de fixação das amostras de MCCs.

A metodologia, resultados, discussão e conclusões que fazem parte desta Dissertação serão apresentados na forma de um artigo científico (disponível no Capítulo 3) a ser submetido para publicação na revista Pesquisa Veterinária Brasileira. Os critérios histológicos empregados para a avaliação dos sistemas de graduação estão nos Apêndices A e B.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Esta revisão tratará de mastocitomas cutâneos caninos, sendo abordados aspectos relacionados à sua origem, aspectos epidemiológicos, clínicos, patológicos e imuno-histoquímicos.

2.1 MASTÓCITO

O mastócito é uma célula redonda que tem origem na medula óssea e está presente nas mucosas e no tecido conjuntivo dos animais (KIERSZENBAUM & TRES, 2012). Na avaliação histopatológica, são frequentemente observados adjacentes aos vasos sanguíneos, sendo facilmente identificados através dos grânulos citoplasmáticos (BANKS, 1991). É importante comentar que apesar dos mastócitos serem semelhantes em todos os órgãos, os grânulos citoplasmáticos são mais abundantes nos mastócitos da pele (KIERSZENBAUM & TRES, 2012).

A principal função do mastócito é armazenar e sintetizar mediadores inflamatórios, fatores quimiotáticos e citocinas, substâncias que são encontradas nos grânulos citoplasmáticos (BANKS, 1991). Além disso, esta célula está envolvida diretamente na indução da inflamação aguda, reparação tecidual na inflamação crônica, em reações de hipersensibilidade e em condições proliferativas (mastocitose e mastocitoma) (RECH & GRAÇA, 2006; SNYDER, 2013).

2.2 MASTOCITOMA CUTÂNEO CANINO

2.2.1 Definição

O mastocitoma cutâneo canino (MCC) é um tumor mesenquimal de células redondas originário de uma proliferação exacerbada de mastócitos (GOLDSCHMIDT & HENDRICK, 2002). A maior ocorrência é em cães, sendo menos frequente em gatos e raro em outras espécies (KIUPEL, 2017). Além da pele, ocasionalmente pode ocorrer em vísceras (KIUPEL, 2017; PATNAIK et al., 1984; STREFEZZI et al., 2010; SLEDGE et al., 2016). É difícil estabelecer um prognóstico para cães com mastocitoma, pois o comportamento biológico do tumor é altamente variável (GOLDSCHMIDT & HENDRICK, 2002; GROSS et al., 2009; KIUPEL, 2017).

2.2.2 Epidemiologia

O mastocitoma é o tumor de pele mais comum dos cães, variando de 20 a 27% de todos os neoplasmas cutâneos malignos nesta espécie (GOLDSCHMIDT & HENDRICK, 2002; KIUPEL et al., 2011; PATNAIK et al., 1984; ROMANSIK et al., 2007; SLEDGE et al., 2016). Na região central do Rio Grande do Sul, este tumor correspondeu a 21% das neoplasias cutâneas em cães (SOUZA et al., 2006).

O risco dos cães desenvolverem o tumor aumenta com o decorrer da idade, sendo a faixa etária mais acometida a de 8 anos (KIUPEL, 2017). Embora pouco frequente, há relatos acometendo cães de quatro meses de idade acometidos (GOLDSCHMIDT & HENDRICK, 2002; KIUPEL, 2017). Não tem sido observada predisposição sexual (GOLDSCHMIDT & HENDRICK, 2002; KIUPEL, 2017).

Dentre as raças mais acometidas destacam-se as raças Boxer, Labrador, Golden Retriever, Boston Terrier, Bulldog Inglês, Cocker Spaniel, Shar-pei, Schnauzer, Husky Siberiano, Weimaraner e Pug, sendo o Boxer o mais predisposto (GOLDSCHMIDT & HENDRICK, 2002; KANDEFER-GOLA et al., 2015; KIUPEL et al., 2011; WEBSTER et al., 2006). Estudos realizados em São Paulo (2), Uberlândia (1) e Brasília (1) demonstraram uma incidência de 28% (PINTO et al., 2007) e 26% (STREFEZZI et al., 2010), 23% (NATIVIDADE et al., 2014) e 20% (SILVA et al., 2014) em cães Boxer. Embora haja diferenças quanto à epidemiologia, é importante ressaltar que independente da idade, raça e local, o comportamento biológico do mastocitoma cutâneo é altamente variável (GROSS et al., 2009; KIUPEL, 2017).

2.2.3 Aspectos clínicos

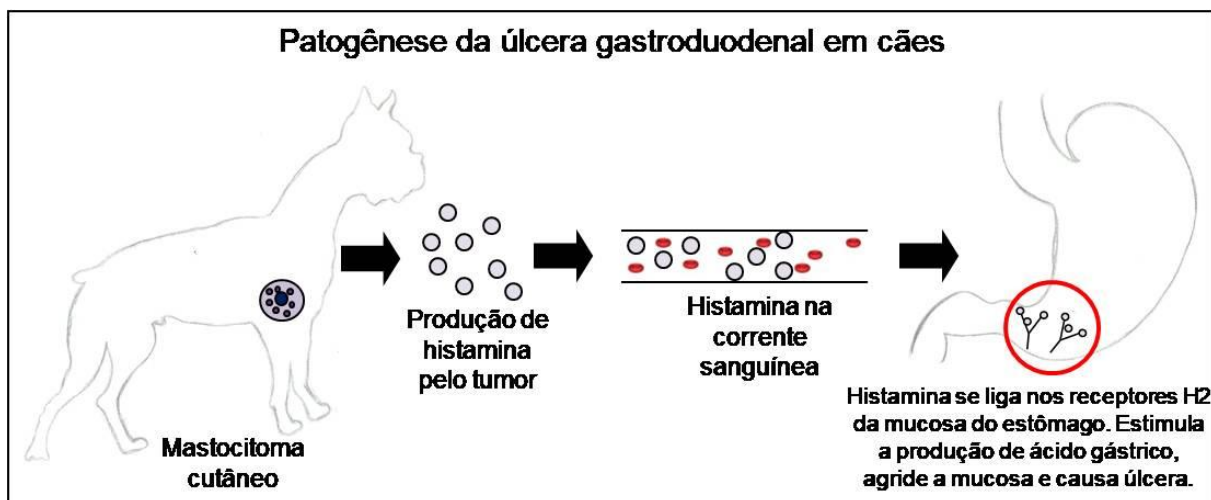
As regiões do corpo mais acometidas compreendem os membros (torácico e pélvico), região perineal, abdômen, região cervical, tórax, dorso, escroto e boca (FURLANI et al., 2008; NATIVIDADE et al., 2014; ROSSETTO et al., 2009; OZAKI et al., 2007). Todavia, cães com mastocitomas localizados nas regiões perineal, inguinal, prepucial e ungueal, tendem a apresentar menor sobrevida (FURLANI et al., 2008; GOLDSCHMIDT & HENDRICK, 2002). Do mesmo modo, tumores localizados na face tendem a apresentar maior risco de metástases (GROSS et al. 2009).

Mastocitomas cutâneos podem desenvolver-se tanto na derme como no tecido subcutâneo na forma de nódulos únicos ou múltiplos, variando de pequenos nódulos a

grandes massas (GROSS et al., 2009). Apresentam aspecto amolecido a firme, nodular ou pendular, bem ou pouco circunscrito e aderido ou flutuante (GOLDSCHMIDT & HENDRICK, 2002). Frequentemente são alopecicos, eritematosos e edematosos (GROSS et al., 2009). Ulceração e prurido são achados comuns em tumores grandes e pouco circunscritos (KIUPEL, 2017).

O mastocitoma cutâneo pode causar síndromes paraneoplásicas (KIUPEL, 2017). Essas síndromes podem apresentar-se de forma local ou sistêmica e compreendem alterações clínicas heterogêneas relacionadas ao tumor primário (GOLDSCHMIDT & HENDRICK, 2002). Natividade et al. (2014) observaram que houve uma associação significativa para a ocorrência de recidivas locais e síndromes paraneoplásicas em tumores grandes. Alterações como edema, eritema e prurido, são sinais relacionados com síndrome paraneoplásica local. Estes sinais são consequência da desgranulação dos mastócitos neoplásicos com liberação de histamina, heparina e proteases durante a manipulação do tumor (KIUPEL, 2017). O efeito sistêmico mais importante ocorre no sistema digestório, com formação de úlcera gastroduodenal. As úlceras são observadas principalmente na região pilórica e no duodeno (GOLDSCHMIDT & HENDRICK, 2002). O mecanismo de formação da úlcera é demonstrado na Figura1.

Figura1. Patogênese da úlcera gastroduodenal em cães.



Os sinais clínicos decorrentes das úlceras são: anorexia, vômitos, hematêmese, melena e anemia. Em casos mais graves podem ocorrer peritonite e morte do cão devido à perfuração da úlcera (GOLDSCHMIDT & HENDRICK, 2002).

2.2.4 Diagnóstico

Um método útil de diagnóstico não invasivo rápido e pré-cirúrgico para mastocitomas é a citologia, dada a facilidade da observação dos grânulos citoplasmáticos (SOUZA et al., 2006). Características morfológicas como pleomorfismo celular e nuclear, cariomegalia e figuras de mitose são avaliados para graduar este tumor (CAMUS et al., 2016). Contudo, o grande desafio está na graduação histológica do tumor e na busca do comportamento biológico através de ferramentas moleculares (KIUPEL, 2017).

O exame histopatológico é de extrema importância para a graduação histológica do mastocitoma (SILVA et al., 2014). Do mesmo modo, estudos moleculares vêm fornecendo métodos alternativos para diferenciação dos mastócitos, auxiliando na busca de um prognóstico mais acurado para cães com mastocitoma (KIUPEL et al., 2004; SCASE et al., 2006; SLEDGE et al., 2016; WEBSTER et al., 2006).

2.2.4.1 Graduação histológica

Há quatro décadas, a graduação histológica é a principal ferramenta utilizada pelos patologistas para prognóstico do mastocitoma cutâneo canino (MCC) (BOSTOCK, 1973; KIUPEL et al., 2011; PATNAIK et al., 1984). Através das características histomorfológicas é possível obter um grau para cada tumor. O grau histológico é extremamente importante e essencial para estabelecer testes de estadiamento e terapias auxiliares para cães com mastocitoma (NORTHRUP et al., 2005a). Três métodos de graduação já foram propostos, sendo dois deles divididos em três graus (BOSTOCK, 1973; PATNAIK et al. 1984), e um, em dois graus (KIUPEL et al. 2011). Os critérios histológicos utilizados para graduar os mastocitomas nos diferentes sistemas são apresentados no Quadro 1.

O primeiro sistema de graduação histológica foi proposto por Bostock (1973); uma década mais tarde, foi proposto o sistema de Patnaik (PATNAIK et al. 1984), sendo este método o mais utilizado e aplicado nos laboratório de patologia veterinária (BLACKWOOD et al., 2012; NATIVIDADE et al., 2014). Tanto o sistema de Bostock quanto o sistema Patnaik avaliam os mastocitomas em três categorias, a única diferença é que a classificação histológica entre eles é em ordem inversa.

Embora muito utilizado, o sistema de Patnaik é considerado por muitos (NORTHRUP et al., 2005a; NORTHRUP et al., 2005b) como de difícil aplicação, principalmente por incluir um grande número de critérios histológicos subjetivos. Esta

dificuldade na aplicação da graduação ocorre principalmente nos mastocitomas grau II, um grupo que acaba incluindo tanto MCCs bem diferenciados (mas com critérios que os excluem do grau I), quanto MCCs menos diferenciados (porém sem determinados critérios para serem classificados em grau III) (KIUPEL et al., 2011; SILVA et al., 2014; SLEDGE et al., 2016).

Quadro1. Sistemas de graduação histológica para o mastocitoma canino.

Sistema	Grau histológico	Crítérios de graduação histológica
Bostock	Grau I	Mastócitos pouco diferenciados e pouco circunscritos, com pleomorfismo celular e nuclear acentuado, presença de células gigantes multinucleadas com figuras de mitose frequentes.
	Grau II	Mastócitos moderadamente diferenciados, com pleomorfismo celular e nuclear moderado, citoplasma indistinto e poucas mitoses.
	Grau III	Mastócitos bem diferenciados, monomórficos, com citoplasma distinto, pleomorfismo nuclear e celular discreto, e raras figuras de mitose.
Patnaik	Grau I	Mastócitos bem diferenciados e bem circunscritos, restrito a derme superficial, com células redondas, monomórficas, tendo citoplasma amplo e bem delimitado, com grânulos citoplasmáticos evidentes e mitoses ausentes.
	Grau II	Mastócitos menos diferenciados e pouco circunscritos, invadindo a derme superficial, profunda e tecido subcutâneo, com células ovais a moderadamente pleomórficas com algumas células binucleadas, tendo citoplasma pouco evidente e com poucos grânulos citoplasmáticos. Figuras de mitose estão presentes.
	Grau III	Mastócitos pouco diferenciados e pouco circunscritos, invadindo a derme profunda e tecido subcutâneo, com pleomorfismo celular acentuado, presença de células binucleadas e/ou multinucleadas, citoplasma indistinto com grânulos citoplasmáticos geralmente ausentes. Áreas de necrose, invasão linfática e figuras de mitose são frequentes.
Kiupel	Alto grau	Apresentar em 10 campos de grande aumento (CGA) pelo menos sete figuras mitóticas ou pelo menos três células multinucleadas, pelo menos três núcleos bizarros e/ou presença de cariomegalia em pelo menos 10% das células tumorais.
	Baixo grau	O mastocitoma que não apresentar algum dos critérios citados para o alto grau é incluído nesta categoria.

Fonte: BOSTOCK, 1973; KIUPEL et al., 2011; PATNAIK et al., 1984.

Um estudo realizado entre patologistas americanos propôs avaliar através da graduação histológica rotineira a subjetividade da graduação do mastocitoma canino entre

avaliadores de uma mesma instituição (NORHRUP et al., 2005a). Neste estudo foram selecionados 60 casos de mastocitoma previamente diagnosticados e disponibilizados a 10 patologistas experientes para graduação às cegas. Destes 60 casos houve concordância de todos os patologistas em somente 4/60 tumores avaliados, uma concordância menor que 7%. Os três graus histológicos (I, II e III) foram atribuídos a um mesmo tumor em 6/60 casos. Posteriormente, estes mesmos patologistas avaliaram os mesmos 60 tumores com critérios histológicos pré-estabelecidos e definidos (NORHRUP et al., 2005b). Neste estudo há concordância entre os patologistas aumentou para 26% (16/60) em relação ao estudo anterior. Este aumento foi estatisticamente significativo, contudo, a variação interobservador persistiu. Esta variação ocorreu somente em mastocitomas graduados entre os graus I e II e entre os graus II e III. Os três graus histológicos foram atribuídos a um mesmo tumor em 3/60 casos.

É importante ressaltar que a subjetividade entre patologistas em relação à graduação de tumores não se restringe somente a veterinária, esta subjetividade também é observada na classificação histológica de neoplasmas na medicina humana (REED et al., 1999; SCHOLTEN, 2004).

Em 2011, visando principalmente reduzir as divergências em relação aos tumores de grau II, mas também criar um sistema que fosse mais facilmente aplicado (com menos critérios histológicos), Kiupel et al. (2011) propuseram um novo sistema de graduação do MCC. Usando o sistema de classificação em dois graus, houve uma concordância entre patologistas de 96,8% quando comparada com a graduação em três graus (KIUPEL et al., 2011).

Embora a graduação histológica seja a ferramenta mais utilizada para o diagnóstico do mastocitoma, ela possui limitações, e o uso de técnicas auxiliares é essencial para prever o comportamento biológico deste tumor (FONSECA-ALVES et al., 2015; MAGLENNON et al., 2008; SAKAI et al., 2002; TURIN et al., 2006; WEBSTER et al., 2007).

2.2.4.2. Técnicas histoquímicas

Atualmente, duas técnicas histoquímicas são empregadas para auxiliar no diagnóstico e prognóstico de mastocitomas, o azul de toluidina (AT) e a técnica de AgNOR (contagem das regiões organizadoras nucleolares argirofílicas). A primeira (AT) permite a visualização dos grânulos citoplasmáticos corados em púrpura pela reação de

metacromasia (CULLING et al., 1985) e a segunda mostra a taxa de proliferação celular dos mastócitos neoplásicos (SLEDGE et al., 2016; WEBSTER et al., 2007).

O azul de toluidina é uma coloração histoquímica importante em casos onde há escassos grânulos citoplasmáticos, sendo quase impossível de observá-los na coloração de rotina (hematoxilina-eosina). Esta técnica tem a capacidade de mudar a coloração sem alterar a estrutura química dos mastócitos, facilitando a observação de seus grânulos (CULLING et al., 1985). A metacromasia pode ser observada de forma discreta, moderada ou acentuada (RECH et al., 2004).

O AgNOR é uma técnica relativamente simples e importante na rotina laboratorial pois evidencia células neoplásicas que estão progredindo no ciclo celular, diferentemente da coloração de HE que auxilia somente na visualização de figuras de mitose (RECH et al., 2004; SLEDGE et al., 2016).

Rech et al. (2004), em um estudo de 45 casos, observou que a média de AgNOR para os mastocitomas grau I foi de 1,5; para os grau II foi de 1,85 e para os grau III foi de 3,25. Esta avaliação é realizada histologicamente e as NORs são contadas manualmente, apresentando-se como pontos pretos ou marrom-escuros intranucleares (BOSTOCK et al., 1989). Quanto maior o número de NORs intranucleares em uma célula, pior é o prognóstico. Cães com índice AgNOR igual ou superior a quatro tiveram uma sobrevida menor (119 dias), quando comparados com os cães com AgNOR inferior a quatro (350 dias) (BOSTOCK et al., 1989).

2.2.4.3 Imuno-histoquímica

Em decorrência da dificuldade na previsão do comportamento biológico dos mastocitomas, a busca por um prognóstico mais coeso é essencial. Atualmente a preocupação dos proprietários com seus cães aumentou, pressionando os clínicos veterinários a buscarem diagnóstico e terapias cada vez mais precisas (SCASE et al., 2006; SOUZA et al., 2006).

Empregando a técnica de imuno-histoquímica, principalmente utilizando os anticorpos KIT e Ki67, é possível identificar aqueles tumores que têm maior chance de serem biologicamente mais agressivos (SLEDGE et al., 2016; STREFEZZI et al., 2010; WEBSTER et al., 2007). O anticorpo KIT (CD117) detecta o receptor de membrana da tirosina quinase e o Ki67 detecta células que estão no ciclo celular, exceto na fase G₀ (KIUPEL et al., 2004; SLEDGE et al., 2016; WEBSTER et al., 2006).

Para o KIT há três padrões de imunomarcção bem estabelecidos: padrão I – marcação associada à membrana; padrão II – marcação citoplasmática focal ou pontilhada; e padrão III – marcação citoplasmática difusa (KIUPEL et al., 2004). A avaliação desta proteína é importante, pois foi comprovado que cães com padrões II e III apresentam menor sobrevida e um risco maior de metástases e recidivas locais (KIUPEL et al., 2004; SLEDGE et al., 2016). É importante destacar que as alterações no padrão de imunomarcção do KIT podem ocorrer em qualquer grau histológico, sendo avaliações independentes (FONSECA-ALVES et al., 2015; WEBSTER et al., 2006). Porém, foi demonstrado que a imunomarcção citoplasmática foi expressa predominantemente nos mastocitomas graus II e III (KIUPEL et al., 2004).

Webster et al. (2006) sugerem que mutações no Exon 11 desempenhem um papel importante na localização citoplasmática do KIT, entretanto nem todos os mastocitomas com expressão citoplasmática de KIT vão apresentar mutações no gene *c-KIT*. Isto pode ser observado em um estudo com mastocitomas da região central do Rio Grande do Sul onde foram observadas mutações no Exon 11 em somente dois casos (de quatro casos) que apresentaram expressão citoplasmática de KIT (FLORES et al., 2016).

O anticorpo Ki67 é utilizado para detectar células que estão em proliferação celular, não fornecendo informações sobre a taxa em que as células progridem no ciclo celular (SLEDGE et al., 2016). A contagem dos mastócitos positivos é realizada de forma manual e a imunomarcção apresentada pelas células positivas é intranuclear (WEBSTER et al., 2007). Não há um valor de corte bem estabelecido; há trabalhos que utilizam ponto de corte 1,8 (LELYVELD et al., 2015; MAGLENNON et al., 2008; SCASE et al., 2006) e outros, ponto de corte 23 (SLEDGE et al., 2016; WEBSTER et al., 2007) para os MCCs. Contudo, independentemente do ponto de corte, cães com um Ki67 elevado apresentaram menor sobrevida em relações aos cães com Ki67 baixo (STREFEZZI et al., 2010; WEBSTER et al., 2007). Quanto ao grau histológico, tanto mastocitomas graus I, II ou III podem apresentar valores de Ki67 altos ou baixos (LELYVELD et al., 2015; SCASE et al., 2006; WEBSTER et al., 2007). Estudos apontam uma sobrevida de 1 ano (74-85%), 2 anos (65-84%) e 3 anos (56-81%) para cães com Ki67 maior que 1,8 (LELYVELD et al., 2015; MAGLENNON et al., 2008). Para cães com Ki67 menor que 1,8 a sobrevida é de 1 ano (94%), 2 anos (94%) e 3 anos (92%) (LELYVELD et al., 2015).

Apesar da disponibilidade destas ferramentas prognósticas na rotina de muitos laboratórios veterinários, sabe-se que a imunomarcção para o Ki67 sofre interferência pela fixação prolongada em formol (RAMOS-VARA & MILLER, 2014; SAKAI, 2002). Um

estudo avaliando a proliferação celular em amígdalas humanas observou que a imunomarcção para o Ki67 foi enfraquecendo após 24 e 48 horas de fixação (MUNAKATA & HENDRICKS, 1993). Outros autores apontaram valores de 43% (FONSECA-ALVES et al., 2015) e 23% (KANDEFER-GOLA et al., 2015) de falha na imunomarcção para Ki67 em MCCs.

Uma das principais causas relacionadas com o grande número de falhas na imunomarcção para o Ki67 é devido a uma profunda alteração na conformação de macromoléculas (principalmente através de reações cruzadas entre proteínas) decorrentes da fixação prolongada (RAMOS-VARA & MILLER, 2014). Essa alteração pode tornar o reconhecimento de proteínas (antígenos) pelos anticorpos difícil ou até impossível através da técnica de IHQ. É importante salientar que a fixação dos tecidos em formol é uma etapa fundamental para o processamento histológico e realização da técnica de IHQ (RAMOS-VARA & MILLER, 2014). Todavia, os efeitos deletérios da fixação em formol na imunorreatividade celular e tecidual podem ser parcialmente (ou totalmente, em alguns casos) revertidos através de métodos de recuperação antigênica, aplicados durante a realização da técnica de IHQ (RAMOS-VARA & MILLER, 2014).

Galiza et al. (2014) observaram algumas vantagens na utilização de diferentes amplificadores durante a técnica de imuno-histoquímica para fungos. Nas amostras de aspergilose o sistema biotinilado apresentou alta especificidade e sensibilidade. Já para as zigomicoses, o método não biotinilado apresentou alta especificidade e sensibilidade.

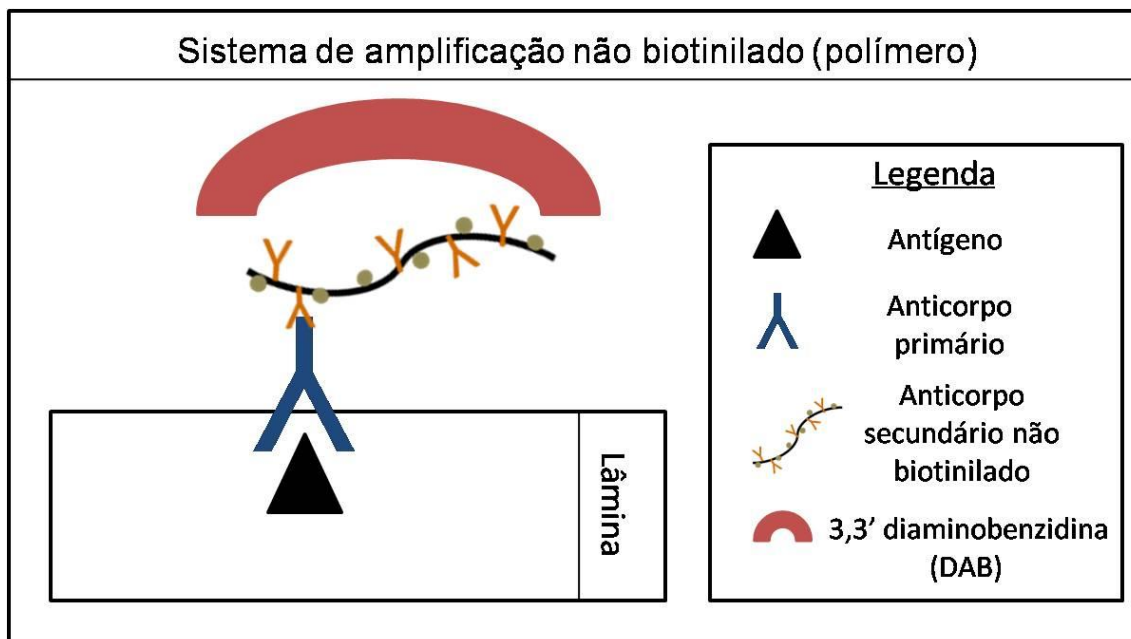
Muitos sistemas de amplificação estão disponíveis comercialmente para serem utilizados em técnicas de imuno-histoquímica, alguns apresentando melhor imunopositividade para determinados antígenos. Estes amplificadores são divididos em dois grandes grupos: os não biotinilados e os biotinilados (RAMOS-VARA & MILLER, 2014).

Os sistemas não biotinilados, chamados também de polímeros, apresentam um sistema de amplificação compacto, que carrega moléculas de enzimas (peroxidase ou fosfatase alcalina), juntamente com moléculas do anticorpo secundário (RAMOS-VARA & MILLER, 2014). Sua estrutura grande, em cadeia de dextrano, favorece a possibilidade de muitos anticorpos secundários e peroxidases conjugarem-se a sua estrutura. Quanto maior o número de peroxidases, maior a reação com o cromógeno (3,3' diaminobenzidina [DAB]), apresentando uma intensa imunomarcção (FERRO, 2013). As principais vantagens deste amplificador são: ser um método mais simples, apresentar a mesma

sensibilidade ou até sensibilidade mais alta, e menor reação de fundo (*background*) (Ramos-Vara & Miller, 2014).

A técnica de imuno-histoquímica utilizando o polímero é baseada em duas reações imunológicas e uma reação química. A primeira reação imunológica ocorre entre o antígeno (amostra) com o anticorpo primário, e a segunda ocorre entre o anticorpo primário e o anticorpo secundário. Já a reação química acontece quando as peroxidases (presentes na estrutura do anticorpo secundário) reagem com o cromógeno (3,3' diaminobenzidina [DAB]). A ligação entre estas moléculas é fundamental, pois através dessa reação é possível observar a imunomarcagem/ligação entre o antígeno e o anticorpo na avaliação microscópica (DABBS, 2006). O esquema do sistema não biotinizado é demonstrado na Figura 2.

Figura2. Imuno-histoquímica utilizando o sistema não biotinizado.

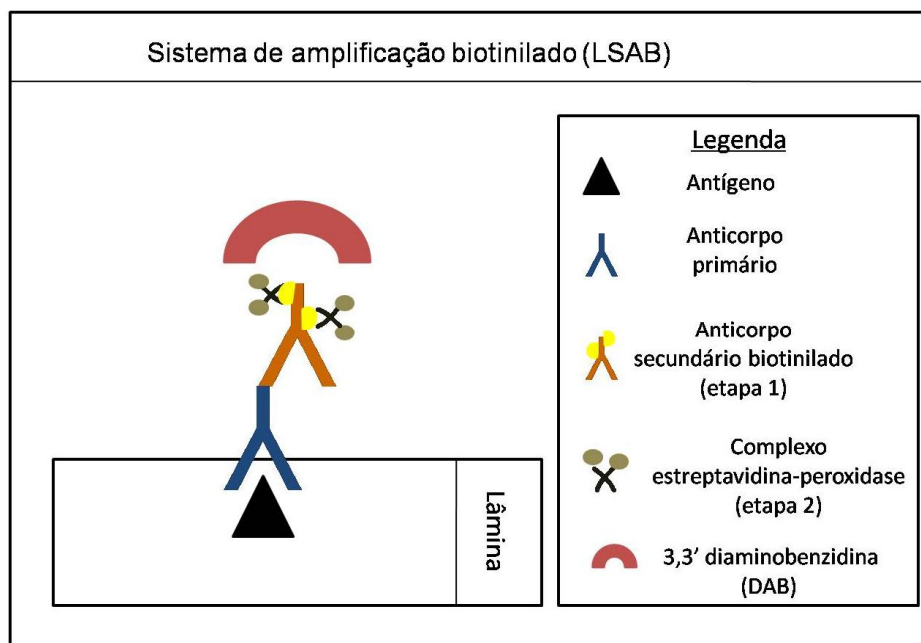


Dentre os sistemas de amplificação biotinizados, há um conhecido como *Labelled Streptavidin-biotin* (LSAB), apresentando-se como um método de detecção em duas etapas. O LSAB utiliza a afinidade entre a biotina e a estreptavidina, para formar uma ligação quase irreversível e possibilitar a realização da imuno-histoquímica (RAMOS-VARA & MILLER, 2014). Neste método o anticorpo secundário carrega moléculas de biotina (anticorpo secundário biotinizado [etapa 1]), seguido do complexo estreptavidina-peroxidase (etapa 2). A desvantagem deste método está na possibilidade de as amostras apresentarem grande reação de fundo (*background*). Essa reação ocorre pela ligação da

estreptavidina a moléculas de biotina endógenas presentes normalmente em alguns órgãos (DABBS, 2006; FERRO, 2013).

A técnica de imuno-histoquímica utilizando o método LSAB é baseada em duas reações imunológicas e duas reações químicas. A primeira reação imunológica ocorre entre o antígeno (amostra) com o anticorpo primário, e a segunda ocorre entre o anticorpo primário e o anticorpo secundário biotilado (etapa 1). Quanto às reações químicas, a primeira acontece quando a biotina (presente na estrutura do anticorpo secundário) se liga a estreptavidina (presente no complexo estreptavidina-peroxidase) (etapa 2). Já a segunda reação química ocorre quando as peroxidases (presentes no complexo estreptavidina-peroxidase) reagem com o cromógeno (3,3' diaminobenzidina [DAB]). A ligação entre estas moléculas possibilita a interpretação da imunomarcagem entre o antígeno e o anticorpo na avaliação microscópica (DABBS, 2006). O esquema do sistema biotilado é demonstrado na Figura 3.

Figura3. Imuno-histoquímica utilizando o sistema biotilado.



2.2.4.4 Reação em cadeia de polimerase

A PCR é uma técnica molecular que apresenta grande relevância prognóstica em cães com MCCs, evidenciando mutações no gene *c-KIT* que estão associadas com o desenvolvimento deste tumor (KIUPEL, 2017; WEBSTER et al., 2007). Cães com mutações apresentam duas bandas no gel de agarose, a banda baixa corresponde ao c-

KIT normal e a banda superior corresponde ao *c-KIT* com a duplicação (ZEMKE et al., 2002). As mutações no exon 11 do gene *c-KIT* são as mais comuns, correspondendo a 20-30% dos casos (WEBSTER et al., 2007) e, representando menos de 5% dos casos, estão as mutações nos exons 8 e 9 (LETARDS et al., 2008).

Webster et al. (2007) e Zemke et al. (2002) relatam 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. Em contrapartida, cães com mutação no gene *c-KIT* responderam melhor ao tratamento com inibidores da tirosina quinase (LONDON et al., 2009; WEBSTER et al., 2007).

3 ARTIGO –

Utilização de diferentes tempos de fixação e aplicação de dois sistemas de amplificação imunohistoquímicos na detecção das proteínas KIT e Ki67 em mastocitomas cutâneos caninos¹

Alex dos Santos², Harlan H. L. Nascimento², Mariana M. Flores³ & Glauca D. Kommers^{3*}

ABSTRACT.- Santos A., Nascimento H.H.L., Flores M.M., & Kommers G.D. 2018. **Use of different fixation times and application of two immunohistochemical methods for the detection of KIT and Ki67 proteins in canine cutaneous mast cell tumors.** Utilização de diferentes tempos de fixação e métodos imunohistoquímicos na detecção das proteínas KIT e Ki67 em mastocitomas cutâneos caninos. Pesquisa Veterinária Brasileira 00(0):00-00. Laboratório de Patologia Veterinária, Departamento de Patologia, Universidade Federal de Santa Maria, Camobi, Santa Maria, RS, 97105-900, Brazil. E-mail:glaukommers@yahoo.com

Due to the high prevalence of mast cell tumors (MCCs) in the diagnostic routine, several factors, especially prognostic factors, have been sought to determine the biological behavior of these neoplasms. Immunohistochemistry is one of the main tools utilized to differentiate biologically more aggressive tumors from less aggressive tumors. However, some immunomarkers are influenced by formalin fixation, interfering with the results. This study comprised a retrospective and a prospective study of MCCs diagnosed in the laboratory routine. A total of 25 samples, without knowledge of the fixation time, were analyzed in the retrospective study, and 12 samples, with known fixation times, in the prospective study. Two histological grading systems (Patnaik and Kiupel), the special staining of toluidine blue and the immunohistochemistry for the KIT and Ki67 proteins were applied in the two studies. Additionally, in the prospective study, two amplification systems (biotinylated and non-biotinylated) for the Ki67 protein and the AgNOR technique (counting of the argiophilic nucleolar organizing regions) were tested. In the retrospective study, a greater agreement was observed among the evaluating pathologists when the Kiupel system was used. The immunostaining to KIT remained effective in both studies, regardless of the fixation time. The immunostaining for Ki67 was highly sensitive to formaldehyde, and failure to stain was observed in 56% of the cases of the retrospective study. In the prospective study, it was found that samples fixed for more than 24h showed a reduction in the number of stained cells (altering the determination of the cell growth fraction) or showed absence of staining in both amplification systems. The use of the AgNOR method, to evaluate the rate of cell proliferation, may be an alternative when the fixation time of the neoplasm is unknown or greater than 24h.

INDEX TERMS: Mast cell tumor, histological grading, biological behavior, immunohistochemistry, Ki67, KIT, diseases of dogs.

RESUMO.- Devido a alta prevalência dos mastocitomas cutâneos caninos (MCCs) na rotina diagnóstica, vários fatores, especialmente fatores prognósticos, têm sido buscados para auxiliar na determinação do comportamento biológico desse neoplasma. A imuno-histoquímica é uma das principais ferramentas empregadas para diferenciar tumores biologicamente mais agressivos de tumores menos agressivos. Entretanto, alguns imunomarcadores sofrem influência pela fixação em formol, interferindo nos resultados. Este estudo compreendeu avaliar através de uma etapa retrospectiva e uma etapa prospectiva casos de MCCs diagnosticados na rotina laboratorial. Um total de 25 amostras, sem conhecimento do tempo de fixação, foi analisado no estudo retrospectivo e 12 amostras, com tempos de fixação conhecidos, no estudo prospectivo. Foram aplicados nos dois estudos, dois sistemas de gradação histológica (Patnaik e Kiupel), a coloração especial de azul de toluidina e a imuno-histoquímica para as proteínas KIT e Ki67. Adicionalmente, no estudo prospectivo, foram testados dois sistemas de amplificação (biotinilado e não biotinilado) para a proteína Ki67 e a técnica de AgNOR (contagem das regiões organizadoras nucleolares argiofilicas). Na etapa retrospectiva, observou-se uma maior concordância entre os patologistas avaliadores quando o sistema Kiupel foi utilizado. A imunomarcagem para KIT se manteve eficaz em ambos os estudos, independentemente do tempo de fixação. A imunomarcagem para o Ki67

¹Recebido em.....

Aceito para publicação em.....

Parte da Dissertação de Mestrado do primeiro autor.

² Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, área de concentração em Patologia e Patologia Clínica Veterinária, Centro de Ciência Rurais (CCR), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Av. Roraima 1000, Camobi, Santa Maria, RS 97105-900, Brasil.

³Laboratório de Patologia Veterinária, Departamento de Patologia, Centro de Ciências da Saúde, UFSM, Santa Maria, RS. *Autor para correspondência: glaukommers@yahoo.com

mostrou-se altamente sensível ao tempo de fixação em formol, sendo observada falha na imunomarcagem em 56% dos casos do estudo retrospectivo. No estudo prospectivo, constatou-se que amostras fixadas por mais que 24h em formol apresentaram redução na quantidade de células imunomarcadas (alterando a determinação da fração de crescimento celular) ou apresentaram ausência de imunomarcagem em ambos os sistemas de amplificação. A utilização do método AgNOR, para avaliar a taxa de proliferação celular, pode ser uma alternativa quando o tempo de fixação do neoplasma for desconhecido ou superior a 24h.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Mastocitoma, graduação histológica, comportamento biológico, imuno-histoquímica, Ki-67, KIT, cão.

INTRODUÇÃO

O mastocitoma cutâneo canino (MCC) é o mais prevalente dentre todos os neoplasmas malignos que acometem a pele de cães (Patnaik et al. 1984, Goldschmidt & Hendrick 2002, Kiupel 2017, Romansik et al. 2007). Embora haja diferenças quanto à epidemiologia, é importante ressaltar que independente da idade, raça e local, o comportamento biológico do MCC é altamente variável (Webster et al. 2007; Gross et al. 2009).

A graduação histológica é uma das ferramentas utilizadas há décadas na tentativa de prever o comportamento biológico dos MCCs (Bostock 1973, Patnaik et al. 1984, Kiupel et al. 2011). Patnaik et al. (1984) sugeriram a forma de graduação, mais utilizada e aplicada nos laboratórios de patologia veterinária até recentemente. Neste sistema, os mastocitomas são divididos em três graus: I (bem diferenciados), II (intermediários) e III (pouco diferenciados). Embora muito utilizado, este método é considerado por muitos (Northrup et al. 2005a, Northrup et al. 2005b) como de difícil aplicação, principalmente por incluir um grande número de critérios histológicos subjetivos.

Em decorrência das críticas ao sistema de Patnaik (SP), em 2011, um novo método de graduação foi proposto (Kiupel et al. 2011). Este método é considerado de mais fácil aplicação devido: (1) ao uso de menor número de critérios histológicos; (2) à menor subjetividade dos critérios utilizados; e (3) à divisão dos tumores em apenas dois grupos, alto e baixo grau. Apesar das vantagens deste método, técnicas auxiliares devem ser utilizadas juntamente com a graduação histológica na tentativa de prever o comportamento biológico dos MCCs (Kiupel et al. 2011).

Paralelamente, a técnica de imuno-histoquímica (IHQ) e a reação em cadeia de polimerase (PCR) estão sendo utilizadas como auxiliares na determinação do prognóstico dos MCCs (Kiupel et al. 2004, Webster et al. 2006, Webster et al. 2007, Kandefér-Gola et al. 2015). Empregando a IHQ, principalmente com anticorpos que detectam a proteína KIT (receptor de membrana da tirosina quinase) e Ki67 (marcador de proliferação celular), é possível identificar aqueles tumores que têm maior chance de serem biologicamente mais agressivos (Webster et al. 2007, Strefezzi et al. 2010, Sledge et al. 2016, Flores et al. 2016). A PCR está sendo utilizada na busca de mutações no gene *c-kit*, as quais têm valor prognóstico e também influenciam na abordagem terapêutica de cada paciente (Webster et al. 2006, Kiupel 2017). Além da graduação histológica, aplicando-se a IHQ bem como a PCR, é possível obter uma avaliação mais fidedigna do comportamento biológico dos MCCs, o que impacta diretamente na escolha da terapia (Kiupel et al. 2004, Webster et al. 2006, Sledge et al. 2016, Kiupel 2017).

Apesar da existência e da relevância das ferramentas prognósticas complementares discutidas anteriormente, a influência do tempo de fixação dos tecidos no formol é uma preocupação importante e pode vir a dificultar a avaliação prognóstica dos MCCs em uma rotina diagnóstica. O fixador de tecidos mais utilizado mundialmente para histopatologia é o formol neutro a 10%. Este fixador preserva a arquitetura do tecido, principalmente os peptídeos e as organelas celulares, evitando sua degradação. Em contrapartida, a fixação prolongada ocasiona alterações na conformação de macromoléculas, as quais podem tornar o reconhecimento de proteínas (antígenos) difícil ou até impossível. A recuperação antigênica (enzimática ou pelo calor), um método aplicado durante a técnica de IHQ, pode reverter parcialmente ou totalmente os efeitos deletérios da fixação prolongada (Ramos-Vara & Miller 2014). Adicionalmente, a utilização de diferentes sistemas de amplificação durante a realização da IHQ pode apontar para um método de imunomarcagem otimizado para determinados antígenos (Galiza et al. 2014).

Sendo assim, este trabalho teve como principais objetivos: (1) avaliar a eficácia da imunomarcagem para KIT e Ki67 em MCCs classificados pelos sistemas de Patnaik e Kiupel e relacioná-la com o tempo de fixação no formol; (2) testar dois protocolos diferentes de IHQ (com variações no sistema de amplificação) na tentativa de determinar possíveis diferenças para cada um dos dois anticorpos utilizados. A finalidade deste estudo é gerar conhecimento acerca de aspectos técnicos da IHQ para KIT e Ki67, fornecendo subsídios para a aplicação desta técnica na rotina de diagnóstico, particularmente em laboratórios brasileiros que apresentem dificuldades com relação à variação dos tempos de fixação das amostras de MCCs recebidos.

MATERIAL E MÉTODOS

Estudo retrospectivo

Graduação histológica e avaliação histoquímica

Foram selecionados 25 casos de mastocitomas cutâneos caninos (MCCs), diagnosticados no LPV-UFSM entre janeiro de 2011 e janeiro de 2016. O critério de inclusão, além do diagnóstico, foi a disponibilidade de blocos de parafina de cada caso selecionado. Foram confeccionadas duas lâminas de cada caso (com seção histológica de 3µm de espessura): uma lâmina foi corada pela técnica de hematoxilina e eosina (HE), e a outra, pelo método do azul de toluidina (AT), para detecção de grânulos metacromáticos no citoplasma. A mensuração dos grânulos citoplasmáticos foi dividida em acentuada, moderada e discreta. Posteriormente, as lâminas de HE foram submetidas aos métodos de graduação histológica de Patnaik (graus I, II e III; Patnaik et al. 1984) e de Kiupel (alto e baixo grau; Kiupel et al. 2011) por três patologistas (AS, MMF e GDK), independentemente. Os avaliadores receberam uma tabela com todos os critérios histológicos a serem avaliados para cada sistema, conforme a respectiva literatura, visando reduzir a subjetividade na avaliação. Posteriormente, os casos com divergências foram discutidos e foi compilada uma tabela de consenso, com uma única graduação de cada método (SP e SK) para cada neoplasma.

Imuno-histoquímica (IHQ)

A técnica de IHQ foi realizada nos 25 MCCs utilizando-se o anticorpo primário policlonal (produzido em coelho) anti-KIT humano (CD117, Dako Cytomation, A4502) e o anticorpo monoclonal (produzido em camundongo) anti-Ki67 humano (clone MIB-1; Dako Cytomation, M7240). Os métodos utilizados para o KIT e para o Ki67 foram adaptados de Kiupel et al. (2004) e de Webster et al. (2007), respectivamente. As seções de tecidos foram submetidas aos protocolos de IHQ descritos no Quadro 1. Em todos os protocolos, a peroxidase endógena foi bloqueada com peróxido de hidrogênio (água oxigenada a 3 %) por 2x de 10 min e o bloqueio das reações inespecíficas foi realizado com bloqueador de proteína (EP-12-20532, EasyPath) em temperatura ambiente (25°C) por 10 min. Após lavagem rápida em água destilada, o sistema de amplificação não biotilado em uma etapa (polímero, EasyLinkOne-HRP, EP-12-20502, EasyPath) foi incubado em temperatura ambiente por 20 min. A contra-coloração foi realizada com hematoxilina de Harris. Como controles positivos, foram utilizados casos de mastocitomas submetidos anteriormente a IHQ para KIT por Flores et al. (2016). Como controle negativo de cada caso utilizou-se uma seção do tecido analisado incubado apenas com o diluente de anticorpo (PBST).

A classificação para o KIT foi feita de acordo com Kiupel et al. (2004), segundo a localização da imunomarcagem nos mastócitos tumorais, sendo os tumores divididos em três padrões: padrão I, marcação associada à membrana, com pouca ou nenhuma marcação citoplasmática; padrão II, intensa marcação citoplasmática com distribuição focal ou pontilhada; e padrão III, marcação citoplasmática difusa. Para este imunomarcador, foram analisadas também a intensidade, a quantidade e a distribuição das células imunomarcadas. Para a proteína Ki67, a interpretação foi de acordo com Webster et al. (2007), ou seja, após a identificação da área com o maior número de células neoplásicas imunomarcadas (pontilhado preto nuclear), o número de células positivas presentes foi contado em cinco campos distintos de grande aumento (CGA; 40x), por dois avaliadores, e posteriormente foi calculada a média. Este número (média) foi denominado de fração de crescimento (*growth fraction*), sendo os mastocitomas divididos em dois grupos: com fração de crescimento baixa (FCB; <23) e com fração de crescimento alta (FCA; ≥23).

Estudo prospectivo

Graduação histológica e avaliação histoquímica

Foram selecionados 12 casos de MCCs, diagnosticados no LPV-UFSM, entre agosto de 2016 e maio de 2017. As 12 amostras de cada um dos neoplasmas foram fixadas (em formol neutro a 10%) separadamente nos seguintes tempos de fixação: 24, 48, 72 e 96 horas. Todas foram processadas rotineiramente para histopatologia e emblocadas em parafina. Somente as amostras com fixação de 24h foram cortadas a 3µm e tiveram lâminas coradas pelas técnicas de HE, AT e AgNOR (contagem das regiões organizadoras nucleolares argirofílicas). Posteriormente foi aplicada a graduação histológica de acordo com o SP e o SK (conforme descrito no estudo retrospectivo).

Para o AgNOR, os cortes histológicos de 3 µm foram desparafinizados e hidratados em água deionizada. Em sequência foram corados em uma solução contendo mistura de gelatina 2% e ácido fórmico a 1% em água deionizada e solução de nitrato de prata a 50% na proporção de 1:2, respectivamente. As lâminas ficaram imersas nessa solução durante 30 min em temperatura ambiente. Após, foram lavadas em água deionizada por 1 min, desidratadas, clarificadas e montadas com meio de montagem sintético (Entellan new, Merck) (Bostock et al. 1989). As AgNORs foram contadas manualmente, segundo Bostock et al. (1989), para definir a frequência de AgNOR, foram contados os pontos pretos no interior dos núcleos em 100 mastócitos tumorais, em campos aleatórios e representativos de maior aumento (100x). A frequência foi obtida dividindo-se o número de AgNOR por 100.

Imuno-histoquímica

Foram utilizados dois sistemas de amplificação, um sistema não biotilado (polímero; EasyLinkOne-HRP) e um biotilado (LSAB+System-HRP [Dako]). Os 12 casos foram testados com os mesmos anticorpos utilizados no estudo retrospectivo (KIT e Ki67), conforme o Quadro 1, nos tempos de fixação de 24, 48, 72 e 96 horas. Para o

sistema biotilado, após a incubação com o anticorpo primário, o anticorpo secundário biotilado (etapa 1) foi incubado em temperatura ambiente por 30 min. Após lavagem em PBST (2x de 5min), a etapa 2 constituiu-se da incubação em temperatura ambiente por 30 min com o complexo estreptavidina-peroxidase. A interpretação da imunomarcção para os anticorpos primários seguiu os mesmos critérios descritos para o estudo retrospectivo.

RESULTADOS

Estudo retrospectivo

Gradação histológica e avaliação histoquímica

O percentual de concordância entre os três avaliadores, quando utilizado o SP foi de 88% (22/25) e no SK foi de 96% (24/25). O aspecto que ainda causou divergência no SK foi a contagem de mitoses em um caso. Aplicando a gradação (de consenso) segundo o SP, 96% (24/25) foram de grau II e 4% (1/25) foi de grau III.

Aplicando a gradação segundo o SK, 84% (21/25) foram de baixo grau (Fig.1) e 16% (4/25) foram de alto grau (Fig.2). Dos 24/25 graduados como grau II pelo SP, quando aplicada a gradação pelo SK, 21/24 foram de baixo grau e 3/24 foram de alto grau. O único caso de grau III (SP) foi classificado como de alto grau (SK).

Na técnica de azul de toluidina (AT), os mastocitomas coraram os grânulos citoplasmáticos metacromaticamente (em púrpura) em quantidade acentuada em 52% (13/25), em quantidade moderada em 24% (6/25), em quantidade leve em 20% (5/25) e em 4% (1/25), os grânulos não coraram (esse apresentou grau III pelo SP e alto grau pelo SK).

Imuno-histoquímica

Foi observada imunomarcção positiva em todos os mastocitomas testados para KIT e imunomarcção positiva em 11/25 (44%) dos casos testados para Ki67.

Para o KIT, 64% (16/25) dos MCCs apresentaram imunomarcção padrão II (citoplasmática; Fig.3) e 36% (9/25) apresentaram padrão I (membrana; Fig.4). Quanto à intensidade, houve imunomarcção acentuada em 56% (14/25) dos casos, moderada em 28% (7/25) e leve em 16% (4/25). Quanto à quantidade e à distribuição das células imunomarcadas, em 52% (13/25) havia grande quantidade de células imunomarcadas distribuídas uniformemente na seção analisada e em 48% (12/25) havia poucas células imunomarcadas e distribuídas aleatoriamente. Dos 16 MCCs que apresentaram imunomarcção padrão II, 15 foram de grau II e um foi de grau III pelo SP; 14 foram de baixo grau e dois foram de alto grau pelo SK. Dos nove MCCs que apresentaram imunomarcção padrão I, todos eram de grau II pelo SP. No SK, sete deles foram de baixo grau e dois de alto grau.

Dos mastocitomas que imunomarcaram para o Ki67 (11/25; 44%), todos apresentaram fração de crescimento baixa (FCB). Em 14/25 (56%) não houve imunomarcção.

Estudo prospectivo

Gradação histológica e avaliação histoquímica

De acordo com o SP, 11/12 (92%) foram de grau II e 1/12 (8%) foi de grau III. De acordo com o SK, 8/12 (67%) foram de baixo grau e 4/12 (33%) foram de alto grau. Na técnica de AT, 6/12 MCCs tiveram quantidade acentuada de grânulos, 4/12 tiveram quantidade moderada e 2/12 tiveram quantidade leve. Na técnica de AgNOR, a contagem variou de 1,22 a 1,97 (com média de 1,44) para os mastocitomas grau II e o valor de 2,89 para o mastocitoma grau III.

Imuno-histoquímica

Foi observada imunomarcção positiva em todos os mastocitomas e em todos os tempos de fixação testados para a proteína KIT. Na avaliação microscópica, 59% (sete) apresentaram imunomarcção padrão II (citoplasmática) e 41% (cinco) apresentaram padrão I (membrana). Dos sete MCCs que apresentaram imunomarcção padrão II, seis foram de grau II e um foi de grau III pelo SP; quatro foram de alto grau e três foram de baixo grau pelo SK. Dos cinco MCCs que apresentaram imunomarcção padrão I, todos eram de grau II pelo SP e de baixo grau no SK. Não foi observada diferença quanto à intensidade das células imunomarcadas comparando os dois sistemas de amplificação (biotilado e não biotilado). Quanto à quantidade e à distribuição das células imunomarcadas, em 75% (nove) havia grande quantidade de células imunomarcadas distribuídas uniformemente na seção analisada e em 25% (três) havia poucas células imunomarcadas e distribuídas aleatoriamente.

Os resultados da fração de crescimento baseados na detecção da proteína Ki67, com os quatro tempos de fixação e comparando os dois sistemas de amplificação são apresentados no Quadro 2. Já os valores absolutos para o Ki67, nos quatro tempos de fixação e comparando os dois sistemas de amplificação são apresentados na Fig.5. Para a proteína Ki67, em quatro mastocitomas fixados por 24h no sistema não biotilado e em três casos no sistema biotilado observou-se fração de crescimento alta (Fig.6 e 7). Em oito casos do sistema não biotilado e em nove casos no sistema biotilado observou-se fração de crescimento baixa (Fig.8 e 9).

No sistema não biotilado, 7/12 dos mastocitomas mantiveram a fração de crescimento nos quatro tempos de fixação testados. Em 3/12 houve alteração na detecção da fração de crescimento, a qual passou de alta para

baixa após 24h de fixação. Não houve imunomarcção em 2/12 mastocitomas após 48h de fixação e em 1/12 após 72h de fixação.

No sistema biotínido, 5/12 dos mastocitomas mantiveram a fração de crescimento nos quatro tempos de fixação. Em 2/12 houve alteração na detecção da fração de crescimento, a qual passou de alta para baixa após 24h de fixação e em 1/12 após 72h de fixação. Não houve imunomarcção em 1/12 mastocitomas após 48h de fixação e em 3/12 após 72h de fixação.

DISCUSSÃO

Quanto à graduação histológica dos 25 MCCs analisados no estudo retrospectivo, houve uma maior concordância entre os observadores quando utilizado o sistema de Kiupel (SK) (96%) do que no sistema de Patnaik (SP) (88%). Estes resultados vão ao encontro do estudo no qual o SK foi proposto, em que a concordância entre os patologistas no SP foi de 75% para os de grau III e cerca de 60% para os de grau I e II. No SK, independentemente do grau atribuído, a concordância foi superior a 96% (Kiupel et al. 2011). A redução nas variações entre avaliadores no SK tem sido atribuída à classificação em apenas dois graus por ser baseada em critérios histológicos mais objetivos e simplificados (Kiupel et al. 2011). A importância de se estabelecer um alto grau para MCCs reside no fato de que estes tumores foram associados com maior rapidez para metastatizar ou recidivar e com menor sobrevida (Kiupel et al. 2011).

Embora haja diferenças quanto à epidemiologia, é importante ressaltar que independente da idade, raça e local, o comportamento biológico dos MCCs é altamente variável (Kiupel, 2017). Uma ferramenta utilizada para auxiliar na avaliação da proliferação celular é o AgNOR. Este método histoquímico avalia de forma quantitativa a velocidade em que as células tumorais estão proliferando (taxa de crescimento) (Derenzini 2000). Os valores de AgNOR observados neste estudo vão ao encontro com os citados na literatura, onde a média de AgNORs para os MCCs grau II variou de 1,28 à 3,96 (Bostock et al. 1989, Rech et al. 2004). Quanto maior o número de AgNORs observados no núcleo das células neoplásicas maior é a atividade proliferativa do tumor (Derenzini 2000). Bostock et al. (1989) observaram que o tempo de sobrevida para cães com AgNOR inferior a quatro é quase 3x maior que cães com AgNOR superior a quatro. Osaki et al. (2007) além de avaliar marcadores de proliferação celular (Ki67, PCNA e AgNOR), avaliou também a ressecção cirúrgica, densidade de vasos intratumorais, morfometria nuclear, profundidade tumoral e localização.

Atualmente, dois imunomarcadores têm sido utilizados para complementar a graduação histológica na determinação do comportamento biológico dos MCCs, sendo eles o KIT (receptor de membrana da tirosina quinase) (Kiupel et al. 2004, Kiupel 2017) e o Ki67 (marcador de proliferação celular) (Webster et al. 2007). Sledge et al. (2016) criaram um fluxograma sobre a evolução prognóstica dos MCCs baseado na avaliação de alguns critérios, margem cirúrgica, graduação histológica, estadiamento clínico e, dependendo dos resultados, aplicando a IHQ (KIT e Ki67) e a PCR (mutações no exon 11), para a determinação da terapia a ser utilizada em cada caso. Neste trabalho, buscou-se a padronização e a otimização da técnica de IHQ para KIT e Ki67 em amostras recebidas para diagnóstico de rotina, sem determinação do tempo de fixação em formol (estudo retrospectivo), por ser essa a realidade laboratorial com a qual se trabalha. Posteriormente trabalhou-se com tempos de fixação conhecido (estudo prospectivo).

A imunomarcção para a proteína KIT não se mostrou sensível a uma fixação prolongada no formol, sendo observada imunoreatividade em todos os casos, tanto no estudo retrospectivo como no prospectivo. Contudo, houve alteração quanto à intensidade, quantidade e distribuição das células imunomarcadas, as quais foram heterogêneas, mas não impediram a identificação das células neoplásicas como mastócitos, nem a determinação do padrão de imunomarcção. Um fator considerado importante para o desenvolvimento de imunomarcção heterogênea para um determinado antígeno é que à penetração do formol não é homogênea em relação à fixação do tecido, ocorrendo de forma centrípeta (Ramos-Vara & Miller 2014).

Analisando em conjunto o estudo retrospectivo e prospectivo, houve imunomarcção padrão II (citoplasmática) em 62% dos MCCs e o padrão I (membrana) em 38%. O padrão III não foi observado neste estudo. A grande maioria dos MCCs graduados em baixo grau apresentou imunomarcção padrão II, resultados estes semelhantes os descritos na literatura (Webster et al. 2007, Fonseca-Alves et al. 2015, Flores et al. 2016, Sledge et al. 2016). Essa informação é importante, pois foi observado que MCCs que perdem a expressão de membrana e adquirem expressão citoplasmática para KIT apresentam um comportamento biológico mais agressivo (Kiupel et al. 2004). Do mesmo modo, Webster et al. (2006), descobriram que havia correlação positiva entre a perda da marcação de membrana com a presença de mutações no exon 11, sugerindo que as mutações podem desempenhar um papel na localização do KIT. As mutações no domínio justamembrana do gene *KIT* são conhecidas por ocorrerem em neoplasmas biologicamente mais agressivos, mas as alterações na localização da imunomarcção com KIT ocorrem em todos os graus (Kiupel et al. 2004, Webster et al. 2006). Quanto à imunomarcção padrão I, ela foi observada em sua maioria em casos classificados como de baixo grau pelo SK, porém, vista em dois casos de alto grau.

A falha na imunomarcção para o Ki67, observada em 56% dos MCCs do estudo retrospectivo, possivelmente foi influenciada pelo tempo prolongado de fixação em formol de algumas amostras. Ramos-Vara & Miller (2014) relatam efeitos cumulativos da fixação em formol e de fatores relacionados ao processamento dos tecidos

(exposição ao álcool e xilol) com falhas no reconhecimento do antígeno Ki67. Isso motivou a realização do estudo prospectivo, que procurou avaliar se o tempo de fixação poderia estar influenciando nos resultados do estudo retrospectivo. Flores et al. (2016), utilizando outras amostras do mesmo laboratório (LPV-UFSM) observaram imunomarcção positiva para Ki67 em aproximadamente 70% das amostras estudadas. A diferença no percentual de imunomarcção entre este estudo e o de Flores et al. (2016), mesmo que com amostras distintas, pode estar relacionada aos sistemas de amplificação (utilizando um polímero específico para tecidos de cães e gatos) e de recuperação antigênica (sob condições controladas de temperatura e pressão) utilizados por eles para o Ki67.

Outro método utilizado para avaliação da proliferação celular de um tumor é o AgNOR. O índice AgNOR poderia ser utilizado como uma opção adicional para os casos em que a utilização da IHQ para Ki67 não pudesse ser utilizada, ou em combinação com o resultado do Ki67, como será discutido mais adiante. Isso se justifica pelo fato dos estudos retrospectivos utilizando a técnica de AgNOR, possivelmente sem conhecimento do tempo de fixação das amostras, não mencionarem influência do tempo de fixação nos resultados obtidos (Rech et al. 2004, Lima et al. 2005).

Visando otimizar a técnica de IHQ para o Ki67, dois sistemas de amplificação e quatro tempos de fixação foram utilizados no estudo prospectivo. A vantagem do sistema não biotinilado para o sistema biotinilado está no fato deste método ser particularmente mais simples, apresentar a mesma sensibilidade ou até sensibilidade mais alta, e menor reação de fundo (*background*) (Ramos-Vara & Miller, 2014). Galiza et al. (2014) constataram que há diferenças quanto à especificidade e sensibilidade na utilização de diferentes amplificadores durante a IHQ na detecção para aspergilose e zigomicose. Para as zigomicoses o método não biotinilado demonstrou alta sensibilidade e especificidade já para a aspergilose o método biotinilado apresentou elevada sensibilidade e especificidade.

Apesar de serem descritas algumas vantagens do sistema não biotinilado em relação ao biotinilado (Ramos-Vara & Miller, 2014), neste estudo foi observado que em ambos os sistemas houve alteração (redução na quantidade de células imunomarcadas) na determinação da fração de crescimento nos MCCs fixados por 48h. Este dado é importante e ao mesmo tempo preocupante, pois representa a realidade de grande parte dos laboratórios de patologia veterinária, que recebem materiais formolizados com tempos de fixação desconhecidos. A detecção prejudicada de células que imunomarcariam sob condições ideais de fixação (até 24h), pode resultar na determinação de uma fração de crescimento baixa (<23) quando deveria ser alta (>23), repercutindo em um prognóstico equivocado. A importância disso está no fato de que cães com MCCs com fração de crescimento alta apresentaram menor sobrevida (Webster et al. 2007).

É importante destacar que além da detecção prejudicada na fração de crescimento no estudo prospectivo, houve MCCs sem imunomarcção para o Ki67 nos dois sistemas utilizados, principalmente após 48h de fixação. Alves & Roman (2005) relatam queda da imunopositividade para antígeno nuclear (PCNA) em amostras de tonsila, utilizando o sistema biotinilado, em casos fixados por períodos superiores a 24h. Outros autores apontaram valores de 43% (Fonseca-Alves et al. 2015) e 23% (Kandefér-Gola et al. 2015) de falha na imunomarcção para Ki67 em MCCs, não explicando os motivos dessas falhas. Para Munakata & Hendricks (1993) os melhores resultados para o Ki67 foram observados em amostras de tonsilas fixadas por 4h, ocorrendo imunomarcção fraca em amostras fixadas por 48h. Adicionalmente, salienta-se que a demora em expor a amostra ao fixador pode alterar expressivamente a imunomarcção com anticorpos para índices de proliferação celular (Ramos-Vara & Miller 2014), e este fator também depende do remetente da amostra (clínico/cirurgião), muitas vezes sem ingerência do laboratório de diagnóstico histopatológico.

Dentre os métodos disponíveis para avaliação da proliferação celular dentro de um tumor, a contagem mitótica, embora de forma estimativa, é a mais utilizada pelos laboratórios de diagnóstico (Romansik et al., 2007). Este método, realizado em lâminas coradas pela técnica de HE, é simples e rápido, sendo um dos critérios para graduação histológica do MCCs (Kiupel et al., 2011). Para Sledge et al. (2016) a melhor maneira de avaliar completamente o reflexo da proliferação celular é utilizando múltiplos métodos. Multiplicando-se os resultados das técnicas de AgNOR e Ki67 (AgNORxKi67) é possível obter os melhores índices de proliferação celular dentro de um tumor, pois associa a taxa de crescimento com a fração de crescimento celular, respectivamente (Kiupel 2017, Sledge et al., 2016). Cães diagnosticados com índice AgNORxKi67 superior a 54 morreram antes de 12 meses, enquanto cães com índice inferior a 54 sobreviveram 2 anos (Webster et al., 2007). Embora a literatura cite que os melhores resultados da proliferação celular são obtidos de forma combinada, este estudo revelou que a combinação destas técnicas na rotina laboratorial pode ser complicada, uma vez que os valores para o Ki67 variaram entre tempos de fixação. Do mesmo modo, foi observado que casos fixados por mais de 72h não apresentaram imunomarcção para esta proteína.

Utilizando a graduação histológica, padrão de imunomarcção para KIT e marcadores de proliferação celular é possível escolher a melhor terapia a ser utilizada nos pacientes com este tumor (Sledge et al., 2016). Essas técnicas já são oferecidas por muitos laboratórios aos proprietários que desejam, além do diagnóstico histopatológico, outros fatores prognósticos que permitam estabelecer o tratamento apropriado para cada situação e paciente (Kiupel 2017).

CONCLUSÕES

Este estudo, bem como os demais estudos realizados em MCCs, demonstra a importância da implantação de novas ferramentas na busca do comportamento biológico deste neoplasma, porém aponta para algumas barreiras a serem superadas na rotina laboratorial. Concluímos com este estudo que: a) a imunomarcagem para a proteína KIT foi eficiente, tanto em tempos de fixação desconhecidos e, possivelmente, bastante variáveis (estudo retrospectivo), como com tempos de fixação conhecidos (estudo prospectivo); b) a imunomarcagem para o Ki67 mostrou-se altamente sensível ao maior tempo de fixação; c) não houve diferenças na detecção imunohistoquímica para a proteína KIT e Ki67 quando comparados os dois sistemas de amplificação utilizados; d) a avaliação da proteína Ki67 em amostras já fixadas, sem conhecimento do tempo de fixação, apresenta resultados variáveis; e) deste modo, a técnica de AgNOR pode ser utilizada como alternativa para avaliar a taxa de proliferação celular em casos fixados por mais de 24h.

REFERÊNCIAS

- Alves M.T.S. & Roman L.C.M. 2005. Estudo do efeito de distintos períodos de fixação em formalina e métodos de recuperação antigenica na técnica de imuno-histoquímica. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v.11.n.1.p.43-49.
- Bostock D.E. 1973. The prognosis following surgical removal of mastocytomas in dogs. *Journal of Small Animal Practice*, v.14, p.27-41. Available from: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1748-5827.1973.tb06891>>.
- Bostock, D.E. et al. 1989. Nucleolar organiser regions as indicators of post-surgical prognosis in canine spontaneous mast cell tumors. *British Journal of Cancer*, v.59, p.915-918.
- Camus M.S., Priest H.L., Koehler J.W., Driskell E.A., Rakich P.M., Ilha M.R. & Krimer P.M. 2016. Cytologic criteria for mast cell tumor grading in dogs with evaluation of clinical outcome. *Veterinary Pathology*, 53(6):1117-1123.
- Derenzini M. 2000. The AgNORs. *Micron*, v.31, p.117-120.
- Flores M.M., Mazarro R.D., Langohr I.M., Roy A., Strother K. & Figuera R.A. 2016. Ancillary techniques on the evaluation of canine cutaneous mast cell tumors from Brasil. *Ciência Rural*, v.46., n.10. p.1804-1810.
- Fonseca-Alves C.E., Bento D.D., Torres-Neto R., Werner J., Kitchell B. & Laufer-Amorim R. 2015. Ki67/KIT Double immunohistochemical staining in cutaneous mast cell tumors from Boxer dogs. *Research in Veterinary Science*, 102: 122-126.
- Galiza G.J.N., Tochetto C., Rosa F.B., Panziera W., Silva T.M., Caprioli R.A. & Kommers G.D. 2014. Utilização de três métodos imuno-histoquímicos na detecção de aspergilose e zigomicose em animais. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 34(7):637-642.
- Gross T.L., Ihrke P.J., Walder E.J. & Affolter V.K. 2009. Doenças de pele do cão e do gato: diagnóstico clínico e histopatológico. Trad. Sob direção de Alexandre Pinto Ribeiro. São Paulo: Roca, 837-842.
- Goldschmidt, M.H., Hendrick, M.J. 2002. Tumors of the skin and soft tissues. In: Meuten, D.J. *Tumors in domestic animals: 4.ed.* Ames: Iowa State, p.44-117.
- Kandefer-Gola M., Madej J.A., Dzimira S., Nowak M., Janus I. & Ciaputa R. 2015. Comparative analysis of markers of cell proliferation in canine mast cell tumors according to current classifications. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, v.18. n.2. p. 241-147.
- Kiupel M., Webster J.D., Kaneene J.B., Miller R. & Yuzbasiyan-Gurkan V. 2004. The use of KIT and tryptase expression patterns as prognostic tools for canine cutaneous mast cell tumors. *Veterinary Pathology*, 41:371-377.
- Kiupel M., et al. 2011. Proposal of 2-tier histologic grading system for canine cutaneous mast cell tumors to more accurately predict biological behavior. *Veterinary Pathology*, 48(1):147-155.
- Kiupel M. 2017. Mast Cell Tumors. In: Meuten, D.J. *Tumors in domestic animals: 5.ed.* Ames: Iowa State, p.176-202.
- Lima F.O., Catarino, R.M., Oshima C.T.F. & Figueiredo M.T.A. 2005. Regiões organizadoras nucleares argirofílicas no sarcoma sinovial. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v.41, n.5, p.347-352.
- Munakata S. & Hendricks J.B. 1993. Effect of fixation time and microwave oven heating time on retrieval of the Ki-67 antigen from paraffin-embedded tissue. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 41(8):1241-1246.
- Northrup N.C., et al. 2005. Variation among pathologists in histologic grading of canine cutaneous mast cell tumors. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 17:245-248.
- Northrup N.C., et al. 2005. Variation among pathologists in histologic grading of canine cutaneous mast cell tumors with uniform use of a single grading reference. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 17:561-564.
- Ozaki K., Yamagami T., Nomura K. & Narama I. 2007. Prognostic significance of surgical margin, ki-67 and cyclin d1 protein expression in grade in canine cutaneous mast cell tumor. *Journal of Veterinary Medicine Sciences*. 69(11): 1117-1121.

- Patnaik A.K., Ehler W.J. & Macewen E.G. 1984. Canine Cutaneous mast cell tumor: morphologic grading and survival time in 83 dogs. *Veterinary Pathology*, 21:469-474.
- Ramos-Vara J.A. & Miller M.A. 2014. When tissue antigens and antibodies get along: revisiting the technical aspects of immunohistochemistry – the red, brown, and blue technique. *Veterinary Pathology*, 51(1):42-87.
- Rech, R.R. et al. Mastocitoma cutâneo canino. Estudo de 45 casos. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.56, n.4, p.441-448, 2004.
- Romansik E.M., Reilly C.M., Kass P.H., Moore P.F. & London A. 2007. Mitotic index is predictive for survival for canine cutaneous mast cell tumors. *Veterinary Pathology*, 44:335-341.
- Silva A.L.D.A., Queiroz R.P., Szabó M.P.J. & Medeiros A.A. 2014. Grau de malignidade do mastocitoma cutâneo canino quanto a localização segundo as classificações de Patnaik et al. (1984) e Kiupel et al. (2011). *Revista Brasileira de Ciências Veterinárias*, v.21.n.3.p.183-187.
- Sledge D.G., Webster J. & Kiupel M. 2016. Canine cutaneous mast cell tumors: a combined clinical and pathologic approach to diagnosis, prognosis, and treatment selection. *The Veterinary Journal*, doi: 10.1016/j.tvjl.2016.06.003
- Souza T.M., Figuera R.A., Irigoyen L.F. & Barros C.S.L. 2006. Estudo retrospectivo de 761 tumores cutâneos em cães. *Ciência Rural*, v.36. n.2. p.555-560.
- Strefezzi R.F., Kleeb S.R., Xavier J.G. & Dias J.L.C. 2010. Avaliação da proliferação celular como indicador prognóstico para mastocitomas cutâneos caninos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 30(7):559-565.
- Webster J.D., Yuzbasiyan-Gurkan V., Miller R.A., Kaneene J.B. & Kiupel M. 2006. The role of c-KIT in tumorigenesis: evaluation in canine cutaneous mast cell tumors. *Neoplasia*, v.8 n.2.p.104-111.
- Webster J.D., Yuzbasiyan-Gurkan V., Miller R.A., Kaneene J.B. & Kiupel M. 2007. Cellular proliferation in canine cutaneous mast cell tumors: associations with c-KIT and its role in prognostication. *Veterinary Pathology*, 44:298-308.

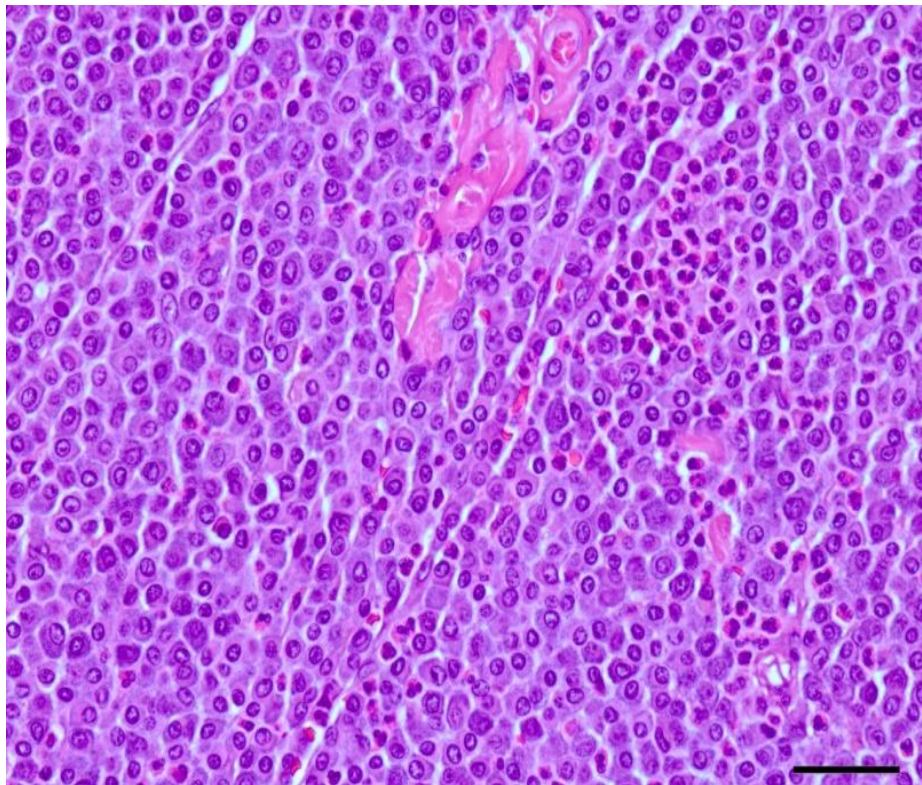


Fig.1. Cão, pele. Mastocitoma de baixo grau segundo o sistema Kiupel. HE, obj. 40x.

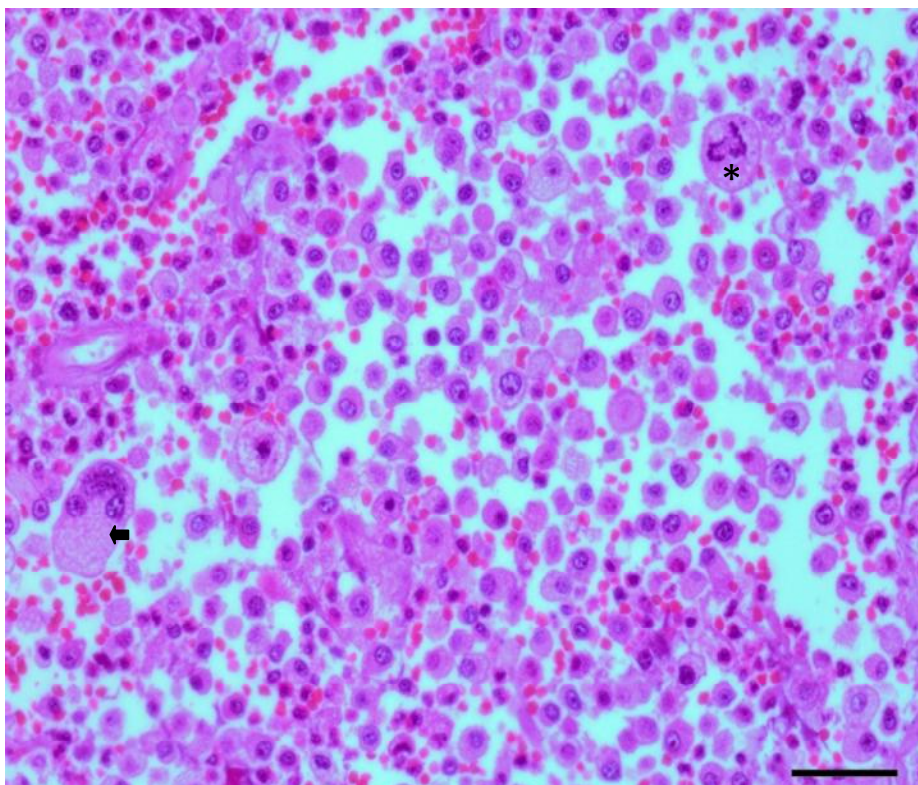


Fig.2. Cão, pele. Mastocitoma de alto grau segundo o sistema Kiupel. Observa-se pleomorfismo acentuado, com célula multinucleada (seta) e figura de mitose (asterisco). HE, obj. 40x.

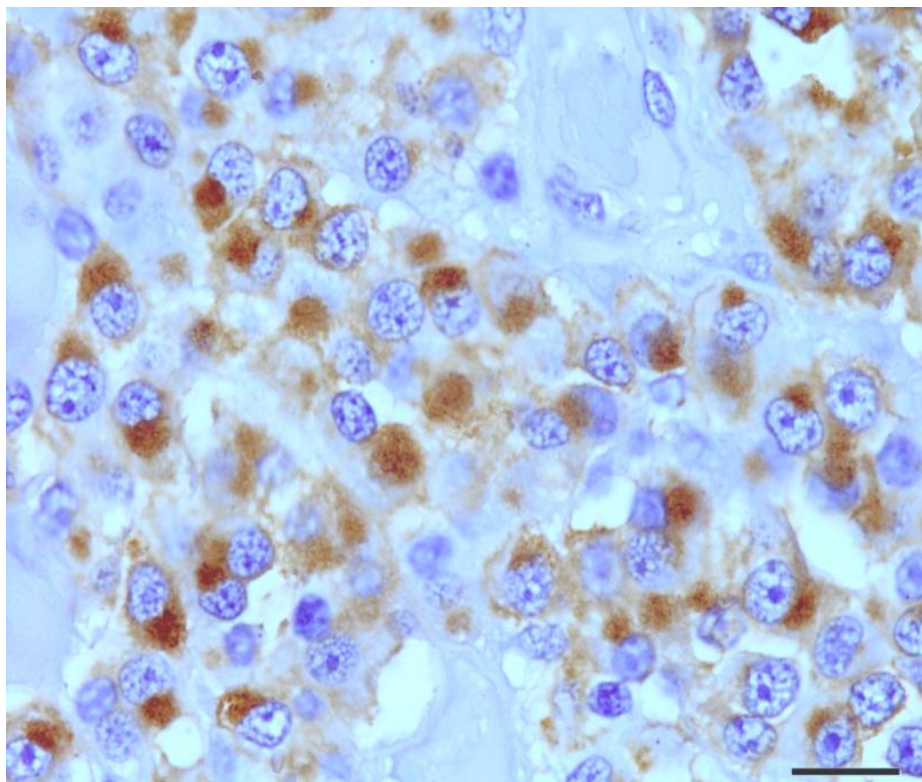


Fig.3. Cão, pele. Mastócitos apresentando intensa imunomarcção citoplasmática (padrão II) para KIT. Método não biotilado (polímero-HRP), 100x.

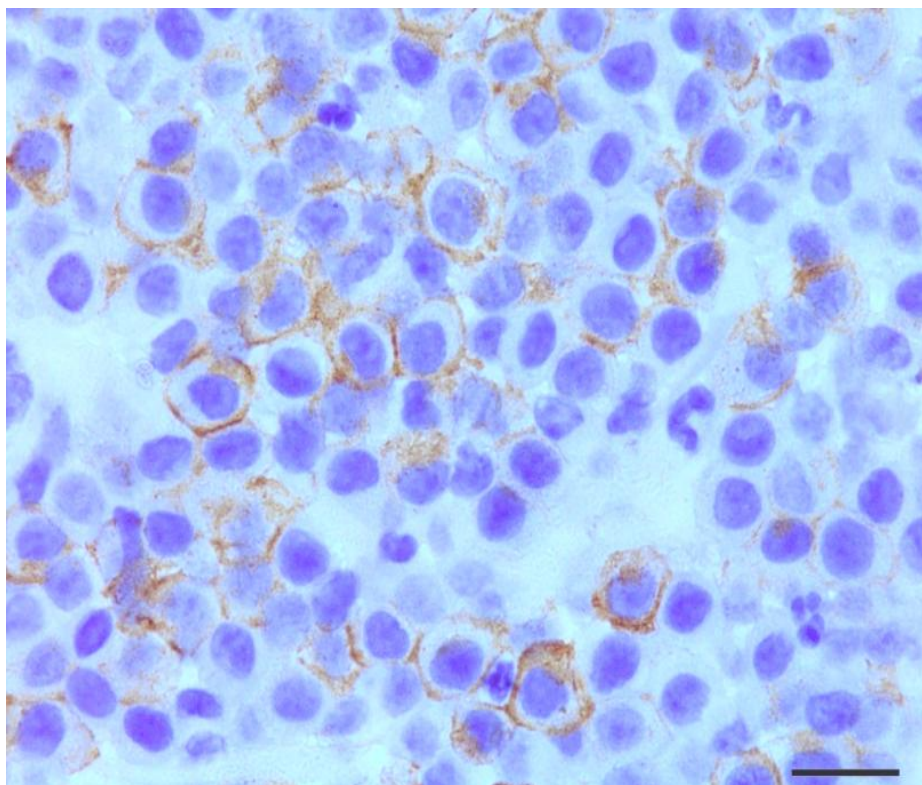


Fig.4. Cão, pele. Mastócitos apresentando imunomarcção de membrana (padrão I) para KIT. Método não biotilado (polímero-HRP), obj. 100x.

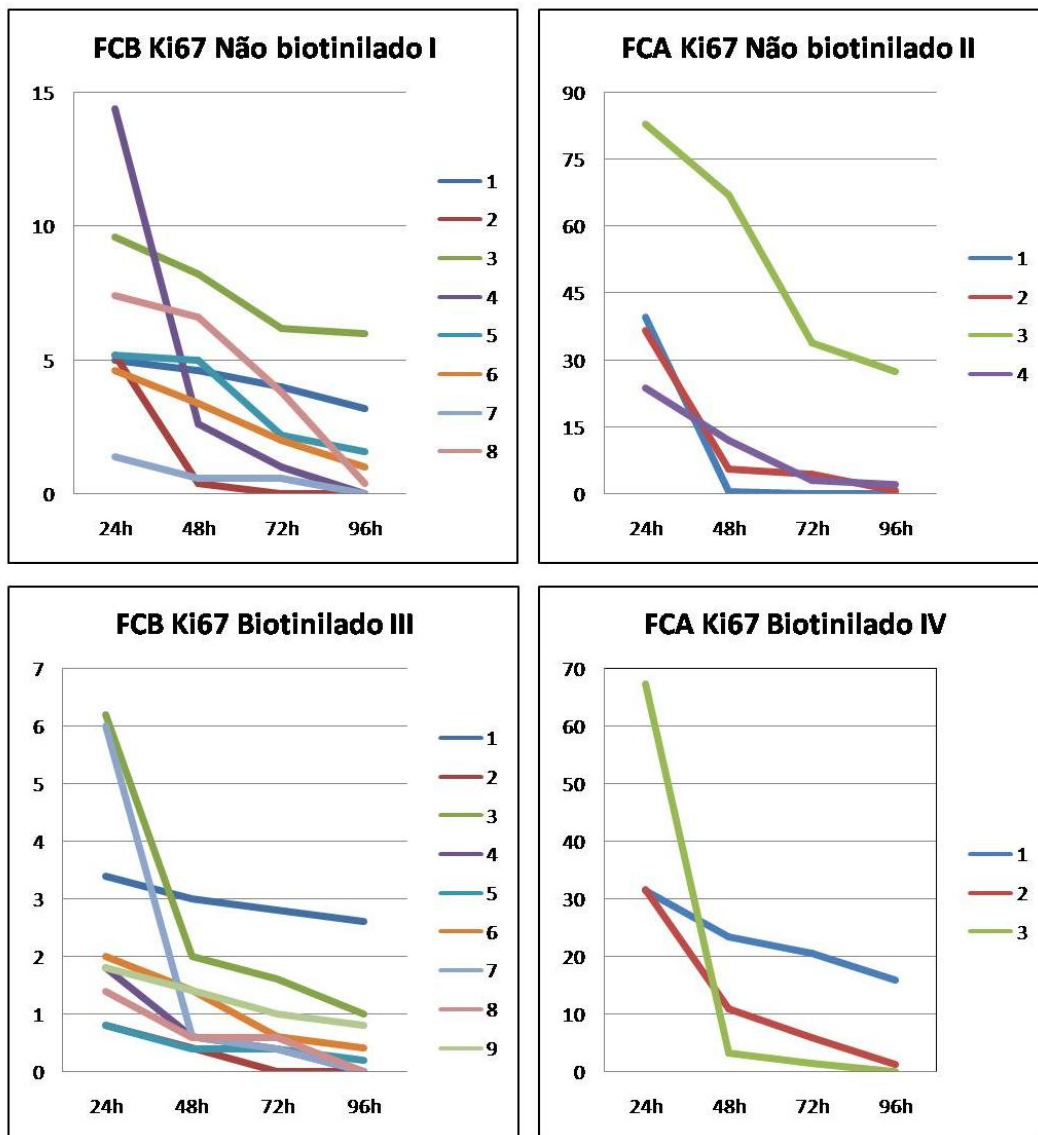


Fig.5. Valores absolutos da fração de crescimento alta (FCA) e baixa (FCB) para a proteína Ki67 no estudo prospectivo nos quatro tempos de fixação e nos dois sistemas de amplificação (não biotinilado e biotinilado).

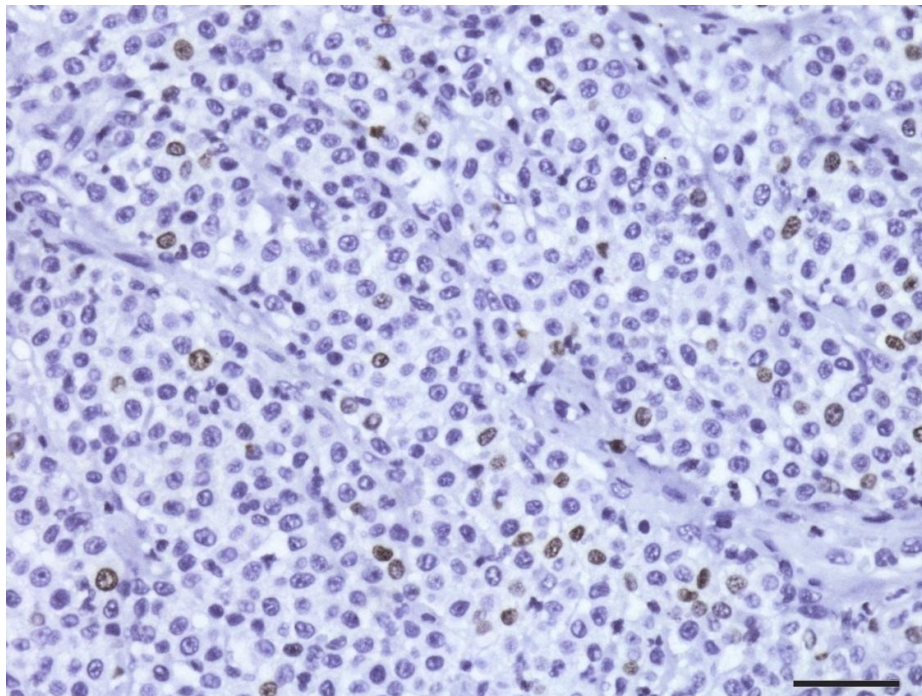


Fig.6. Cão, pele. Mastócitos apresentando imunomarcção nuclear para Ki67. Fração de crescimento alta. Fixação de 24h. Sistema não biotinilado (polímero-HRP), obj. 40x.

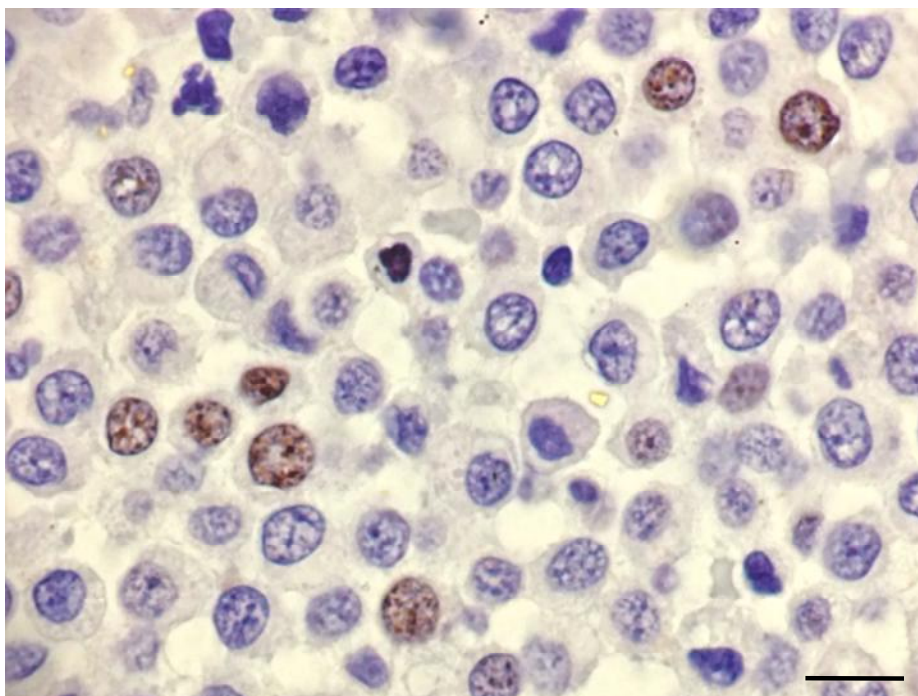


Fig.7. Mastócitos neoplásicos apresentando imunomarcção nuclear para Ki67. Fração de crescimento alta. Tempo de fixação de 24h. Método biotinilado (estreptavidina-biotina-peroxidase), obj. 100x.

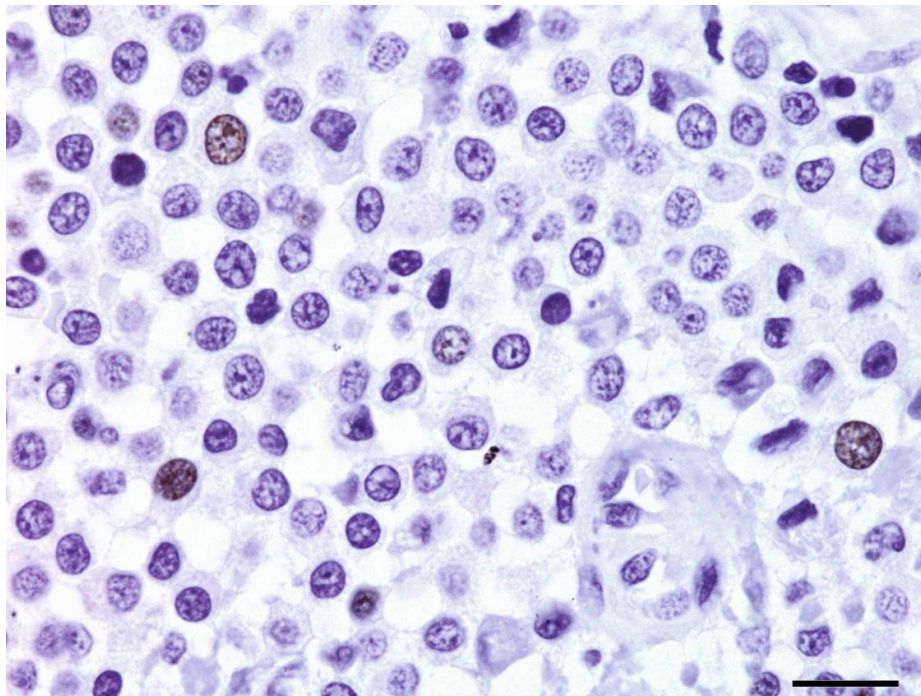


Fig.8. Cão, pele. Mastócitos neoplásicos apresentando imunomarcção nuclear para Ki67. Fração de crescimento baixa. Tempo de fixação de 24h. Método não biotilado (polímero-HRP), obj. 100x.

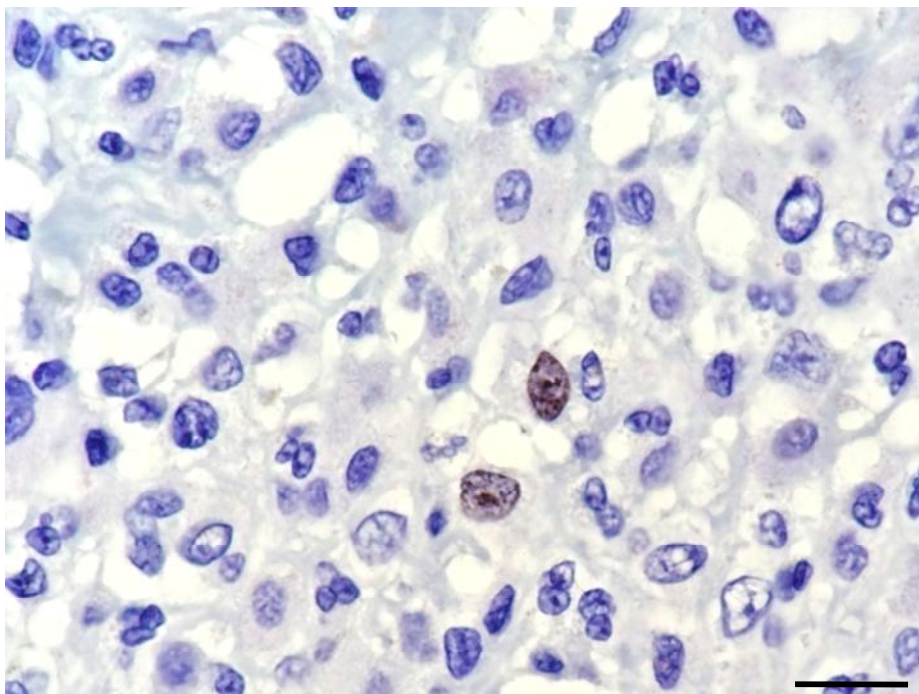


Fig.9. Cão, pele. Mastócitos neoplásicos apresentando imunomarcção nuclear para Ki67. Fração de crescimento baixa. Tempo de fixação de 24h. Método biotilado (estreptavidina-biotina-peroxidase), obj. 100x.

Quadros

Quadro1. Descrição dos protocolos executados para otimização da imuno-histoquímica com os anticorpos anti-KIT e anti-Ki67.

	Ac ^c	Recuperação Antigênica ^h	Diluição ^d	Incubação (tempo/ temperatura)	Ac secundário/ amplificador	Substrato-Cromógeno
	Anti-KIT	Tris-EDTA (pH 9,0)	1:200	1h/37C°	Não biotilado ^e	DAB ^{g*}
R ^a	Anti-Ki67	Citrato (pH 6,0)	1:50	1h/37C°	Não biotilado	DAB*
	Anti-KIT	Tris-EDTA (pH 9,0)	1:200	1h/37C°	Não biotilado	DAB*
P ^b	Anti-Ki67	Citrato** (pH 6,0)	1:50	1h/37C°	Biotilado ^f Não biotilado	DAB*

^aR: retrospectivo, ^bP: prospectivo, ^cAc: anticorpo, ^dAnticorpo diluído em PBST (tampão salinafosfato com Tween® 20-Sigma), ^ePolímero-HRP (EasyLink-One; EasyPath) ^fLSAB+System HRP: anticorpo secundário LSAB+System HRP e o complexo estreptavidina-biotina-peroxidase (Dako), ^gDAB: Liquid DAB (3,3' diaminobenzidine) + Substrate-Chromogen System (DAKO), ^hTempo de recuperação antigênica de 10-15 min em forno microondas em potência alta. *Contracorados com Hematoxilina de Harris.

Quadro2. Resultados da fração de crescimento baseado na detecção da proteína Ki67 utilizando o sistema não biotilado e biotilado no estudo prospectivo comparando tempos de fixação.

Caso n°	Não biotilado				Biotilado			
	24h	48h	72h	96h	24h	48h	72h	96h
1	↓	↓	↓	↓	↓	↓	•	•
2	↑	↓	•	•	↑	↑	↓	↓
3	↑	↓	↓	↓	↑	↓	↓	↓
4	↓	↓	•	•	↓	↓	↓	↓
5	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
6	↓	↓	↓	•	↓	↓	↓	•
7	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
8	↑	↑	↑	↑	↑	↓	↓	↓
9	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
10	↑	↓	↓	↓	↓	↓	↓	•
11	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	•
12	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓

↓ fração de crescimento baixa, ↑ fração de crescimento alta, • sem imunomarcção.

4 CONCLUSÃO

Este estudo abordando a gradação histológica e aspectos histoquímicos e imuno-histoquímicos dos MCCs permitiu concluir que: a) a imunomarcção para a proteína KIT foi eficiente, tanto em tempos de fixação desconhecidos e, possivelmente, bastante variáveis (estudo retrospectivo), como com tempos de fixação conhecidos (estudo prospectivo); b) a imunomarcção para o Ki67 mostrou-se altamente sensível ao maior tempo de fixação; c) não houve diferenças na detecção imuno-histoquímica para a proteína KIT e Ki67 quando comparado os dois sistemas de amplificação utilizados; d) a avaliação da proteína Ki67 em amostras já fixadas, sem conhecimento do tempo de fixação, apresenta resultados não confiáveis; e) deste modo, a técnica de AgNOR pode ser utilizada como alternativa para avaliar a taxa de proliferação celular em casos fixados por mais de 24h.

REFERÊNCIAS

- BLACKWOOD L. et al. **European consensus document on mast cell tumours in dogs and cats**. *Veterinary and Comparative Oncology*, v.10, n.3, p.e1-e29.
- CULLING C.F.A. et al. **Cellular Pathology Technique**. Butterworths: London, 4th ed, cap. 6, p.118-119, 1985.
- DABBS D.J. **Diagnostic Immunohistochemistry**. 2. ed. Elsevier, 2006. 828p.
- FERRO A.B. **Imunohitoquímica**. Lisboa, 2013. 138p.
- FIGHERA, R.A. **Causas de morte e razões para eutanásia de cães**. 2008. 172p. Tese (Doutorado em Patologia Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Santa Maria, RS, 2008.
- FIGHERA, R.A. et al. **Causas de morte e razões para eutanásia de cães da Mesorregião do Centro Ocidental Rio-Grandense (1965-2004)**. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.28, n.4, p.223-230, 2008.
- FURLANI, J.M. et al. **Mastocitoma canino: estudo retrospectivo**. *Ciência Animal Brasileira*, v.9, n.1, p.242-250, 2008.
- KIERSZENBAUM, A.L.; TRES, L.L. **Histologia e Biologia celular – Uma introdução à Patologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012. 120p.
- LELYVELD, S. et al. **Comparison between Ki-67 index and mitotic index for predicting outcome in canine mast cell tumors**. *Journal of Small Animal Practice*, v.56, p.312-319, 2015.
- LETARD, S. et al. **Gain-of-Function Mutations in the Extracellular Domain of KIT Are Common in Canine Mast Cell Tumors**. *Molecular Cancer Research*, v.8, n.7, p.1137-1145, 2008.
- LONDON, C.A. et al. **Multi-center, Placebo-controlled, Double-blind, Randomized Study of Oral Toleranib 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, n.11, p.3856-3865, 2009.
- MAGLENNON, G.A. et al. **Association of Ki67 index with prognosis for intermediate-grade canine cutaneous mast cell tumors**. *Veterinary and Comparative Oncology*, v.6, p.268-274, 2008.
- MEIRELLES, A.E.W.B. et al. **Prevalência de neoplasmas cutâneos em cães da Região Metropolitana de Porto Alegre, RS: 1.017 casos (2002-2007)**. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.30, n.11, p.968-973, 2010.
- MEUTEN, D.J. **Tumors in Domestic Animals**. 5. ed. Iowa State Press, 2017. 979p.

NATIVIDADE, F.S. et al. **Análise de sobrevida e fatores prognósticos de cães com mastocitoma cutâneo.** Pesquisa Veterinária Brasileira, v.34, n.9, p.874-884, 2014.

PINTO, J.P. et al. **Estudo histopatológico e histoquímico de mastocitomas na região de Espírito Santo do Pinhal.** Revista Acadêmica, Curitiba, v.5, n.3, p.265-276, 2007.

RECH, R.R.; GRAÇA, D.L. **Mastócitos em condições normais e patológicas – revisão.** Veterinária Notícias, Uberlândia, v.12, n.1, p.51-60, 2006.

REED, W. et al. **The Prognostic Value of p53 and c-erb B-2Immunostaining Is Overrated for Patients with Lymph Node Negative Breast Carcinoma.** American Cancer Society, 1999.

ROSSETTO, V.J.V. et al. **Frequência de neoplasmas em cães diagnosticados por exame citológico: estudo retrospectivo em um hospital-escola.** Semina: Ciências Agrárias, Londrina, v.30, n.1, p.189-200, 2009.

SAKAI, H. et al. **Proliferative Activity of Canine Mast Cell Tumors Evaluated by Bromodeoxyuridine Incorporation and Ki-67 Expression.** Journal of Comparative Pathology, v.127, p.233-238, 2002.

SCASE, T.J. et al. **Canine Mast Cell Tumors: Correlation of Apoptosis and Proliferation Markers with Prognosis.** Journal of Veterinary Internal Medicine, v.20, p.151-158, 2006.

SCHOLTEN, A.N. et al. **Prognostic Significance and Interobserver Variability of Histologic Grading Systems for Endometrial Carcinoma.** American Cancer Society, 2004.

SNYDER, P.W. **Doenças da Imunidade.** In: ZACHARY, J.F; MCGAVIN, M.D. Bases da Patologia em Veterinária. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013. 242p.

TURIN, L. et al. **Expression of c-KIT proto-oncogene in canine mastocytoma: a kinetic study using real-time polymerase chain reaction.** Journal Veterinary Diagnostic Investigation, v.18, p.343-349, 2006.

ZEMKE, D. et al. **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.

