

KATIA CRISTINA PINELLO

**Avaliação da quimiosensibilidade de mastocitomas caninos
graus I, II e III ao ácido retinóico *todo-trans***

**São Paulo
2006**

KATIA CRISTINA PINELLO

**Avaliação da quimiosensibilidade de mastocitomas caninos
graus I, II e III ao ácido retinóico *todo-trans***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Patologia

Área de Concentração:

Patologia Experimental e Comparada

Orientador:

Prof^a Dr^a Maria Lúcia Zaidan Dagli

**São Paulo
2006**

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virgínie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1780
FMVZ

Pinello, Katia Cristina
Avaliação da quimiosensibilidade de mastocitomas caninos graus I, II e III ao ácido retinóico *todo-trans* / Kátia Cristina Pinello. – São Paulo: K. C. Pinello, 2006.
115 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, 2006.

Programa de Pós-graduação: Patologia Experimental e Comparada.
Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Lúcia Zaidan Dagli.

1. Mastocitoma. 2. Cultura primária. 3. Quimiosensibilidade. 4. Ácido retinóico. 5. ATRA. I. Título.



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

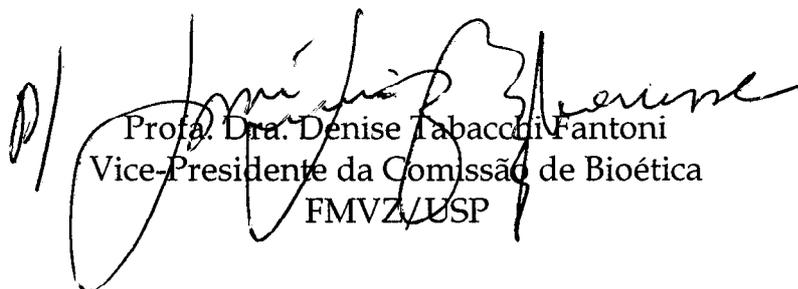
Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação da quimiosensibilidade de mastocitomas caninos graus I, II e III ao ácido retinóico todo-trans", protocolado sob o nº903/2006, utilizando amostras biológicas de pacientes do HOVET, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Maria Lúcia Zaidan Dagli, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião do dia 17/05/2006.

(We certify that the Research "Chemosensitivity assay of canine mast cell tumors grade I, II e III to retinoic acid all trans", protocol number 903/2006, utilizing biologics sample, under the responsibility of Profa. Dra. Maria Lúcia Zaidan Dagli, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved in the meeting on the 17th of May of 2006).

São Paulo, 18 de maio de 2006


Prof. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Vice-Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

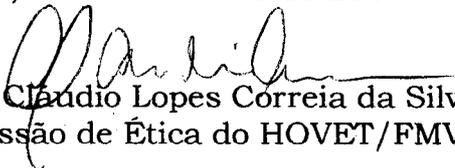
Hospital Veterinário

À Ilm^a.Sr^a.
Prof^a. Dr^a. **Maria Lucia Zaidan Dagli**

DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto “Avaliação da quimiosensibilidade de mastocitomas caninos graus I, II e III ao ácido retinóico Todo-trans”, sob a sua responsabilidade, previamente aprovado pela Comissão de Bioética dessa Faculdade, foi analisado e atende as normas da Comissão de Ética desse Hospital, que acompanhará administrativamente sua execução. Substituição do responsável, inserção de novos colaboradores e mudanças na metodologia proposta deverão ser imediatamente comunicados a essa comissão, assim como as datas de suspensão ou término do projeto.

São Paulo, 06 de setembro de 2006


Prof. Dr. Luís Cláudio Lopes Correia da Silva
Presidente da Comissão de Ética do HOVET/FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: PINELLO, Kátia Cristina

Título: Avaliação da quimiosensibilidade de mastocitomas caninos graus I, II e III ao ácido retinóico *todo-trans*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

DEDICO

À minha mãe pela sabedoria de todos os dias

Aos meus irmãos pelo exemplo e carinho

Ao meu amor, companheiro, amigo, Sandro, pelo seu incansável apoio e amor

AGRADECIMENTOS

À querida Prof^a Dr^a Maria Lúcia Zaidan Dagli pela oportunidade de realização deste trabalho, pela orientação, apoio, amizade, aprendizado e dedicação em todos esses anos.

À Prof^a Dr^a Júlia Maria Matera pela colaboração e apoio para realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Idércio Luiz Sinhori pela compreensão e apoio.

Aos professores do Departamento de Patologia e Toxicologia João Palermo Neto e Luciano Freitas Felício pela possibilidade de realização do trabalho.

À amiga Márcia Nagamine pelo belíssimo e incansável ensinamento e ajuda durante todo o tempo.

À amiga Tereza da Silva pelo companheirismo e apoio a qualquer e toda hora.

Ao amigo José Luiz Avanzo por toda paciência e inestimável ajuda.

Ao amigo Valdecir Marvulle pela análise dos dados estatísticos.

Aos companheiros de pós-graduação Patrícia, Mônica, Heidge, Heloisa, Mirela, Kátia, Lucas, Bruno, por toda ajuda, apoio, amizade e animado convívio.

Às técnicas do Laboratório Cyntia e Marguiti pela imensurável ajuda em todas as horas. À amiga Shirley, por sempre estar de portas abertas.

À Luciana Neves Torres, médica veterinária do serviço de patologia, e a todos os funcionários do Departamento de Patologia e Toxicologia – VPT.

Agradecimentos

Ao Genilson, Carolina, Patrícia, Andressa, Jesus, Gustavo e a toda equipe do Setor de Cirurgia do Hospital Veterinário da USP.

À FAPESP e CnPq pelo auxílio financeiro que permitiu a realização desse trabalho.

RESUMO

PINELLO, K. C. **Avaliação da quimiosensibilidade de mastocitomas caninos graus I, II e III ao ácido retinóico todo-*trans***. [Evaluation of the chemosensitivity of canine mast cell tumor grades I, II and III to the all *trans* retinoic acid] 2006. 115 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

O mastocitoma é o tumor cutâneo mais comum dos cães, representando 7% a 21% dos tumores da pele e tecidos moles, 11% a 27% dos tumores malignos cutâneos nessa espécie. Eles possuem uma grande variedade de aparência e comportamento, o qual o torna um desafio seu tratamento. Os retinóides são uma promessa na luta contra o câncer. Entretanto, há poucos estudos sobre os efeitos dos retinóides em neoplasias caninas. O presente trabalho teve como objetivo caracterizar a cultura primária de mastocitomas caninos assim como investigar a quimiosensibilidade deste tumor ao ácido retinóico todo-*trans* (ATRA). A cultura primária de mastocitomas caninos foi realizada em co-cultivo com fibroblastos, que demonstrou uma interação favorável entre mastócitos e fibroblastos, com uma sobrevivência média de 30 dias. A quimiosensibilidade dos mastocitomas caninos ao ATRA não mostrou diferenças entre os graus de mastocitomas, ou seja, tanto um mastocitoma grau II ou III respondem igualmente ao ATRA nas doses estudadas. Foi constatado também que o mastocitoma é mais sensível na concentração 10^{-4} M de ATRA ($p < 0,002$). Existe também um efeito já nas primeiras 24h, mas esse não se altera em 48h, entretanto se intensifica após 72h. Podemos inferir, então, que a maior quimiosensibilidade de mastocitomas caninos ao ATRA se dá após 72h de exposição na dose de 10^{-4} M. Podemos concluir que o ATRA apresenta efeitos sobre as células de mastocitomas caninos e pode ser usado como potencial adjuvante no tratamento desta neoplasia.

Palavras-chave: 1. Mastocitoma. 2. Cultura primária. 3. Quimiosensibilidade. 4. Ácido retinóico. 5. ATRA.

ABSTRACT

PINELLO, K. C. **Evaluation of the chemosensibility of canine mast cell tumor grades I, II and III to the all *trans* retinoic acid.** [Avaliação da quimiosensibilidade de mastocitomas caninos graus I, II e III ao ácido retinóico todo-*trans*.] 2006. 115 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

Mast cell tumor (MCT) is one of the most frequent neoplasms that affect the skin and soft tissue of the dog, representing about 7% a 21% of all skin tumors and 11% a 27% of malignant skin tumors in this specie. They present a great variety of appearance and behavior, which becomes a challenge to the treatment. The retinoids are well recognized as promising antitumor agents. However, there have only been a few reports about the effect of retinoids in canine cancers. The aim of this study was to characterize the primary mast cell tumor culture and to investigate the chemosensitivity of this tumor to all trans retinoic acid (ATRA). The primary cell culture of MCT was performed as co-cultive with fibroblasts, showing a positive interaction between mast cells and fibroblasts, with a lifetime of 30 days. The chemosensitivity of MCT to ATRA showed no difference between grade II or III, thus either a MCT grade II or grade III has the same response with ATRA at the doses studied. It has been shown that the MCT is more sensible at the dose 10^{-4} M ($p < 0,002$). There is also an effect on first 24h until 48h, changing after 72h. According to these results, it is possible to state that the great chemosensitivity of MCT to ATRA is after 72h of exposition at 10^{-4} M. We can conclude that ATRA may be a potential adjunctive chemotherapeutic agent for the treatment of canine mast cell tumor.

Keywords: 1. Mast cell tumor. 2. Primary cell culture. 3. Chemosensitivity. 4. Retinoic Acid. 5. ATRA.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Origem dos mastócitos. Mastócitos parecem ser derivados de células pluripotentes com maturação e diferenciação nos tecidos alvos.....21
- Figura 2 - Diferenciação dos mastócitos no seu microambiente. Progenitores de mastócitos migram para tecidos conectivos periféricos que, sob influência do fator “stem cell” (SCF), produzido por fibroblastos, diferenciam-se em mastócitos maduros. Fonte: Rossi et al., 1998.....24
- Figura 3 - Esquema representando um teste de quimiosensibilidade.....48
- Figura 4 - Fotomicrografias da cultura primária de células de mastocitoma canino grau II. A: Imediatamente após colocar em cultivo 100x. B: **24 horas** de incubação, 200x.....64
- Figura 5 - Fotomicrografias da cultura primária de células de mastocitoma canino grau II, **96 horas** de incubação. A: Vários fibroblastos aderidos, 100x. B: 200X64
- Figura 6 - Fotomicrografias da cultura primária de células de mastocitoma canino grau II, **144 horas** de incubação. A: 200x; B: 400x.....65
- Figura 7 - Fotomicrografias da cultura primária de células de mastocitoma canino grau II **144 horas** de incubação em placas com camada de colágeno. A: 100x. B: 200x.....65
- Figura 8 - Fotomicrografia de co-cultura de mastocitoma canino grau II com fibroblastos e mastócitos. Coloração por Panótico Rápido. 400x.....66
- Figura 9 - Fotografias do meio de cultura RPMI-R10 de células de mastocitoma canino grau II após 5 dias de cultivo, evidenciando a alta viscosidade do meio.....66
- Figura 10 - Fotomicrografias da cultura primária de células de mastocitoma canino grau II, **240 horas** de incubação, coradas com Azul de Toluidina. A: Proliferação de fibroblastos, 200x; B: Mastócitos na cultura. Grânulos de mastócitos corados com Azul de Toluidina, 400x.....67
- Figura 11 - Fotomicrografias da cultura primária de células de mastocitoma canino grau II **168 horas** de incubação. A – F: Coloração Giemsa concentrado. A: 200x. B – F: 1000x (imersão). D: Setas mostram células mortas. F: Setas mostram mastócitos degranulados.....68
-

- Figura 12 - Curva de crescimento das células mantidas em cultura, sem suplementação de fatores de crescimento, com antibiótico e antimicótico.....69
- Figura 13 - Citograma de células em cultura de mastocitoma canino grau II, logo no início e após 5 dias de cultivo.....71
- Figura 14 - Citograma de células em cultura de mastocitoma canino grau II, após 5 dias de cultivo, incubadas com Iodeto de propídeo. Os dados são expressos em porcentagem de células hipodiplóides, em fase G0-G1 e em fase S-G2-M. Pode-se observar que a maioria das células (91,68%) se encontra na fase G0.....71
- Figura 15 - Fotomicrografias da cultura primária de células de mastocitoma canino grau II **96 horas** após a incubação, com marcação de **laranja de acridina e brometo de etídio (AO/EB)** e analisadas por microscopia de fluorescência. A - F: 200x. Setas amarelas indicam fibroblastos marcados. Notem que alguns grânulos dos mastócitos coram em laranja.....73
- Figura 16 - Fotomicrografias da cultura primária de células de mastocitoma canino grau II **96 horas** de incubação, com marcação de **laranja de acridina e brometo de etídio (AO/EB)** e analisadas por microscopia de fluorescência. A e B: Detalhe aumentado de fotomicrografias em 200x. A: Seta indica célula morta, com núcleo marcado em vermelho. B: Notem os grânulos corados em laranja. C: Foco para fibroblastos; 200x.D: Notem grânulos marcados em vermelho fora das células (seta rosa); 200x.....73
- Figura 17 - Fotomicrografias do efeito do tratamento com ATRA nas diferentes concentrações por 48, 72 e 120h de incubação, em células de mastocitoma canino grau II em cultivo. Na dose de 10^{-4} M podemos notar uma diminuição dos mastócitos em comparação com outras doses.100x.....81
-

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1** - Principais mediadores isolados de mastócitos caninos.....23
- Quadro 2** - Critério histológico usado para classificar os mastocitomas de acordo com Patnaik et al., 1984.....34
- Quadro 3** - Critério modificado do Estadiamento Clínico da Organização Mundial de Saúde (OMS).....36
-

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 - Efeito do tratamento com ATRA nas concentrações de $5 \cdot 10^{-5}$, $5 \cdot 10^{-6}$, $5 \cdot 10^{-7}$, $5 \cdot 10^{-8}$ M, por 24 e 120 horas em células de mastocitoma canino grau II em cultivo.....76
- Gráfico 2 - Efeito do tratamento com ATRA nas concentrações de 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7} M, por 24, 48, 72, 96 e 120 horas em células de mastocitoma canino grau III em cultivo.....77
- Gráfico 3 - Efeito do tratamento com ATRA nas concentrações de 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7} M, por 24, 48, 72, 96 e 120 horas em células de mastocitoma canino grau II em cultivo.....78
- Gráfico 4 - Efeito do tratamento com ATRA nas concentrações de 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7} M, por 24, 48, 72, 96 e 120 horas em células de mastocitoma canino grau III em cultivo.....79
- Gráfico 5 - Efeito do tratamento com ATRA nas concentrações de 10^{-4} , $7 \cdot 10^{-4}$, $4 \cdot 10^{-4}$, 10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7} M, por 24, 48, e 72 horas em células de recidiva de mastocitoma canino grau III em cultivo.....80
- Gráfico 6 - Gráfico da regressão linear e exponencial para dose versus resposta (% do controle) nos tempo de 24 e 48h. A curva ajustada mostra o resultado para as concentrações de 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7} M de ATRA. Ajuste linear: $R^2 = 0,225$, com $p = 0,011$. Ajuste exponencial: $R^2 = 0,269$, com $p = 0,009$84
- Gráfico 7 - Gráfico da regressão linear e exponencial para dose versus resposta (% do controle) nos tempo de 72, 96 e 120h. A curva ajustada mostra o resultado para as concentrações de 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7} M de ATRA. Ajuste linear: $R^2 = 0,330$, com $p < 0,001$. Ajuste exponencial: $R^2 = 0,324$, com $p < 0,001$85
-

SUMÁRIO

		Pág.
1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1	MASTÓCITOS	19
2.1.1	Morfologia	19
2.1.2	Origem dos mastócitos	20
2.1.3	Características	22
2.1.4	Componente dos grânulos	22
2.1.5	Crescimento e Diferenciação	24
2.1.6	Apoptose	25
2.1.7	Localização	26
2.1.8	Adesão	27
2.1.9	Fisiologia	28
2.1.10	Angiogênese	28
2.2	MASTOCITOMAS	30
2.2.1	Etiologia	30
2.2.2	Apresentação e sinais clínicos	31
2.2.3	Diagnóstico	32
2.2.3.1	Classificação Histomorfológica.....	33
2.2.4	Prognóstico	35
2.2.4.1	Estadiamento Clínico.....	35
2.2.4.2	Idade.....	37
2.2.4.3	Localização.....	38
2.2.4.4	Raça.....	38
2.2.4.5	Outros Indicadores.....	39
2.2.5	Tratamento	40
2.2.5.1	Cirurgia.....	40
2.2.5.2	Radioterapia.....	41
2.2.5.3	Quimioterapia.....	41
2.2.5.4	Outros tratamentos.....	42
2.3	CULTURA DE CÉLULAS ANIMAIS	43
2.3.1	Cultura de Células de Mastocitomas	46
2.4	TESTE DE QUIMIOSENSIBILIDADE	47
2.4.1	MTT	49
2.5	ÁCIDO RETINÓICO	50
2.5.1	Origem	50
2.5.2	Metabolismo	50
2.5.3	Mecanismo de Ação	51
2.5.4	Funções Biológicas	52
2.5.5	Atividade antineoplásica	52

3	OBJETIVOS.....	55
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	56
4.1	MEIO DE CULTURA.....	56
4.2	CÉLULAS.....	56
4.3	VIABILIDADE CELULAR.....	57
4.4	DESAGREGAÇÃO ENZIMÁTICA.....	57
4.5	ESTUFA DE CO ₂	58
4.6	PREPARAÇÃO DE COLÁGENO DE CAUDA DE RATO.....	58
4.7	COLORAÇÃO POR LARANJA DE ACRIDINA/BROMETO DE EDTÍDIO.	58
4.8	CITOMETRIA DE FLUXO.....	59
4.9	ÁCIDO RETINÓICO.....	59
4.10	TESTE DE QUIMIOSENSIBILIDADE – MTT.....	60
4.11	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	60
5	RESULTADOS.....	62
5.1	CULTURA PRIMÁRIA DE MASTOCITOMAS CANINOS.....	62
5.1.1	Curva de crescimento.....	69
5.1.2	Citometria de Fluxo.....	70
5.1.3	Coloração por Laranja de Acridina/Brometo de Etídio.....	72
5.2	AVALIAÇÃO DA QUIMIOSENSIBILIDADE AO ÁCIDO RETINÓICO TODO-TRANS.....	75
5.2.1	Animal nº. 1.....	76
5.2.2	Animal nº. 2.....	77
5.2.3	Animal nº. 3.....	78
5.2.4	Animal nº. 4.....	79
5.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	82
6	DISCUSSÃO.....	86
7	CONCLUSÕES.....	91
	REFERÊNCIAS.....	92
	APÊNDICE.....	113

1 INTRODUÇÃO

O mastocitoma é o tumor cutâneo mais comum dos cães, representando 7% a 21% dos tumores cutâneos e 11% a 27% dos tumores malignos cutâneos (ISHIGURO et al., 2001) com uma incidência de 20% na população canina (LONDON; SEGUIN, 2003). Eles possuem uma grande variedade de aparência e comportamento, o qual o torna um desafio no diagnóstico e tratamento.

O grau histológico, determinado pelas características morfológicas das células neoplásicas e principalmente a presença ou ausência de grânulos típicos, tem sido estabelecido como o mais consistente fator prognóstico do comportamento desta neoplasia. A maioria dos cães com mastocitoma possui um prognóstico pobre (PATNAIK et al., 1984). Excisão cirúrgica é o tratamento de escolha e o uso de quimioterapia adjuvante é indicado para mastocitomas graus 3 com metástases e com margens comprometidas ou para tumores não ressecáveis (THAMM; MAULDIN; VAIL, 1999). Entretanto, a quimioterapia para mastocitomas caninos não apresenta bons resultados e possui uma grande variedade de respostas clínicas. Consequentemente há uma necessidade de investigar novos antineoplásicos para melhorar o prognóstico, principalmente para os mastocitomas mais indiferenciados.

Os retinóides são metabólitos ativos da vitamina A que modulam várias funções biológicas como a diferenciação celular, proliferação e desenvolvimento embrionário (KASTNER; MARK; CHAMBON, 1995). Está bem estabelecido que as atividades dos retinóides resultam principalmente da regulação transcricional de programas genéticos específicos. Estudos clínicos e pré-clínicos sugerem que os retinóides induzem a inibição do crescimento de vários tipos de câncer por meio da diferenciação e apoptose.

A interação entre retinóides e terapia antineoplásica tem sido estudada há décadas. A leucemia promielocítica aguda (APL) é um notável exemplo (AVVISATI; TALLMAN, 2003) e fornece base para a terapia de outras neoplasias.

Há poucos estudos dos efeitos dos retinóides em neoplasias caninas. Há estudos com linhagens caninas de osteossarcomas e melanomas (HONG et al., 2000a; 2000b; OHASHI et al., 2001). Recentemente foi relatado que os retinóides induzem a inibição do crescimento, em parte pela indução da apoptose, em linhagens de mastocitomas canino (OHASHI et al., 2006; MIYAGIMA et al., 2006).

Sendo assim, o objetivo deste estudo foi investigar a quimiosensibilidade dos mastocitomas caninos graus I, II e III ao ácido retinóico todo-*trans*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Para podermos compreender bem os mastocitomas e seu comportamento em cultivo e sua interação com ácido retinóico, é necessário conhecer a fundo os mastócitos e toda a sua biologia.

2.1 MASTÓCITOS

Em 1878, Paul Ehrlich identificou mastócitos em tecidos conjuntivos de humanos através da propriedade da metacromasia que os grânulos têm para corarem (EHRlich, 1877). Embora sua descoberta ultrapasse os cem anos, os mastócitos ainda representam um “enigma biológico”.

2.1.1 Morfologia

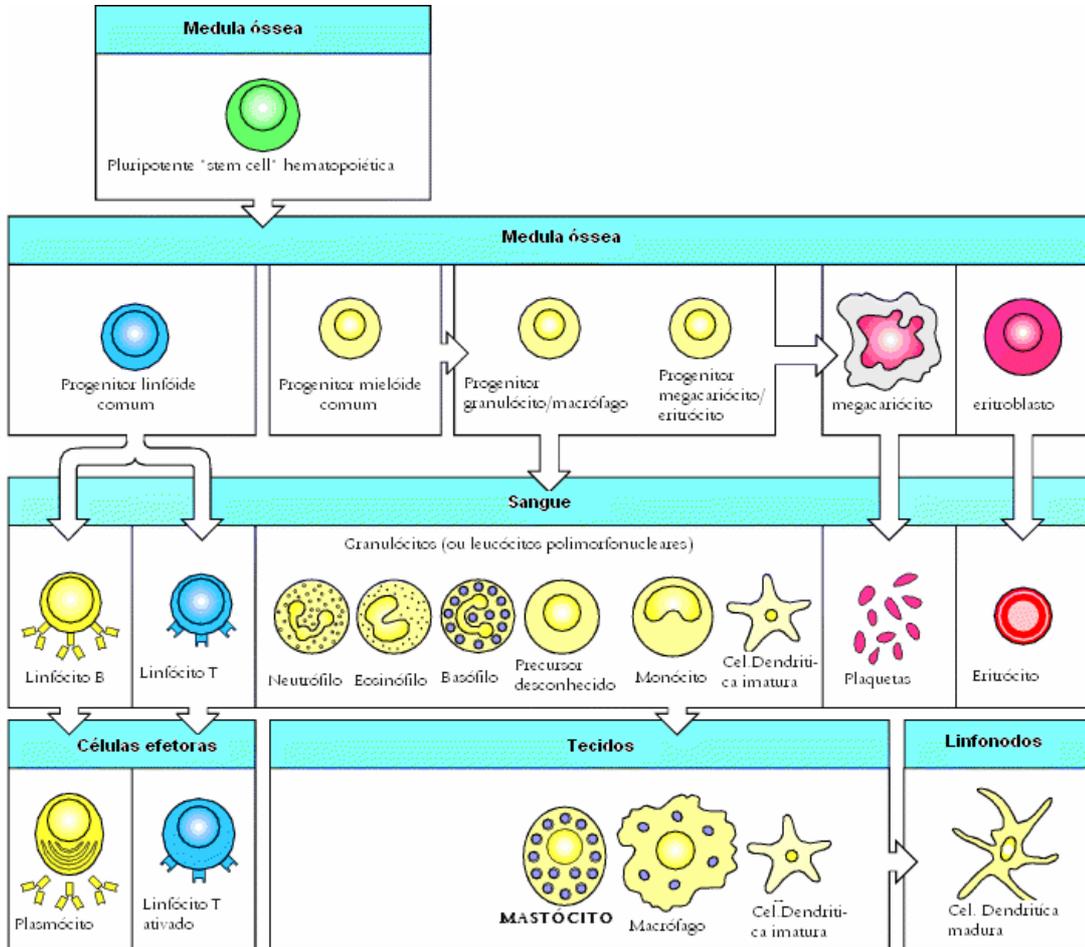
Mastócitos possuem um diâmetro de 10 a 15 μm , com núcleo redondo ou oval e contém grânulos citoplasmáticos típicos que são ávidos por corantes metacromáticos, como Azul de Toluidina, Giemsa e Azul de metileno. Colorações com esses corantes catiônicos (básicos) ocorrem devido a sua afinidade pelo polímero de heparina em tons entre o azul e o púrpura (KUFÉ et al., 2003) e são usados para a identificação dos mastócitos.

Segundo Lazarus (1986) os mastócitos caninos se assemelham mais aos mastócitos humanos do que aos murinos.

2.1.2 Origem dos mastócitos

A origem dos mastócitos ficou obscura por muito tempo. Foi sugerido que os mastócitos originariam-se de linfócitos T, macrófagos ou até mesmo de fibroblastos (BURNET, 1977; CZARNETZKI et al., 1982). Agora é aceito que os mastócitos originam-se de células mesenquimais hematopoiéticas pluripotentes com atividade mitótica derivadas da medula óssea (figura 1) (KITAMURA; GO; HATANAKA, 1978; KITAMURA et al., 1981; SONODA et al., 1983).

Mastócitos humanos são derivados de células precursoras hematopoiéticas pluripotentes (CD34-positiva), as quais podem também ser CD3 positivas sob influência de moléculas como interleucina 3 (IL-3) e stem cell factor (SCF). Além disso, mastócitos possuem antígenos de superfícies em comum com outras células hematopoiéticas, incluindo monócitos/macrófagos (ISHIZAKA et al., 1993).



Fonte: Adaptado de Janeway Jr et al., 2001.

Figura 1 - Origem dos mastócitos. Mastócitos são derivados de células hematopoiéticas pluripotentes com maturação e diferenciação nos tecidos alvos

2.1.3 Características

Embora com morfologia semelhante, os mastócitos são classificados em pelo menos duas populações distintas, formando uma população heterogênea (METCALFE; BARAM; MEKOR, 1997).

A evidência da presença de dois principais subtipos de mastócitos está baseada na descoberta de padrões distintos de proteases em diferentes tecidos (IRANI et al., 1986; SCHWARTZ, 1993). As proteases (triptase, quimase) são os componentes quantitativamente importantes dos grânulos dos mastócitos. Embora muitos mediadores de mastócitos são produzidos por outros tipos celulares, os grânulos de proteases são restritos aos mastócitos. Estes nos fornecem importantes sinais de funções únicas destas células (HOLGATE; ROBINSON; CHURCH, 1987). Os mastócitos são designados como MC_{TC} por conter triptase e quimase e estão principalmente na pele e cavidade peritoneal. Os mastócitos MC_T contêm apenas triptase e estão na mucosa, particularmente da lâmina própria intestinal (GALLI, 1993; IRANI et al., 1989; METCALFE; BARAM; MEKOR, 1997;)

Técnicas imunohistoquímicas distinguem entre esses dois tipos de células na mesma porção tecidual, de acordo com a quantidade e classificação de vários sítios anatômicos (SCHWARTZ, 1993).

2.1.4 Componentes dos Grânulos

Muitas substâncias produzidas e armazenadas nos mastócitos têm um potencial para afetar o microambiente do tecido conjuntivo. As principais substâncias

presentes nos grânulos dos mastócitos estão listadas no quadro 1, assim como suas principais ações.

Os principais mediadores presentes nos grânulos são a histamina e a heparina. A histamina, a heparina e a triptase, entre outras funções, estimulam o crescimento de fibroblastos e a síntese de colágeno *in vitro* (NORRBY, 1973) e *in vivo* (FERRAO; MASON, 1993; RUOSS; HARTMANN; CAUGHEY, 1991; SANDBERG, 1969; YAMASHITA et al., 1992;).

Mediador	Função
A-quimase	Ativação de metaloproteinases, degradação de proteína da matriz, aumento do extravasamento, quimiotaxia de neutrófilos, estímulo para secreção de glândula submucosa, inativação de neuropeptídeos inflamatórios, estímulo da conversão de angiotensina I em angiotensina II
Triptase	Ativação de metaloproteinases, estímulo de mitose de células epiteliais de da musculatura lisa
Heparina	Inibição da liberação de histamina, estimulação da angiogênese
Protease-3	Mesmo efeito da triptase
Gelatinase	Remodelamento da matriz conjuntiva
Catepsina C	Ativação intracelular de pró-quimase e pró-triptase
Histamina	Vasodilatação; Aumento da permeabilidade vascular; aumento da proliferação de células endoteliais; estimulação nervosa.
TNF	Aumento da expressão de moléculas de adesão; quimiotaxia de neutrófilos.
IL-4	Ativação de linfócitos TH2; ativação e diferenciação de linfócitos B; quimiotaxia para eosinófilos; regulação positiva para expressão de moléculas de adesão; aumento da produção de SCF
IL-5	Quimiotaxia para eosinófilos. Ativação de linfócitos B
FGF β	Proliferação de fibroblastos; angiogênese.
TGF β	Proliferação de fibroblastos e de células epiteliais. Quimiotaxia de leucócitos
PDGF	Proliferação e agregação de plaquetas; proliferação de fibroblastos
PDGF	Estimulação nervosa; vasodilatação.

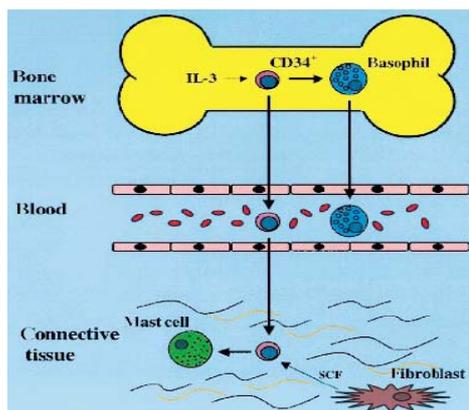
Fonte: Modificado de Noli & Miolo, 2001.

Quadro 1 - Principais mediadores isolados de mastócitos caninos.

2.1.5 Crescimento e Diferenciação

A diferenciação dos mastócitos ocorre após a migração para seu sítio específico, sendo essa diferenciação influenciada pelos fatores microambientais desse tecido (figura 2) (MATSSON, 1992). Após atingirem certo grau de maturação nos tecidos, o processo de maturação dos grânulos continua (COMBS, 1966).

As duas principais citocinas envolvidas na proliferação e/ou diferenciação de mastócitos foram identificadas como sendo a IL-3 e SCF (stem cell factor). A interleucina-3 parece ser importante na proliferação inicial dos mastócitos enquanto que SCF age mantendo a viabilidade dos mastócitos e promove sua maturação (BIANCHINE; BURD; METCALFE, 1992; BLECHMAN et al., 1993; TSAI et al., 1991).



Fonte: Rossi; Di Comite; Olivieri, 1998.

Figura 2 - Diferenciação dos mastócitos no seu microambiente. Progenitores de mastócitos migram para tecidos conectivos periféricos que, sob influência do fator "stem cell" (SCF), produzido por fibroblastos, diferenciam-se em mastócitos maduros

SCF é produzido pelos fibroblastos, células estromais, queratinócitos, células endoteliais, entre outros. SCF se liga ao receptor c-kit (c-kitR), presente nos mastócitos, ativando a tirosina quinase, levando a uma autofosforilação deste receptor. (PAULIS et al., 1999). Segundo Ishida et al. (2003) existem dois tipos de

SCF: ligante de membrana e uma forma solúvel. SCF solúvel circula no sangue a níveis detectáveis. (ISHIDA et al., 2003).

A proliferação e diferenciação dos mastócitos podem também ser influenciadas através de interações de adesão a componentes da matrix (BIANCHINE; BURD; METCALFE, 1992). SCF também promove a adesão dos mastócitos aos fibroblastos e aos componentes da matrix extracelular (DASTYCH; METCALFE, 1994), e isto influencia na migração e distribuição dos mastócitos.

2.1.6 Apoptose

O número de mastócitos nos tecidos em condições normais é relativamente constante (METCALFE; BARAM; MEKOR, 1997). Sabe-se que durante o desenvolvimento e vida adulta, a manutenção da homeostase se dá através do balanço entre a taxa de proliferação e morte celular. Morte celular, em condições fisiológicas, quase sempre ocorre por apoptose, um processo ativo programado. São vários os estímulos externos que iniciam a apoptose como depleção de fatores de crescimento, drogas, entre outros. É razoável assumir que a regulação do número de mastócitos pode estar relacionada com um controle local de apoptose (METCALFE; BARAM; MEKOR, 1997).

Tem sido proposto que SCF promove a sobrevivência dos mastócitos suprimindo a apoptose. Conseqüentemente, o microambiente deve ser capaz de regular o número de mastócitos pela modulação da produção de SCF (METCALFE; BARAM; MEKOR, 1997).

Este fato de que o SCF resgata os mastócitos da apoptose em células privadas de IL-3 foi confirmada *in vivo* (IEMURA et al., 1994). Sabe-se que nem dexametasona nem ciclosporina A, drogas usadas em disfunções de mastócitos,

inibem o efeito resgate do SCF (MEKORI; OH; METCALFE, 1993). Ambos foram previamente descritos inibindo a indução de várias citocinas derivadas de mastócitos, conhecidas por promover o crescimento de mastócitos (IL-3, IL-4) (HATFIELD; ROEHM, 1992). Fator de crescimento insulínico (IGF) e fator de crescimento de nervos (NGF) também têm sido relatados como inibidores de apoptose nos mastócitos (HORIGOME; BULLOCK; JOHNSON, 1994; RODRIGUEZ et al., 1992).

A demonstração de mecanismos de escape de apoptose revela um possível alvo terapêutico no tratamento de desordens sistêmicas de mastócitos.

2.1.7 Localização

Mastócitos diferenciados e maduros existem exclusivamente nos tecidos em condições não patológicas. Esta característica os distingue das outras células hematopoieticamente derivadas, como os basófilos, neutrófilos e eosinófilos.

Mastócitos se localizam ao redor dos nervos, vasos sanguíneos e linfáticos numa fração considerável. O fenótipo dos mastócitos também varia de acordo com sua distribuição. Se assumir que a distribuição dos mastócitos e sua heterogeneidade revelam a função biológica da célula, então, para entender a base da biologia dos mastócitos é necessário entender as interações íntimas entre os mastócitos e os componentes da matriz do tecido conjuntivo.

2.1.8 Adesão

Interações entre células e os componentes da matriz do tecido conjuntivo tem sido relatado alterar a biologia da célula envolvida. O encaixe dos componentes da matriz com os mastócitos regula vários processos como a fosforilação intracelular de proteínas, incorporação de timidina, liberação de histamina e mobilidade celular. É razoável esperar que estas interações matriz-mastócitos resultem também em alterações fisiológicas (ROTTEM et al., 1993; THOMPSON et al., 1989), síntese de citocinas, síntese de grânulos, sobrevivência celular e apoptose. De fato, estas interações entre os mastócitos e a matriz que o rodeia pode eventualmente ser mostrada como sendo o maior estímulo regulatório para ajustar a resposta biológica de mastócitos diferenciados e maduros (MEKORI; OH; METCALFE, 1993).

A adesão dos mastócitos foi observada ser acompanhada pelo espriamento das células e uma redistribuição dos grânulos citoplasmáticos. A adesão também se mostrou ser dependente de cálcio e da temperatura (THOMPSON et al., 1991).

Mastócitos da pele expressam receptores de laminina, que são intimamente associados com a laminina das membranas *in vivo* e formam complexos de laminina pericelular *in vivo* (WALSH et al., 1991).

Mastócitos aderem não só a matriz, mas a outras células também. Sabe-se que mastócitos aderem a fibroblastos *in vitro*. A facilidade da agregação entre mastócitos e fibroblastos se dá pelo SCF da membrana dos fibroblastos que interage com o receptor de membrana c-kit dos mastócitos, facilitando a agregação e promovendo a diferenciação e sobrevivência dos mastócitos (MEKORI; OH; METCALFE, 1993).

Um fato interessante são os estudos que têm vantagens na co-cultura de mastócitos com fibroblastos. Fibroblastos têm se mostrado em ingerir grânulos dos mastócitos *in vivo* e *in vitro* dentro de 16-60 minutos de sua liberação

(HIGGINBOTHAM; DOUGHERTY; JEE, 1956; SUBBA RAO et al., 1983). Tem-se relatado que os mastócitos devem estar bem próximos aos fibroblastos e que os mediadores responsáveis pela resposta dos fibroblastos devem estar presentes no contato direto (DAYTON et al., 1989). Mastócitos são relatados em aumentar a migração e proliferação de fibroblastos *in vivo* e *in vitro* (LEVI-SCHAFFER; KUPIETSKY, 1990).

2.1.9 Fisiologia

Mastócitos são considerados células efetoras críticas na reação inflamatória, fundamental na hipersensibilidade imediata. Entretanto, inúmeras observações têm sido apontadas para a possibilidade de que estas células podem participar ativamente e contribuir para o desenvolvimento e modulação de muitos outros processos fisiológicos e patológicos devido a sua notável variedade de mediadores liberados em resposta a diferentes estímulos (GALLI, 1993).

Mudanças na quantidade de mastócitos em vários locais anatômicos e/ou evidente degranulação têm sido observadas em um grande número de doenças, incluindo reações de hipersensibilidade tardia, fibrose (CLAMAN, 1993), patologia autoimune (DIETSCH; HINRICHS, 1989), neoplasias (AIBA et al., 1985; HATFIELD; ROEHM, 1998), entre outros.

2.1.10 Angiogênese

A indução de novos vasos sanguíneos, ou angiogênese, uma parte fundamental para vários processos biológicos e também para o crescimento tumoral,

tem sido relacionada ao mastócitos (MEININGER; ZETTER, 1992). As secreções dos mastócitos aumentam a vascularidade e o desenvolvimento de vasos (CLINTON et al., 1987). Experimentos feitos *in vitro*, com meio condicionado com mastócitos, estimularam a migração de células endoteliais (AZIZKHAN et al., 1980). Grânulos de mastócitos têm sido localizados dentro das células endoteliais (DESCHRYVER-KECSKEMETI et al., 1992; METCALFE, 1985;), estimulando sua proliferação (DUNCAN et al., 1992).

Efeitos angiogênicos da histamina são conhecidos desde 1969 quando este agente, introduzido localmente, mostrou estimular a angiogênese da córnea (YAMASHITA et al., 1992). Os efeitos da histamina na angiogênese foram confirmados (SORBO; NORRBY, 1992) e mostrados serem mediados pelos receptores H1 e H2 (SORBO et al., 1994). Heparina, quando introduzido *in vivo*, também promove a formação de novos vasos, enquanto que o uso de um antagonista, protamine sulfato, inibe a angiogênese (JAKOBSSON; SORBO; NORRBY, 1990; NORRBY & SORBO, 1992; UNGER; SHEFFIELD; EPSTEIN, 1991).

2.2 MASTOCITOMAS

Desde o primeiro relato sobre tumores cutâneos caninos, o mastocitoma é reconhecido como o mais comum que acometem a espécie canina (BLOOM, 1942; NIELSEN; COLE, 1958; WEISS, 1965), representando 7% a 21% dos tumores cutâneos, 11% a 27% dos tumores malignos cutâneos (ISHIGURO et al., 2001) com uma incidência de 20% na população canina (LONDON; SEGUIN, 2003). Eles possuem uma grande variedade de aparência e comportamento, o qual o torna um desafio no diagnóstico e tratamento.

2.2.1 Etiologia

Estas formações tumorais cutâneas são originárias dos mastócitos (SELYE, 1965; SOTER, 2000; VAIL, 1996). A etiologia dos mastocitomas nos cães é desconhecida. Várias hipóteses associam tais proliferações a processos inflamatórios crônicos ou aplicações de substâncias irritantes em subcutâneo. Relatos anteriores sugerem a associação dos mastocitomas a uma etiologia viral (GRAHAN; O'KEEFE, 1994; VAIL, 1996).

O aumento da incidência em certas raças, como a Boxer, sugerem a possibilidade de uma causa genética (LONDON; SEGUIN, 2003).

Como mencionado anteriormente, SCF é um importante fator de crescimento para mastócitos. O receptor para SCF é o Kit (ou c-KitR), codificado pelo proto-oncogene c-kit; interações entre SCF-Kit são necessárias para diferenciação, sobrevivência e função dos mastócitos (GALLI; ZSEBO; GEISLER, 1994). Mutações no c-kit, que levam à ativação de Kit na ausência de SCF, têm sido

demonstradas ocorrer em mastocitoses sistêmicas nos humanos (SPERR et al., 1998). Vários autores têm recentemente identificado a presença de mutações ativas no proto-oncogene c-kit em mastocitomas caninos. Estas mutações consistem em duplicações internas no domínio regulatório negativo do Kit (ZEMKE; YAMINI; YUZBASLIYAN-GURKAN, 2001). A alta frequência dessas mutações sugere que alterações no c-kit pode estar envolvido no desenvolvimento ou progressão dos mastocitomas caninos (LONDON; SEGUIN, 2003).

2.2.2 Apresentação e sinais clínicos

Os mastocitomas são conhecidos como “the great pretenders”, pois podem imitar muitas outras lesões (MURPHY, 2003). Em geral, apresentam-se como nódulos solitários de, aproximadamente, 3 cm de diâmetro, alopecicos, eritematosos, edemaciados, infiltrativos e ulcerados (GRAHAN; O'KEEFE, 1994; VAIL, 1996). Classicamente, os mastocitomas bem diferenciados aparecem como uma lesão alopecica e solitária, enquanto que o tumor pouco diferenciado pode ser ulcerado, eritematoso e edemaciado, com lesões satélites, cercando o tumor primário (MURPHY, 2003).

Um subgrupo importante a se destacar são aquelas lesões que parecem ser no exame clínico um lipoma. Esse grupo evidencia a importância de se fazer uma citologia em toda formação cutânea (MURPHY, 2003).

Mastocitomas cutâneos podem também ter variados tempos de crescimento. Em geral, os mastocitomas com crescimento lento e presente no mínimo há 6 meses costumam apresentar comportamento mais benigno enquanto aqueles que crescem rapidamente e com grandes dimensões costumam comportar-se de maneira mais maligna (BOSTOCK, 1973). Entretanto, a duração da lesão nem sempre prediz o comportamento biológico dos mastocitomas (LONDON; SEGUIN, 2003).

Aproximadamente 50% dos mastocitomas cutâneos ocorrem no tronco e na região perineal; 40% nos membros e 10% na região de cabeça e pescoço (LONDON; SEGUIN, 2003).

Os sinais clínicos dos mastocitomas são causados pela liberação de histamina, heparina e outras aminas vasoativas. A manipulação mecânica deste tumor durante o exame físico pode induzir a degranulação levando a um eritema e formação do sinal de “Darrier”, e alguns proprietários ocasionalmente relatam que o tumor parece mudar de tamanho em curtos períodos (THAMM; VAIL, 2001). Ulceração gástrica é também uma complicação importante dos mastocitomas. De 35% a 83% dos cães com mastocitomas que seguem para a necrópsia possuem evidências de úlceras gástricas e altas concentrações plasmáticas de histamina (FOX et al., 1990). Altos níveis de histamina presumivelmente levam a estimulação de receptores H₂ de células parietais, produção gástrica excessiva e desenvolvimento de úlceras. Conseqüentemente, sinais como vômitos, anorexia, melena e dor abdominal podem estar presentes (LONDON; SEGUIN, 2003). Em um estudo, os níveis de histamina em cães com mastocitomas não foram relacionados com o estágio clínico, grau histológico ou tamanho do tumor (FOX et al., 1990).

2.2.3 Diagnóstico

Para qualquer lesão suspeita de mastocitoma deve-se fazer inicialmente uma citologia aspirativa de agulha fina, provavelmente o método mais fácil de diagnosticar os mastocitomas (LONDON; SEGUIN, 2003). Esse tumor geralmente é facilmente identificável devido a coloração metacromática de seus grânulos (MURPHY, 2003). Entretanto, mastocitomas malignos indiferenciados podem contém pouco ou nenhum grânulo. Por isso indica-se usar colorações como o Azul de Toluidina ou Giemsa. Outros tumores de células redondas que precisam ser incluídos no diagnóstico diferencial são os linfomas, plasmocitomas, histiocitomas,

melanoma amelanocítico e tumor venéreo transmissível (TVT) (LONDON; SEGUIN, 2003).

Visto que o diagnóstico dos mastocitomas pode, na sua maioria, ser feito através da citologia, o exame histopatológico é sempre obrigatório, pois se baseia na classificação histomorfológica.

2.2.3.1 Classificação histomorfológica

O mais apurado valor preditivo do comportamento dos mastocitomas é o seu grau histopatológico. A classificação histomorfológica dos mastocitomas é subdividida em três categorias de acordo, principalmente, com o grau de diferenciação dos mastócitos: mastocitomas de graus I, II e III.

O grau é importante porque, a maioria dos tumores bem diferenciados provavelmente não irão metastatizar e um tratamento adequado será curativo. Por outro lado, mais de 75% dos tumores pouco diferenciados irão metastatizar para um linfonodo local, fígado, baço e medula óssea (raramente para os pulmões). Tumores de graus intermediários podem metastatizar ou não, embora trabalho recente sugerisse que, em um todo, quanto mais diferenciado o tumor, melhor o prognóstico, se tratado adequadamente (SEGUIN et al., 2001; WEISSE; SHOFER; SORENMO, 2002).

A classificação apurada da lesão depende de análise histológica e não apenas citológica. Além do grau de diferenciação, outros fatores são levados em consideração, conforme quadro 2. Dois artigos foram publicados descrevendo dois sistemas de classificação muito parecidos. Patnaik et al. (1984) descreveu mastocitomas bem diferenciados como grau I e pobremente diferenciados como grau III, enquanto Bostock (1973) classificou bem diferenciado como grau III e os

pobrememente diferenciados como grau I. Para tanto, será adotada a classificação de Patnaik et al. (1984), a qual é utilizada no Serviço de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

Grau I (Bem diferenciado)
<ul style="list-style-type: none">▪ Grupos compactos ou linhas de células neoplásicas confinado a derme, separado por fibras de colágeno.▪ Células redondas e monomórficas com citoplasma distinto; grânulos intracitoplasmáticos de tamanho médio; sem figuras de mitoses; edema mínimo; sem ulceração.
Grau II (Diferenciação Intermediária)
<ul style="list-style-type: none">▪ Células neoplásicas invadindo abaixo da derme/tecido subcutâneo.▪ Células redondas a ovóides, com algum pleomorfismo. Algumas células com citoplasmas menos distintos com grânulos grandes intracitoplasmáticos hipercromáticos. A maioria possui citoplasma distinto com poucos grânulos. Figuras mitóticas são de 0 – 2 por campo em aumento maior. Área de edema difuso ou necrose
Grau III (Pobrememente diferenciado)
<ul style="list-style-type: none">▪ Acúmulos densos de células pleomórficas. Citoplasma indistinto com poucos grânulos ou nenhum. Células binucleadas são comuns. Figuras mitóticas de 3 – 6 por campo em maior aumento. Edema, hemorragia e necroses são comuns.

Fonte: Adaptado de Murphy (2003).

Quadro 2 - Critério histológico usado para classificar os mastocitomas de acordo com Patnaik et al. (1984).

O mastocitoma de grau I compreende 36% dos casos, o grau II 44% e 20% compreendem os de grau III (PATNAIK et al., 1984).

2.2.4 Prognóstico

O prognóstico dos mastocitomas está baseado principalmente no grau histopatológico e no estadiamento clínico, mas leva-se em conta localização, raça acometida, idade, entre outros fatores.

2.2.4.1 Estadiamento Clínico

O estadiamento clínico dos mastocitomas é realizado através de citologia aspirativa do nódulo e linfonodos, exame histopatológico, ultrassonografia abdominal, hemograma e mielograma (MADEWEEL; THEILEN, 1987; O'KEEFE, 1990; VAIL, 1996).

Segundo a classificação dos tumores de animais domésticos da Organização Mundial de Saúde (OMS), os mastocitomas são estadiados de I a IV (quadro 3), conforme localização e infiltração do tumor, número de nódulos, acometimento de linfonodos ou medula óssea e sinais sistêmicos presentes ou não (HAHN; RICHARDSON, 1995).

Estágio 0
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Tumor completamente excisado da derme, identificado histologicamente, sem envolvimento de linfonodo regional.
Estágio 1
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Tumor confinado a derme sem envolvimento de linfonodo regional.
Estágio 2
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Tumor confinado a derme com envolvimento de linfonodo regional.
Estágio 3
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Múltiplos tumores na derme ou grande infiltração tumoral, com ou sem envolvimento de linfonodo regional
Estágio 4
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Qualquer tumor com metástases distantes ou recorrência com metástases

Fonte: Adaptado de Murphy (2003).

Quadro 3: Critério modificado do Estadiamento Clínico da Organização Mundial de Saúde (OMS)

Animais com alto estadiamento podem ter um prognóstico pobre. Entretanto, podem ocorrer algumas intercorrências deste estadiamento. O estágio 3, por exemplo, não diferencia claramente entre cães com lesões satélites ou metástases de um tumor primário agressivo e cães com múltiplos tumores de baixo grau, cada um com seu tumor primário. Para este último grupo tem um valor preditivo melhor o grau do tumor do que o estadiamento clínico (MURPHY, 2003).

Um hemograma completo pode mostrar anemia relacionada a sangramento gastrointestinal, e uma eosinofilia ou basofilia podem ocasionalmente ser associadas com acometimento visceral (MURPHY, 2003).

Historicamente, algumas autoridades recomendam que todos os animais com diagnóstico de mastocitoma sejam submetidos a uma série de testes incluindo “buff

coat” (análise da camada leuco-plaquetária) e aspiração da medula óssea. Recente trabalho sugeriu que 85 outras doenças sem ser mastocitoma podem ser positivas no “buffy coat” para circulação de mastócitos (MCMANUS, 1999). E mais, em um estudo, apenas 30% dos cachorros com mastocitoma pouco diferenciado tinham “buffy coat” positivos. No mesmo estudo, 5 de 9 cachorros avaliados tinham o aspirado da medula óssea positiva para metástase (O’KEEFE et al., 1987). Entretanto, todos estes cachorros tinham outra evidência de metástase.

Achar mastócitos na drenagem dos linfonodos deve ser interpretado com cautela. Em um estudo, 24% dos cães normais tinham linfonodos positivos para mastócitos (BOOKBINDER; BUTT; HARVEY, 1992). Se em uma biópsia o linfonodo foi destruído por lâminas de mastócitos, um diagnóstico seguro de metástase pode ser feita. Entretanto, achar alguns mastócitos “fantasmas” em linfonodo reativo pode ser difícil de interpretar. Duncan (1999), sugere que metástase deve ser diagnosticada na citologia se mastócitos representarem mais que 3% da população de células.

Os sinais clínicos presentes podem ajudar no prognóstico. Animais com crescimento tumoral rápido ou sinais de anorexia, vômitos, melena, edema espalhado ou eritema associado com a degranulação dos mastócitos, possuem um prognóstico pobre. Inversamente, aqueles com tumores presente há meses ou anos apresentam prognóstico favorável.

2.2.4.2 Idade

Os mastocitomas caninos ocorrem principalmente na faixa etária de 8½ anos a 9 anos mas existem relatos de idades que vão de 3 meses a 19 anos (VAIL; WITHROW, 2001; MURPHY, 2003).

Em animais jovens (homem, cão, gato, cavalo), os mastocitomas são muito raros e apresentam padrão histopatológico de neoplasia benigna ou pouco maligna (células muito diferenciadas), podendo ocorrer regressão espontânea do nódulo. Nos animais idosos os mastocitomas se comportam como tumores malignos, apresentando altos índices de mortalidade, alto potencial metastático e recidiva freqüente do tumor (MURPHY, 2003).

2.2.4.3 Localização

Tumores associados com junções mucocutâneas, como oral, perianal e inguinal estão associados a um pobre prognóstico. Acometimento visceral no baço, fígado ou medula óssea geralmente é resultado de metástase sistêmica de um mastocitoma cutâneo agressivo (LONDON; SEGUIN, 2003) e é fator prognóstico grave (MURPHY, 2003). Leucemia de mastócitos em cães é extremamente rara (LONDON; SEGUIN, 2003).

2.2.4.4 Raça

A raça tem um efeito tanto na incidência quanto na malignidade do tumor. Cães sem raça definida estão entre os mais acometidos, embora cães descendentes do Bulldog, como Boxers e Staffordshire Bull Terriers, são mais relatados em estudos. Há evidências que Boxers são mais suscetíveis, mas tendem a ter tumores menos agressivos (MURPHY, 2003; O'KEEFE, 1990; VAIL, 1996). SharPeis são considerados mais susceptíveis a mastocitomas e com tumores de altos graus. Labrador Retrievers tendem a terem mastocitomas mais agressivos e 41% dos

Golden Retrievers em um estudo desenvolveram mastocitomas primários múltiplos (MURPHY, 2003).

2.2.4.5 Outros indicadores

Outras maneiras de examinar mastocitomas têm sido usadas para tentar prever seu comportamento, mas nenhuma delas é mais eficiente que a atual classificação histomorfológica.

Coloração por AgNORs podem ser usadas (KRAVIS et al., 1996). A quantificação das regiões organizadoras (NORs, em inglês Nucleolar Organizer Regions) por meio de técnicas argirofílicas (AgNORs) baseia-se na impregnação da prata em proteínas nucleares. A presença destas áreas está relacionada com a habilidade proliferativa do tumor. Tem sido relatado que mastocitomas de alto grau tem alta contagem de AgNOR (BOSTOCK et al., 1989; ETTINGER et al., 2006). A contagem de AgNOR pode ser feita em células obtidas de citologia de agulha fina.

O PCNA, ou antígeno nuclear de proliferação celular, é uma proteína nuclear que está associada com o ciclo celular, que atua como co-fator para a DNA polimerase. O PCNA é essencial para a síntese de DNA e, conseqüentemente, é considerado um agente intimamente associado à replicação. Em um estudo, PCNA foi significativamente alto em mastocitomas recorrentes versus não recorrentes e em tumores com metástases versus sem metástases (SIMÕES et al., 1994).

Ki-67 é composto de duas subunidades de proteína que estão presentes nas células durante as fases ativas do ciclo celular e ausentes nas outras. Níveis de Ki-67 no núcleo estão relacionados com proliferação celular. Em um estudo, a média do número de núcleos positivos para Ki-67 por 1000 núcleos foi significativamente mais alto em cães que morreram de mastocitomas em comparação com aqueles que

sobreviveram. Para cães com mastocitomas grau II, o número de núcleos positivos para Ki-67 por 1000 núcleos foi significativamente associado com a sobrevida (ABADIE; AMARDEILH; DELVERDIER, 1999; SCASE et al., 2006).

2.2.5 Tratamento

No tratamento dos mastocitomas incluem-se principalmente a ressecção cirúrgica, a radioterapia e a quimioterapia, os quais dependem da localização, do grau histológico e do estadiamento clínico do tumor. (LONDON; SEGUIN, 2003; MURPHY, 2003).

Os tratamentos demonstram ser pouco efetivos para os mastocitomas grau III. A recidiva pode ocorrer num período de seis meses a um ano conforme o seu grau de malignidade e a terapia adjuvante escolhida (PATNAIK et al., 1984; VAIL 1996). Nos mastocitomas de grau III a expectativa de vida do animal no período pós-cirúrgico é de 48 meses (PATNAIK *et al.*, 1984). A taxa de mortalidade varia conforme o grau dos mastocitomas, entretanto, pode-se concluir que 46% dos animais acometidos vêm a óbito dentro de, aproximadamente, 1500 dias (PATNAIK et al., 1984).

2.2.5.1 Cirurgia

O tratamento de escolha para tumores locais bem diferenciados e intermediários é a cirurgia, tendo alto potencial de cura (BOSTOCK, 1973; PAITNAIK et al., 1984; WEISSE; SHOFER; SORENMO, 2002).

A ressecção cirúrgica com margem ampla de três centímetros a partir do nódulo é a terapia de escolha, entretanto, na maioria dos casos torna-se incompleta, já que os mastocitomas são extremamente infiltrativos. Portanto dois aspectos são importantes: o primeiro é checar com o patologista se há evidência que as margens estão livres de células tumorais; o segundo é fazer associação da cirurgia com radioterapia e/ou quimioterapia (GRAHAN; O'KEEFE, 1994).

2.2.5.2 Radioterapia

Radioterapia de um grande tumor geralmente não compensa, podendo causar degranulação e sinais clínicos associados à radiação e não erradicar todo o tumor. É recomendado para livrar as margens de possíveis células tumorais residentes (FRIMBERGER et al., 1997; LADUE et al., 1997).

2.2.5.3 Quimioterapia

A quimioterapia é recomendada para mastocitomas não ressecáveis ou parcialmente excisados em cirurgia (GRAHAN; O' KEEFE, 1994, VAIL, 1996). Entre as mais utilizadas estão os antineoplásicos alcalóides da vinca (VAIL, 1996), a prednisona e a vimblastina (THAMM; MAULDIN; VAIL, 1999).

Há vários estudos dos usos de vários protocolos quimioterápicos: ciclofosfamida, vincristina e prednisolona com ou sem hidroxiuréia; Lomustina (CCNU); vinblastina e prednisolona. Algumas associações têm sido estudadas e descritas, tais como: "VCHP" – vincristina, ciclofosfamida, hidroxiuréia e predinisona (GERRISTSEN et al., 1998); a doxorubicina associada à predinisona

(GERRISTSEN et al., 1998); a prednisolona (ROGERS, 1993). Durante a utilização do protocolo de tratamento conhecido como "COP" (ciclofosfamida, vincristina e prednisona) é relatado a remissão do tumor em cães refratários ao tratamento com glicocorticóides isolados (GRAHAN; O'KEEFE, 1994; HAN; RICHARDSON, 1995; VAIL, 1996). Vinblastina e prednisolona estão sendo investigadas como terapia adjuvante em cães com micro metástases ou com mastocitomas pobremente diferenciado com alta chance de metástase (THAMM; MAULDIN; VAIL, 1999).

2.2.5.4 Outros tratamentos

Na literatura, a utilização de água destilada, aplicada no local da excisão cirúrgica do mastocitoma, age como agente hipo-osmótico e conseqüentemente, provocando a lise da célula tumoral. Inicialmente, esse tratamento foi realizado *in vitro* nas células P-815 de mastocitoma murino (GRIER et al., 1990) e posteriormente, em cães como terapia complementar a cirurgia (GRIER et al., 1995). Após um ano de cirurgia, a taxa de recidiva verificada neste estudo foi de 26,2% para os tumores graus I, II e III associados à injeção de água destilada e de 52,6% naqueles que foram somente excisados cirurgicamente.

2.3 CULTURA DE CÉLULAS ANIMAIS

Dadas as condições apropriadas, a maior parte das células animais pode viver, multiplicar-se e até mesmo expressar propriedades diferenciadas em uma placa de cultura de tecidos. As células podem ser observadas sob o microscópio ou analisadas bioquimicamente, e os efeitos da adição ou remoção de moléculas específicas. Além disso, em uma cultura mista, as interações entre os vários tipos de células podem ser estudadas. Experimentos com células oriundas de cultura são, às vezes, ditos como tendo sido conduzidos *in vitro* para contrastá-los daqueles experimentos com organismos intactos, os quais são referidos como conduzidos *in vivo* (ALBERTS et al., 1997).

A cultura de tecidos começou com um experimento designado para resolver uma controvérsia em neurobiologia. A hipótese examinada era conhecida como *doutrina do neurônio*, que estabelece que cada fibra nervosa é o produto de uma única célula nervosa e não o produto da fusão de muitas células. Para testar esta controvérsia, pequenos pedaços da medula espinhal foram colocados sobre fluidos de tecido coagulado em uma câmara úmida e morna, e observados ao microscópio a intervalos regulares de tempo. Após um ou mais dias, células nervosas individuais puderam ser vistas alongando-se para dentro do coágulo. Assim a doutrina do neurônio foi confirmada, e as bases para a revolução da cultura de células foram assentadas (ALBERTS et al., 1997).

Os experimentos originais envolveram a cultura de fragmentos pequenos de tecidos, ou explantes. Atualmente, culturas são mais comumente feitas a partir de suspensão de células dissociadas de tecidos usando na maioria das vezes colagenase para desagregação enzimática (FRESHNEY, 1990).

Ao contrário das bactérias, a maior parte das células de tecidos não estão adaptadas para viverem em suspensão e necessitam de uma superfície sólida para crescerem e dividirem-se, que é agora usualmente a superfície plástica de uma

placa de cultura de tecidos. Entretanto, as células variam em seus requerimentos, e algumas não crescerão ou se diferenciarão a menos que a placa seja coberta com componentes específicos da matriz extracelular, tais como colágeno ou laminina e no caso dos mastócitos, uma camada de fibroblastos (FRESHNEY, 1990).

Culturas preparadas diretamente de tecidos de um organismo, com ou sem um passo inicial de fracionamento das células, são chamadas culturas primárias. Tais células apresentam freqüentemente muitas propriedades diferenciadas apropriadas a sua origem: fibroblastos continuam a secretar colágeno; células derivadas de músculo esquelético embrionário fusionam-se para formar fibras musculares gigantes, que contraem espontaneamente na placa de cultura; células nervosas lançam axônios que são eletricamente excitáveis e fazem sinapse com outra célula nervosa; e células epiteliais formam extensivas lâminas com muitas das propriedades de um epitélio intacto. Como tais fenômenos ocorrem em cultura, eles são acessíveis para estudar eventos que não são possíveis de serem estudados em tecidos intactos (DEBERGH; READ, 1991).

Até o início dos anos 70, cultura de tecidos era alguma coisa entre uma mistura de ciência e bruxaria. Apesar de fluidos de grumos de tecidos terem sido substituídos por placas com meios líquidos contendo quantidades específicas de moléculas pequenas, como sais, glicose, aminoácidos e vitaminas, a maioria dos meios também incluía uma mistura pobremente definida de macromoléculas, na forma de soro de cavalo ou soro fetal de bezerro ou um extrato cru preparado de embriões de pinto. Tais meios são ainda hoje utilizados para a maioria dos cultivos rotineiros de células, mas eles dificultam o conhecimento de quais macromoléculas específicas são necessárias para cada tipo de célula se desenvolver e funcionar normalmente (FRESHNEY, 1990).

Esta dificuldade levou ao desenvolvimento de vários meios *sem soro*, *meios quimicamente definidos*. Além das pequenas moléculas usuais, tais meios definidos contêm uma ou mais proteínas específicas que a maioria das células necessitam para sobreviver e proliferar em cultura. Estas incluem fatores de crescimento, que

estimulam a proliferação celular, e *transferina*, que transporta ferro para dentro das células. Muitas das moléculas sinalizadoras protéicas extracelulares, essenciais para a sobrevivência, desenvolvimento, e proliferação de tipos específicos de células têm sido muito facilitada pela disponibilidade de meios quimicamente definidos, sem soro (FRESHNEY, 1990).

A maioria das células de vertebrados morre após um número finito de divisões em cultura. Células da pele humana, por exemplo, duram por vários meses em cultura, dividindo-se apenas 50 a 100 vezes antes de morrerem (DEBERGH; READ, 1991). Tem sido sugerido que este limite de tempo de vida está relacionado com o limite de tempo de vida do animal do qual a célula se derivou. Entretanto, ocasionalmente, algumas células em cultura sofrerão uma mudança genética que as tornem efetivamente imortais. Tais células se proliferarão indefinidamente e poderão ser propagadas como uma linhagem de células (DEBERGH; READ, 1991).

As linhagens de células podem também ser preparadas a partir de células cancerígenas, mas elas diferem de várias formas, daquelas preparadas a partir de células normais. Por exemplo, as linhagens de células cancerígenas freqüentemente crescem sem se fixarem a uma superfície, proliferam-se em densidades muito mais altas em placas de cultura. As linhagens de células podem freqüentemente causar tumores se injetadas em um animal suscetível. As linhagens de células são extremamente úteis na pesquisa celular, como fonte de grandes quantidades de células de um tipo uniforme, especialmente por poderem ser estocadas em nitrogênio líquido a -196°C , por um período indefinido e continuarem viáveis, quando descongeladas (FRESHNEY, 1990).

2.3.1 Cultura de Células de Mastocitoma

Há uma variedade de linhagens de mastocitoma murino descrito em literatura e uma das mais utilizadas para experimentação é a linhagem P-815, estabelecida por Dunn e Potter (1957). Tais células foram originadas de mastocitoma cutâneo de camundongo DBAf/2 induzido pelo carcinógeno químico metilcolantreno (BARSUMIAN et al., 1985).

Existem linhagens estabelecidas de células de mastocitomas caninos, mas não estão comercialmente disponíveis. De Vinney e Gold (1990) estabeleceram com sucesso duas linhagens de células de mastocitoma canino cutâneo em cultura permanente *in vitro* (C1 e C2) e Ishiguro et al. (2001) estabeleceram uma nova linhagem a partir de uma mastocitoma de mucosa oral. Essas linhagens ficam em cultura contínua por mais de 1 ano e serve como fonte permanente de estudos. Segundo Cobb (1975) mastócitos obtidos de um mastocitoma canino podem ser mantidos em cultura celular por um período de até 11 semanas com viabilidade maior de 90% (LAZARUS et al., 1986).

2.4 TESTE DE QUIMIOSENSIBILIDADE

A pesquisa de novos agentes quimioterápicos contra o câncer envolve estudos pré-clínicos *in vitro* (FRUEHALF; BOSANQUET, 1993). Testes *in vitro* ajudam a prever os efeitos de drogas antineoplásicas (GRIFFIN et al., 1983). Muita atenção tem sido dada ao teste de quimiosensibilidade *in vitro* para melhorar os resultados atuais da citotoxicidade da quimioterapia e para adotar uma base racional para a seleção da droga (VERNON et al., 1985).

Os protocolos clínicos atualmente usados para terapias são obtidos principalmente empiricamente ou na base dos resultados das experimentações clínicas precedentes. A informação obtida dos protocolos clínicos é inestimável, mas consome tempo, é cara e não fornece dados dos mecanismos bioquímicos e moleculares das drogas usadas em tratamentos (ZOLI et al., 2001).

Vários métodos têm sido desenvolvidos desde 1950 para determinar, *in vitro*, a sensibilidade de células de tumores humanos frente a várias drogas antineoplásicas (BIRD et al., 1987; BLACK; SPEAR, 1953; SONDAK et al., 1984). O advento de um teste *in vitro* seguro tem aumentado a possibilidade de selecionar agentes antineoplásicos mais efetivos para serem usados sozinhos ou em combinação, para o tratamento individual dos pacientes com tumores. Neste sentido, a identificação de agentes com baixa probabilidade de resposta, torna possível eliminar seu uso como um agente quimioterápico e prevenir as suas reações adversas (FRUEHALF; BOSANQUET, 1993).

A grande maioria dos protocolos de quimioterapia para os tumores caninos são desenvolvidos a partir dos protocolos utilizados nos humanos, adequando-se a concentração e tempo de exposição, gerando vários problemas, na sua grande maioria, das reações adversas, da sub ou super dosagem.

Fruehalf e Bosanquet (1993) revisaram a correlação entre os resultados dos testes de sensibilidade *in vitro* e a resposta do tumor a quimioterapia e, em geral, encontraram sensibilidade maior que 85% e especificidade maior que 80%.

A maioria das técnicas dos testes de quimiosensibilidade *in vitro* usa métodos similares (figura 3). Tumores sólidos são desagregados em suspensões de massas multicelulares com tesouras e passando os fragmentos por tela ou adicionando-se colagenase ao tecido (VON HOFF et al., 1999; CLARK; VON HOFF, 1984). A relação das células que cresceram sobre as que não cresceram, gera um índice de atividade da droga (FRUEHALF; BOSANQUET, 1993). Estudos do Instituto Nacional do Câncer e do Grupo de Oncologia do Sudoeste dos Estados Unidos indicam que este teste é reproduzível em vários laboratórios (CLARK; VON HOFF, 1984).

A confiabilidade das mais novas tecnologias para testes de quimiosensibilidade *in vitro* sugere que tais testes podem ajudar o clínico a evitar os pacientes à exposição da toxicidade das drogas com poucos benefícios clínicos (FRUEHALF; BOSANQUET, 1993).

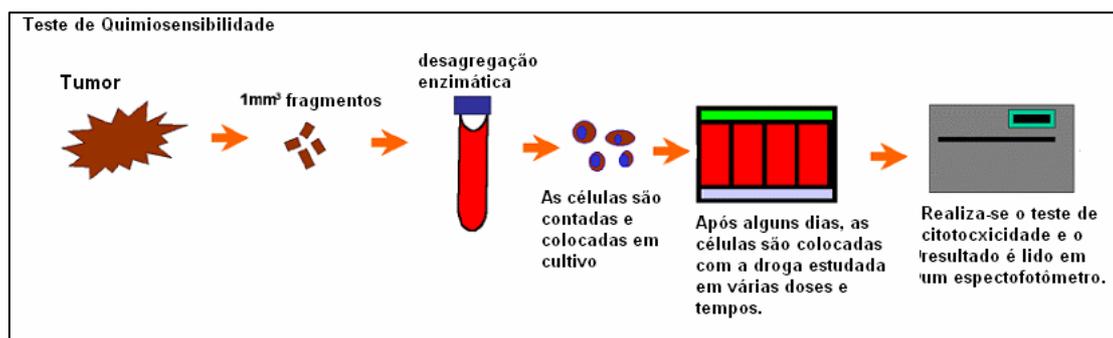


Figura 3 - Esquema representando um teste de quimiosensibilidade

2.4.1 MTT

Vários ensaios biológicos necessitam medir as células vivas e/ou as que estão proliferando. Isto pode ser obtido através de várias técnicas (MOSMANN, 1983).

O teste de MTT foi originariamente desenvolvido por Mosmann (1983) e é o mais comumente utilizado para medir a quimiosensibilidade de um tumor a uma droga (ULUKAYA; COLAKOGULLARI; WOOD, 2004).

O teste de MTT determina a habilidade de células viáveis converterem um sal tetrazolium solúvel (amarelo), o composto MTT(3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolium brometo) em um precipitado formazan insolúvel (roxo) através da clivagem de um anel por mitocôndrias ativas (MOSMANN, 1983). A formação de formazan é positivamente relacionada com o número de células viáveis na cultura (ULUKAYA; COLAKOGULLARI; WOOD, 2004). O teste é realizado em placas de 96 poços e a leitura é realizada em leitor de ELISA. Conseqüentemente, quanto maior o número de células viáveis, maior será a absorbância registrada (MOSMANN, 1983).

O teste de MTT é um método colorimétrico rápido e quantitativo que é frequentemente utilizado com segurança em testes *in vitro* de “screening” de drogas assim como customizar terapias individuais (ULUKAYA; COLAKOGULLARI; WOOD, 2004).

2.5 ÁCIDO RETINÓICO

2.5.1 Origem

Os retinóides são derivados naturais da vitamina A ou retinol e incluem o ácido retinóico todo trans, o 9-cis e o 13-cis (ATRA, 9cRA e 13cRA, respectivamente). A vitamina A pode ser obtida da dieta de produtos animais, incluindo produtos lácteos, ovos e peixes, ou do processamento da pró-vitamina β caroteno, qual é encontrada em vários vegetais (ZUSI; LORENZI; VIVAT-HANNAH, 2002).

O ATRA é o principal retinóide natural do corpo, mas uma grande variedade de retinóides sintéticos com funções específicas tem sido gerada para se estudar as mais variadas propriedades biológicas destes compostos (ZUSI; LORENZI; VIVAT-HANNAH, 2002).

2.5.2 Metabolismo

A síntese de ATRA, o principal derivado biologicamente ativo da vitamina A, envolve a oxidação irreversível do retinol em células alvo (HAYDEN, 2001; NAPOLI, 1996; ZUSI; LORENZI; VIVAT-HANNAH, 2002).

Após ser absorvido na mucosa intestinal, retinol é esterificado a ésteres de retinil antes de entrar na via linfática e ser transportado pelo sangue em quilomícrons, para ser captado e estocado no fígado. Após mobilização – pela quebra dos ésteres de retinil, o retinol é oxidado a retinal e ácido retinóico (AR).

Uma pequena proporção do retinol do plasma e do tecido (0,2-5%) é convertida ao ácido retinóico *todo-trans* (ATRA), o principal ativador dos receptores de ácido retinóico (RARs) (ALTUCCI; GRONEMEYER, 2001).

2.5.3 Mecanismo de Ação

O sinal do retinóide é mediado nas células alvo através dos receptores de ácido retinóico (RAR) e receptores X retinóides (RXR), cada qual com seus isotipos designados por α , β e γ (CHAMBON, 1996). RARs e RXRs são diferentes quanto sua especificidade de ligantes: ATRA pode se ligar e ativar apenas receptores RAR, com afinidade similar para os três isotipos. Entretanto, 9cAR se liga e ativa tanto RARs e RXRs e todos seus isotipos, mas com afinidades diferentes (ALLENBY et al., 1993).

Os RARs e RXRs são fatores de transcrição que agem predominantemente como heterodímeros RAR-RXR, modulando positivo ou negativamente programas genéticos específicos. Na ausência de ligantes RARs ou na presença de certos antagonistas RAR, os heterodímeros RAR-RXR se ligam a específicos elementos responsivos do DNA e formam complexos multiproteicos com co-repressor e histonas deacetilases (HDACs), resultando na deacetilação, condensação da cromatina e silenciando a transcrição dos genes. Agonistas que se ligam a RAR desligam o complexo co-repressor e permitem a transcrição (ALTUCCI; GRONEMEYER, 2001; ZUSI; LORENZI; VIVAT-HANNAH, 2002).

2.5.4 Funções Biológicas

Os ácidos retinóicos (ARs) são moléculas de sinalização que estabilizam as comunicações genéticas, que são essenciais para o desenvolvimento embrionário. Mas eles têm também importante função fisiológica particularmente no cérebro, pele, pulmão, fígado, sistema imune e reprodutivo e no crescimento celular, diferenciação e morte (ALTUCCI; GRONEMEYER, 2001)

Sporn e Roberts (1983) reconheceram que durante a deficiência de retinóides existe uma falha na maturação das células e isto é acompanhado pelo aumento da proliferação das mesmas. Segundo Katayama et al. (1995), o ácido retinóico é capaz de estimular a biosíntese de colágeno e elastina, justificando seu uso em desordens da pele. Ishida et al. (2003), relatou que o retinol e seus derivados agem como fator circulante regulador do crescimento de mastócitos humanos.

2.5.5 Atividade Antineoplásica

Devido à habilidade em controlar a diferenciação e proliferação celular, tem-se um considerável interesse em estudar o efeito do ácido retinóico sobre a carcinogênese.

A ação antineoplásica da vitamina A foi verificada pela primeira vez na década de 60 em ratos com carcinoma pulmonar experimental. Desde então, inúmeros estudos em cultura de células ou modelo animal vêm confirmando este efeito (GÜZEY et al., 1998; LAM et al., 2001; SEMENIUK et al., 2001). Além disso, uma variedade de ensaios clínicos tem avaliado a atividade do AR em doenças

hematológicas malignas (CASTAIGNE et al., 1990) e também em tumores sólidos epiteliais (HJERTSON et al., 2003).

Vários fatores podem contribuir para a tumorigênese, incluindo modificações genéticas inerentes e adquiridas, rearranjos cromossomais, fenômenos epigenéticos e carcinogênese química. Os ácidos retinóicos interferem com estes eventos em vários níveis. Sua principal ação conhecida é a indução da diferenciação e/ou apoptose das células tumorais, e inibição da promoção na carcinogênese química. Junto com sua habilidade de regular o crescimento e induzir a diferenciação, os retinóides afetam o crescimento de várias linhagens tumorais em cultura (ALTUCCI; GRONEMEYER, 2001).

Os retinóides têm sido extensivamente utilizados como agente quimiopreventivo para carcinogênese da pele (HANSEN et al., 2000).

Retinóides são tanto nossos amigos como nossos inimigos. As ações pleiotrópicas e seu poder de induzir as células para diferenciação e morte é uma grande promessa para a terapia do câncer, e seus efeitos benéficos da terapia de diferenciação baseada nos retinóides tem sido intensivamente mostrado no caso da leucemia promielocítica aguda (APL). Mas ARs também possuem um poderoso efeito teratogênico e, além disso, existe a síndrome do ATRA que ocorre em 10-15% dos pacientes e é fatal em pelo menos 10% destes. Os sinais clínicos desta síndrome incluem febre, ganho de peso, edema das extremidades, efusão pleural ou cardíaca, hipotensão e falência renal. Na maioria das vezes, estes sinais são precedidos pelo aumento de número de leucócitos (ALTUCCI; GRONEMEYER, 2001).

O efeito dos retinóides na terapia do câncer pode ser potencializado através da combinação destes com agentes específicos com diferentes modos de ação, resultando em um sinergismo da atividade antineoplásica. Alguns possíveis candidatos para a combinação de terapias incluem agentes citotóxicos como o paclitaxel, ou terapias mais modernas como os inibidores de arginina e lisina

metiltransferases, receptor de tirosina quinase ou agentes pró-apoptóticos (ZUSI; LORENZI; VIVAT-HANNAH, 2002).

Há poucos estudos dos efeitos dos retinóides em neoplasias caninas. Há estudos com linhagens caninas de osteossarcomas e melanomas (HONG et al., 2000a; 2000b; OHASHI et al., 2001). As células de osteossarcomas mostraram uma inibição significativa do crescimento na dose de 10^{-5} M, mas não foram vistos efeitos com as células de melanoma (BORROGA et al., 1998).

Recentemente foi relatado que os retinóides induzem a inibição do crescimento de linhagens de mastocitomas canino devido, em parte, pela apoptose (OHASHI et al., 2006).

Miyagima et al. (2006) relataram que, por meio da análise de reação de RT-PCR (reação em cadeia de polimerase em tempo real), 5 de 9 amostras de tecidos de mastocitomas caninos, mostraram alta expressão do receptor RAR alpha (MIYAGIMA et al., 2006).

Segundo Katayama et al. (1995), o ácido retinóico regula a expressão de mRNA do ligante c-kit (SCF) de queratinócitos, o qual está envolvido do desenvolvimento dos mastocitomas.

O conhecimento acumulado do mecanismo molecular e das ações farmacológicas dos retinóides serve de base para o desenvolvimento de terapias antineoplásicas mais eficientes, como foi o caso de sucesso do tratamento da APL com ATRA. Os retinóides são obviamente compostos que irão aumentar nosso arsenal na luta contra o câncer e por isso resolvemos testá-lo para os mastocitomas caninos, uma neoplasia tão incidente nos dias de hoje.

3 OBJETIVOS

- Estabelecer a cultura primária de mastocitomas caninos graus I, II e III.

 - Avaliar a sensibilidade dos mastocitomas caninos de graus I, II e III ao ácido retinóico *todo-trans*.
-

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MEIO DE CULTURA

Para a realização dos experimentos foi utilizado o meio RPMI-1640 (Gibco Invitrogen), suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (Gibco, Invitrogen) contendo antibiótico/antimicótico (100 - 200 U/mL de penicilina; 100 – 200 µg/ml de estreptomicina; 25 µg/ml de anfotericina B - Gibco®, Invitrogen).

4.2 CÉLULAS

Obtiveram-se células tumorais a partir de fragmentos de mastocitomas de cães provenientes do Serviço de Cirurgia do Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo com diagnóstico prévio de mastocitoma por citologia.

Os fragmentos foram excisados com dimensões proporcionais ao tamanho total do tumor no próprio centro cirúrgico, tomando-se cuidado para manter intactas as margens para avaliação histopatológica e evitando-se retirar a pele. Em seguida, foram colocados em tubos de 50ml (tubos de coleta) contendo meio de cultura (item 4.1).

Os fragmentos foram então cortados em fragmentos ainda menores (aproximadamente 5 mm²) no fluxo laminar (Trox®) em placa de Petri com o auxílio do bisturi e então colocados em solução de colagenase preparado de acordo com o item 4.4. Após essa etapa, as células foram filtradas em uma seringa com gaze

esterilizada e em seguida em um filtro 70 μm de porosidade (Cell strainer - Millipore®). A solução foi centrifugada a 1200 rpm em temperatura ambiente por 10 min, ressuspendidas em meio de cultura e contadas segundo o item 4.3. Apenas no primeiro dia do experimento, utiliza-se a concentração maior de antibiótico/antimicótico.

A confirmação do diagnóstico foi realizada através da técnica de citologia (imprinting) corada com panótico rápido (Laborclin ®) e também em lâmina através da coloração de Giemsa, a qual evidencia os grânulos característicos dos mastócitos.

4.3 VIABILIDADE CELULAR

Após a centrifugação, a viabilidade e o número de células tumorais foram determinados em câmara de Neubauer, com o auxílio do corante vital Azul de Trypan.

4.4 DESAGREGAÇÃO ENZIMÁTICA

Para a desagregação enzimática dos tumores utilizou-se a Colagenase do tipo 1A (Sigma®) na concentração de 100U/ml, dissolvida em meio de cultura, sob agitação à 37°C.

4.5 ESTUFA DE CO₂

As culturas celulares foram acondicionadas em garrafas de cultura e colocados em estufa (Shel Lab®) umidificada com 5% de CO₂, à 37°C.

4.6 PREPARAÇÃO DE COLÁGENO DE CAUDA DE RATO

Duas caudas de rato foram colocadas no etanol a 95% para descongelação. Após separação das fibras brancas de colágeno, estas foram colocadas em solução de ácido acético a 1:1000 em água estéril em um béquer estéril, agitando com uma barra de vidro por 48h a 4°C. A solução foi ressuspensa e colocadas em tubos e centrifugadas. Nas placas de cultura, foi feito um filme com essa solução de colágeno e esterilizadas em UV por 24 horas. As alíquotas restantes foram congeladas.

4.7 COLORAÇÃO POR LARANJA DE ACRIDINA/BROMETO DE EDTÍDIO

As células foram incubadas com solução de marcação com laranja de acridina e brometo de etídio (AO/EB) e analisadas por microscopia de fluorescência. 25 µl de suspensão celular foram incubadas com 1 µl de solução AO/EB (1 parte de 100µg/ml AO em PBS; 1 parte de 100 µg/ml EB em PBS) imediatamente antes. 10 µl desta suspensão foram colocadas em lâmina e coberta com lamínulas e as células apoptóticas ou necróticas foram analisadas por microscopia de fluorescência.

4.8 CITOMETRIA DE FLUXO

Foi utilizado um citômetro de fluxo (Becton Dickinson Immunocytometry System, San Jose, CA, USA) conectado a um computador (Machintosh Apple, CA, USA). Foram adquiridos e analisados 10.000 eventos por meio do software Cell Quest Pro (Becton Dickinson Immunocytometry System).

As subpopulações celulares foram reconhecidas por meio das propriedades de FSC – Forward Scatter e SSC – Side Scatter que avaliam o tamanho e a complexidade interna, respectivamente. A fluorescência do Iodeto de Propídeo (ciclo celular) foi detectada pelo leitor FL-2 (585±42nm).

Para todos os experimentos o aparelho foi calibrado com um tubo branco como controle de refração basal das células.

Para a realização do ensaio de ciclo celular 1.10^6 células (fixadas em etanol 70% por 2 horas ou mantidas em freezer -20° C por até 20 dias) foram lavadas por duas vezes em PBS e centrifugadas por 5 minutos a 1200 rpm. Incubou-se estas células em 200 ul de solução com Iodeto de Propídeo 20 ug/ml, RNase A 200ug/ml, Triton 0,1% v/v diluídos em PBS à temperatura ambiente e protegidos da luz. Após 30 minutos de incubação, procedeu-se a leitura em citômetro de fluxo e posterior análise por meio do Cell Quest Pro. Os dados são expressos em porcentagem de células hipodiplóides, em fase G0-G1 e em fase S-G2-M.

4.9 ÁCIDO RETINÓICO

A solução estoque de ácido retinóico *todo-trans* (Sigma®) foi preparada dissolvendo o ATRA em DMSO na concentração de 40 mg/ml, alíquotados (0,1M)

em microtubos e armazenados protegidos da luz à -20°C. Diluições para os ensaios de quimiosensibilidade foram feitas imediatamente antes do uso com meio de cultura, com uma máxima concentração de DMSO de 0.1%. As concentrações utilizadas foram de 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7} M de ATRA.

4.10 TESTE DE QUIMIOSENSIBILIDADE

As células foram colocadas em placas de 96 poços na densidade de $1 \cdot 10^5$ células por poço. Após 24h, a cada um dos poços foram adicionados 100 μ l, 2x as concentrações das diluições de ATRA (10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7} M). Foram feitas sextuplicatas de cada diluição em diferentes tempos: 24, 48, 72, 96 e 120 horas. O controle recebeu meio e DMSO.

O procedimento utilizado para determinação da quimiosensibilidade foi o baseado na metabolização dos sais de tetrazolium (MTT) (Mosmann, 1983). Após o tratamento das células (item 4.9), foram adicionados a cada poço 20 μ l de MTT (5mg/ml), sendo as placas incubadas em estufa a 37°C e 5% CO₂ por 3 horas. Após a incubação, foram adicionados 100 μ l de solução 0,04N de HCl em isopropanol a cada poço, pipetando-se lentamente os poços para a dissolução dos cristais formados. Uma hora após este tratamento, as placas foram lidas em leitor de ELISA, sob comprimento de onda de 540 nm.

4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados paramétricos foram analisados por meio de uma análise de variância (ANOVA) de uma via seguida do teste de Tukey-Kramer de comparações

múltiplas. Os dados também foram analisados em conjunto por meio de ANOVA de medidas repetidas. Foram consideradas significantes as análises que apresentaram nível de significância $p < 0,05$. Os dados estão expressos como média \pm desvio padrão (Apêndices A e B).

5 RESULTADOS

5.1 CULTURA PRIMÁRIA DE MASTOCITOMAS CANINOS

A cultura primária de mastocitomas caninos de diferentes graus apresentou várias características. Observamos o crescimento de células em cultivo de 12 mastocitomas caninos de graus I, II e III (Figuras 4 a 6).

Após a desagregação enzimática pela collagenase as células foram colocadas em cultura e foi possível observar mastócitos e fibroblastos em sua grande maioria. Porém há também hemáceas, neutrófilos, eosinófilos e linfócitos em menores quantidades. Essas células praticamente desaparecem após 5 dias de cultivo. O número de eosinófilos e neutrófilos variou de acordo com cada animal.

A observação das culturas nos evidenciou que os mastócitos sobrevivem melhor e por mais tempo quando se forma uma monocamada de fibroblastos, no qual os mastócitos se aderem. Esta ligação mastócito-fibroblasto promove uma ativação dos fibroblastos e garante uma maior sobrevivência dos mastócitos. A figura 8 evidencia esta ligação.

Pôde-se notar claramente também que esta co-cultura de fibroblastos com mastócitos produz alguma substância em grande quantidade e que seja, de acordo com a revisão de literatura, colágeno. O meio de cultura se torna altamente viscoso (Figura 9). Observações de cultivo apenas de fibroblastos não apresentaram esta característica. Outra observação importante é que este meio viscoso mantém os mastócitos mais “saudáveis”, pois quando o meio é parcialmente substituído, as células morreram mais facilmente.

Resolveu-se então preparar uma camada de colágeno a partir de cauda de camundongo para avaliar se os mastócitos adquirissem melhores condições para aumentar sua sobrevivência e proliferação, já que a adesão a matriz pode induzir o crescimento. Não obtivemos resultados diferentes com esta técnica (Figura 7).

Não foi observada nenhuma diferença no cultivo de mastocitomas de diferentes graus.

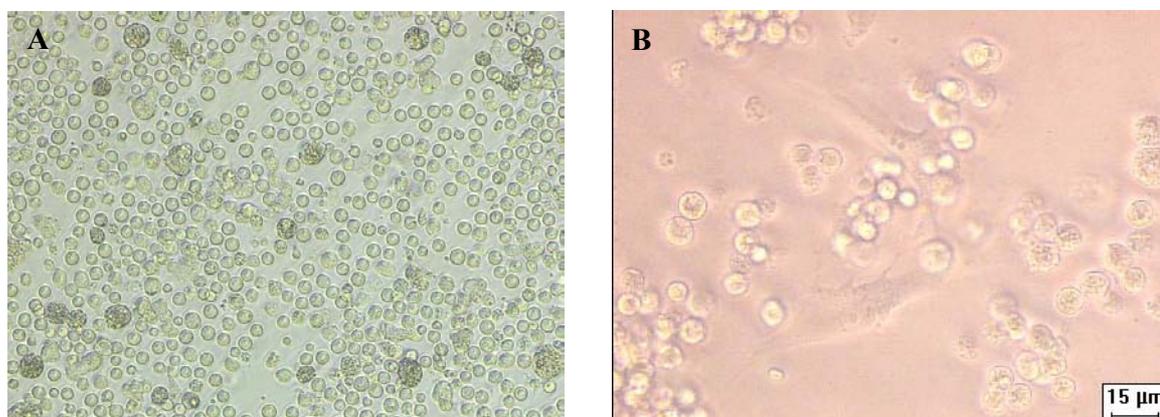


Figura 4 - Fotomicrografias da cultura primária de células de mastocitoma canino grau II. A: Imediatamente após colocar em cultivo 100x. B: **24 horas** de incubação, 200x

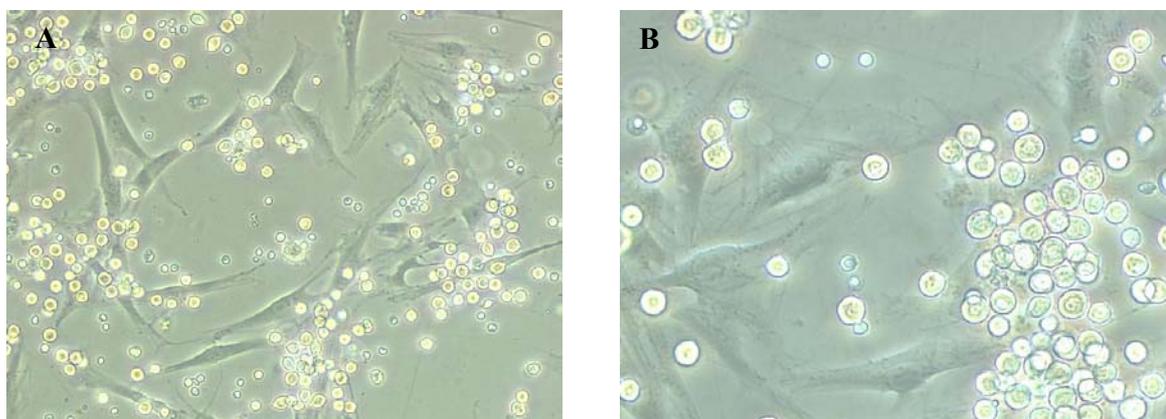


Figura 5 - Fotomicrografias da cultura primária de células de mastocitoma canino grau II, **96 horas** de incubação. A: Vários fibroblastos aderidos, 100x. B: 200X

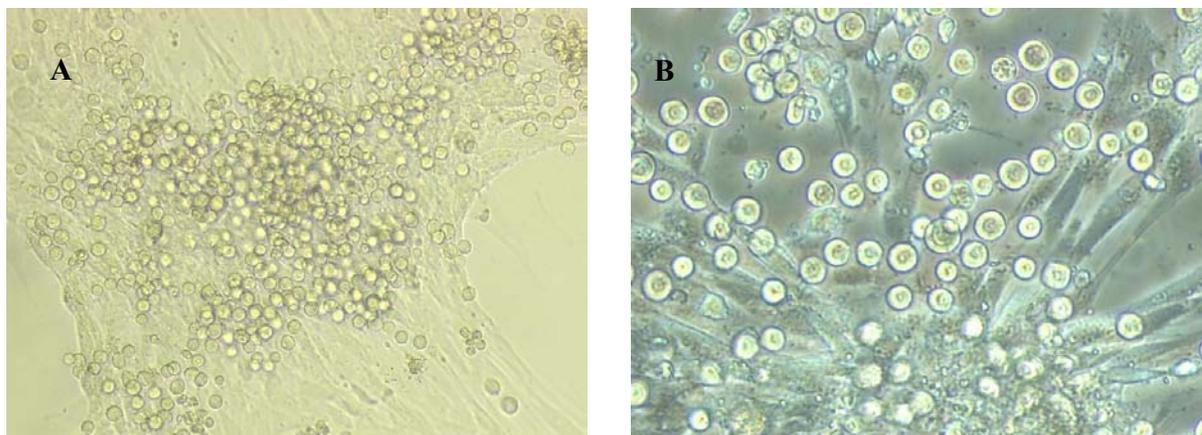


Figura 6 - Fotomicrografias da cultura primária de células de mastocitoma canino grau II, **144 horas** de incubação. A: 200x; B: 400x

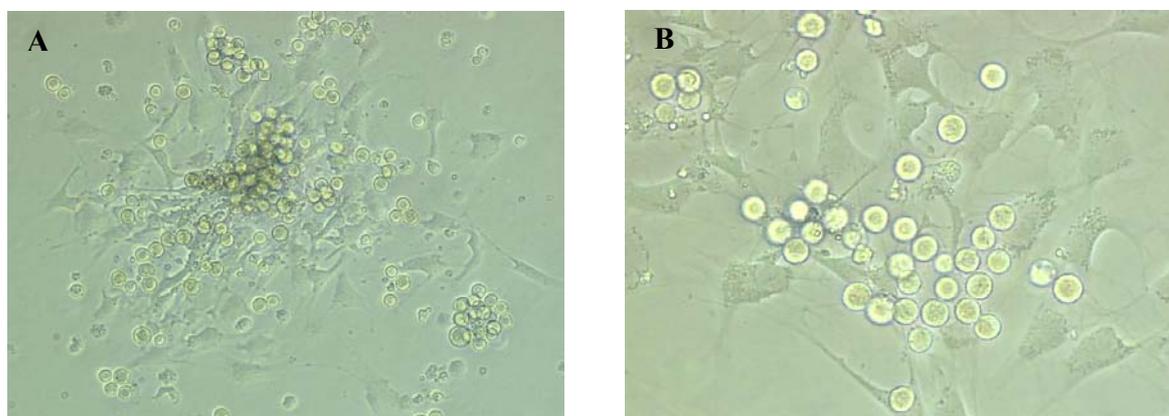


Figura 7 - Fotomicrografias da cultura primária de células de mastocitoma canino grau II **144 horas** de incubação em placas com camada de colágeno. A: 100x. B: 200x

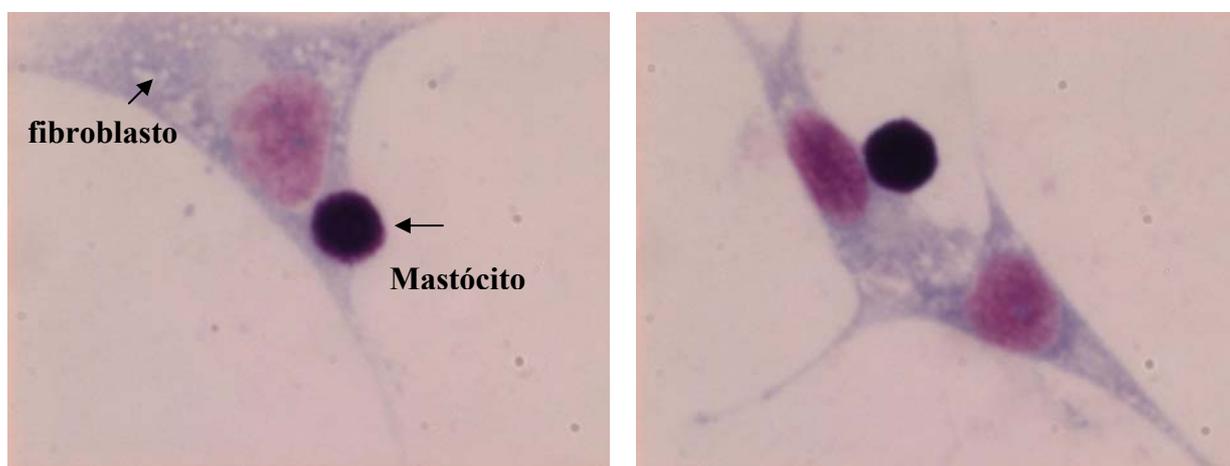


Figura 8 - Fotomicrografia de co-cultura de mastocitoma canino grau II com fibroblastos e mastócitos. Coloração por Panótico Rápido. 400x

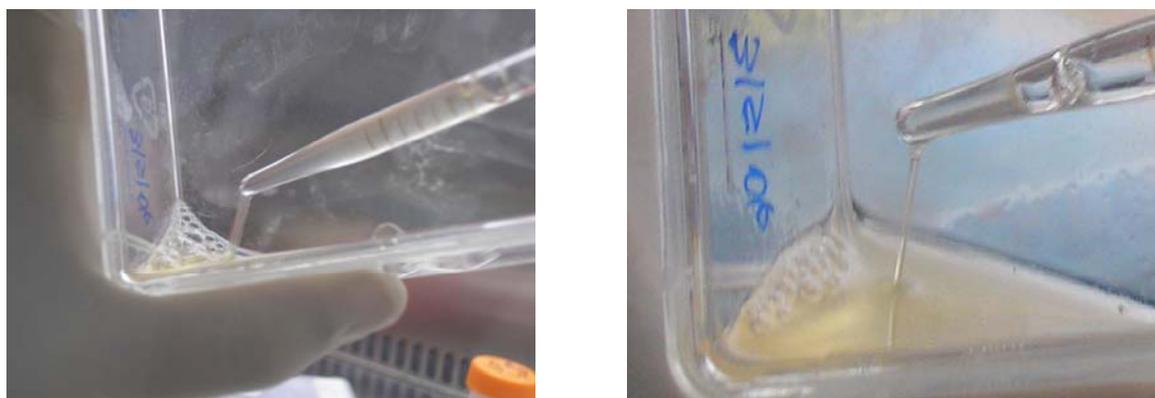


Figura 9 - Fotografias do meio de cultura RPMI-R10 de células de mastocitoma canino grau II após 5 dias de cultivo, evidenciando a alta viscosidade do meio

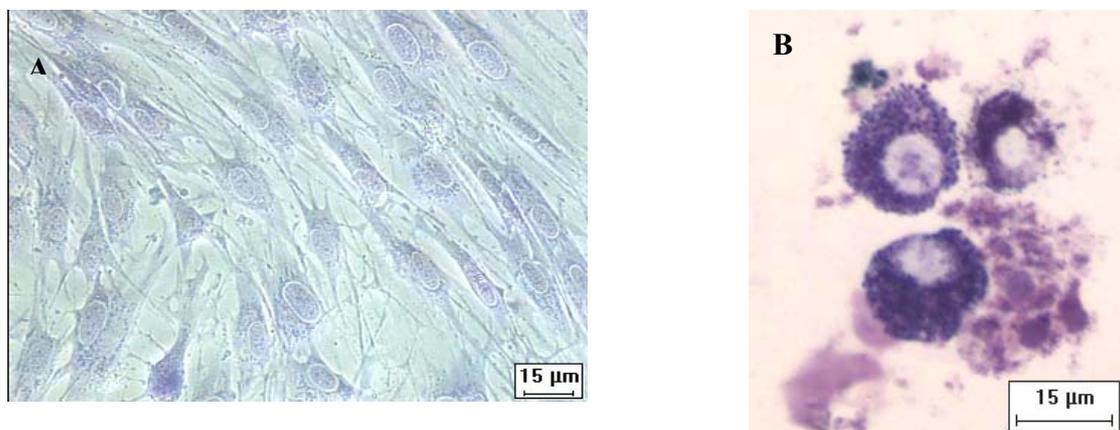


Figura 10 - Fotomicrografias da cultura primária de células de mastocitoma canino grau II, **240 horas** de incubação, coradas com Azul de Toluidina. A: Proliferação de fibroblastos, 200x; B: Mastócitos na cultura. Grânulos de mastócitos corados com Azul de Toluidina, 400x

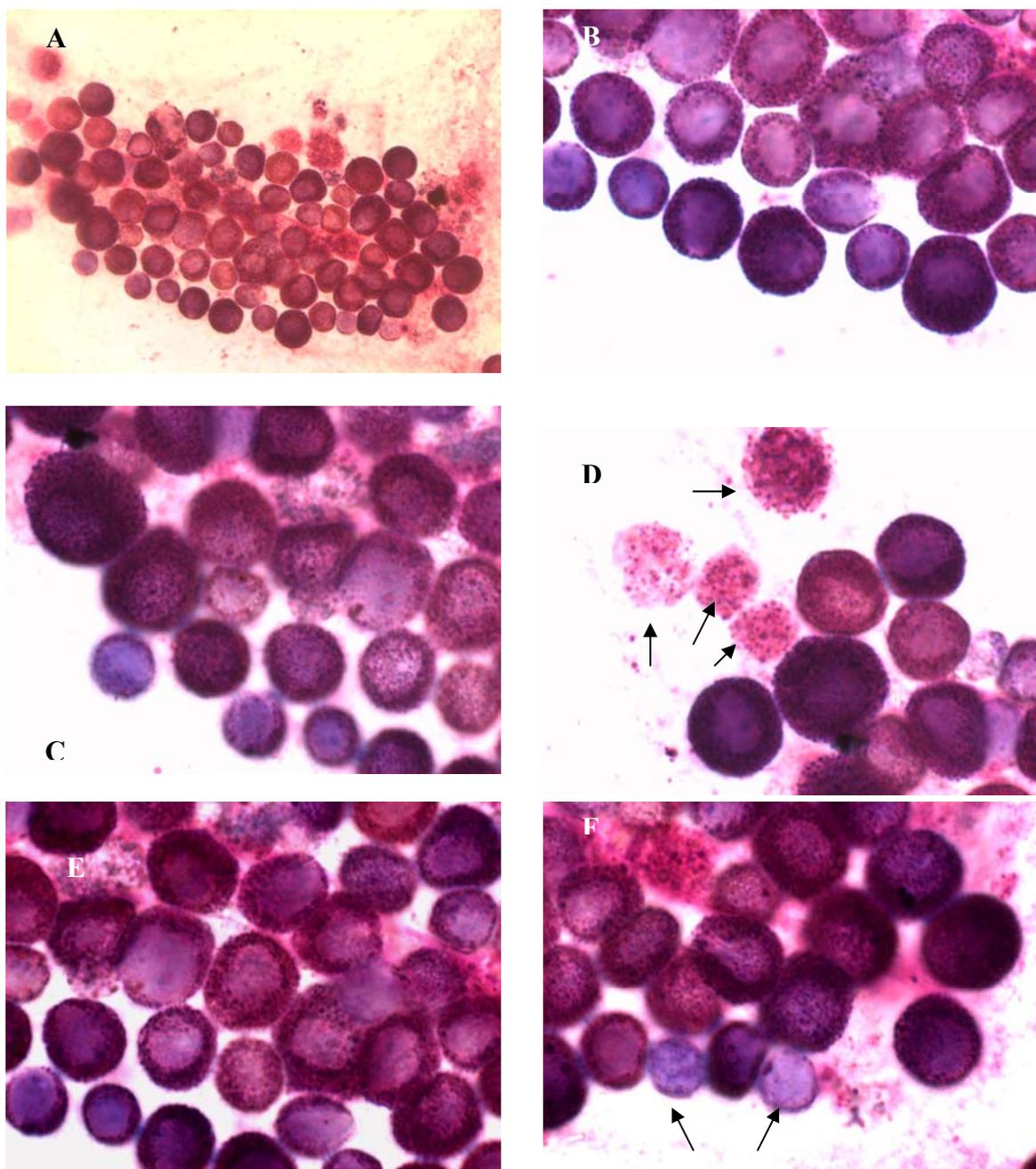


Figura 11 - Fotomicrografias da cultura primária de células de mastocitoma canino grau II **168 horas** de incubação. A – F: Coloração Giemsa concentrado. A: 200x. B – F: 1000x (imersão). D: Setas mostram células mortas. F: Setas mostram mastócitos degranulados

5.1.1 Curva de crescimento

Realizou-se a curva de crescimento através da contagem de células viáveis e porcentagem de células inviáveis pelo corante vital azul de trypan (Figura 12). Pode-se notar um aumento do número de células viáveis no 9º dia de cultivo. Porém esse fato pode ter ocorrido por um possível destaque das células aderidas, pois somente as células em suspensão, após leve agitação, eram retiradas para contagem.

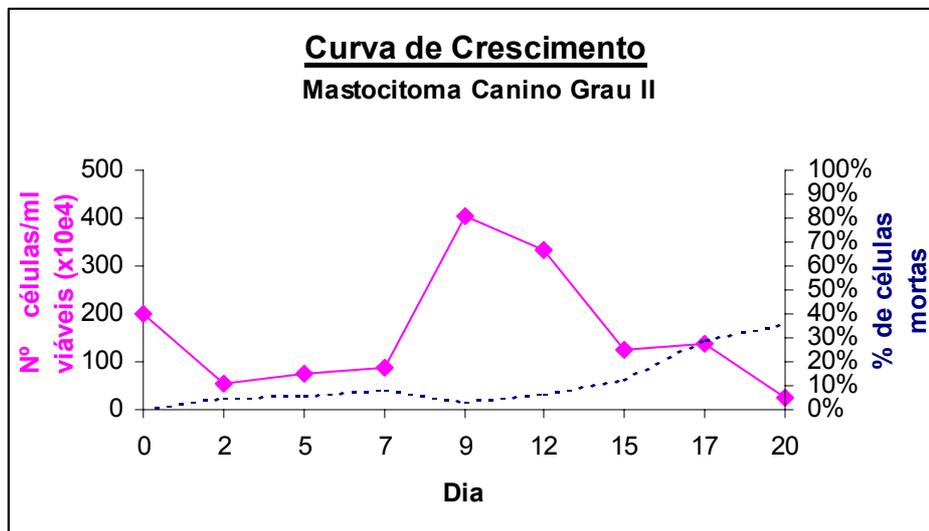


Figura 12: Curva de crescimento das células mantidas em cultura com, sem suplementação de fatores de crescimento, com antibiótico e antimicótico

5.1.2 Citometria de Fluxo

Para melhor caracterizar a cultura primária de mastocitoma canino, realizou-se o citograma. Pode-se visualizar na figura 13 que existem 4 “populações” de células que diferem no tamanho e granulosidade. A cultura é composta principalmente de fibroblastos, que possuem diâmetro e grânulos maiores que os mastócitos; e de mastócitos que variam em diâmetro (8 a 20um) e em granulosidade. Para uma identificação exata, mais experimentos se fazem necessários com uso de anticorpos específicos.

Para verificar se as células estavam em proliferação fez-se a leitura no citômetro após a incubação com iodeto de propídeo. Tentou-se retirar da cultura apenas células em suspensão (correspondente aos mastócitos), o que a figura 14A mostra como uma população mais homogênea, em comparação com a figura 13. A grande maioria destas células (91,68%) estão na fase G0 e apenas 3,21% estão na fase S-G2-M, ou seja, em proliferação. Este fato corrobora com o acompanhamento visual da cultura, mostrando uma pequena proliferação dos mastócitos.

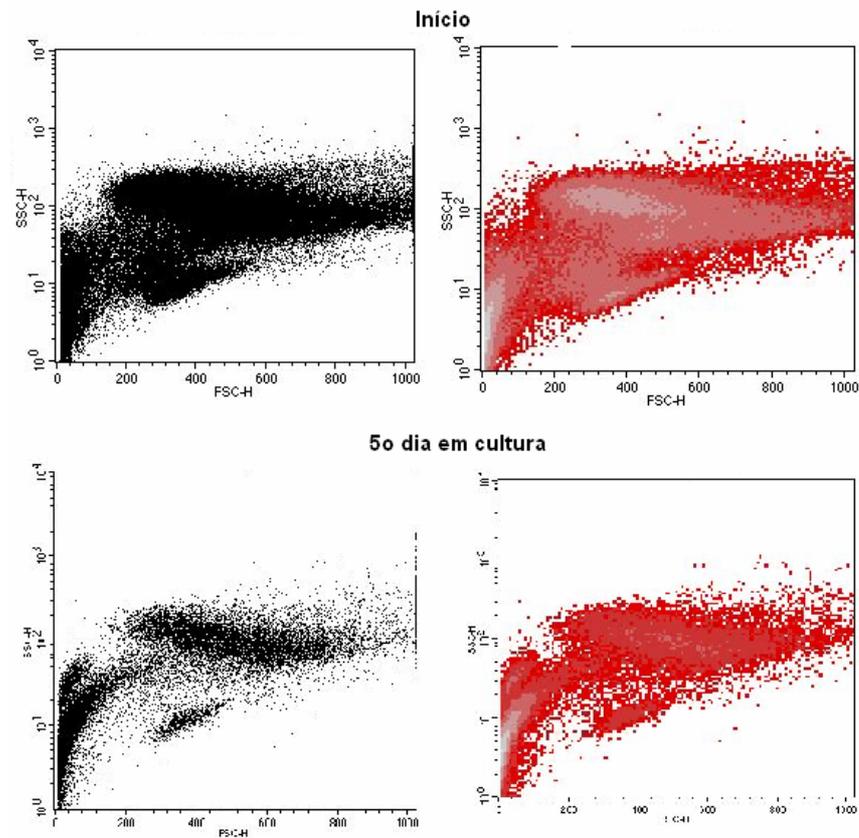


Figura 13 - Citograma de células em cultura de mastocitoma canino grau II, logo no início e após 5 dias de cultivo

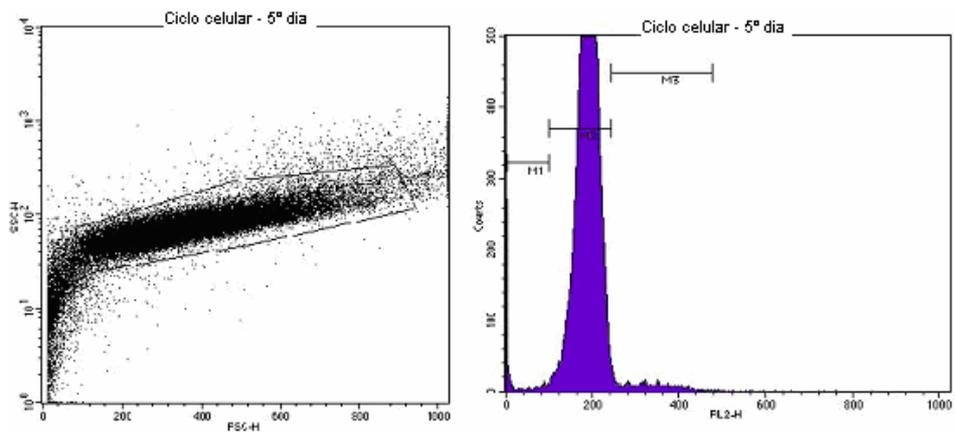


Figura 14 - Citograma de células em cultura de mastocitoma canino grau II, após 5 dias de cultivo, incubadas com Iodeto de propídeo. Os dados são expressos em porcentagem de células hipodiplóides, em fase G0-G1 e em fase S-G2-M. Pode-se observar que a maioria das células (91,68%) se encontra na fase G0

5.1.3 Coloração por Laranja de Acridina/Brometo de Etídio

Para avaliação da morte celular por apoptose, realizamos a técnica de coloração por laranja de acridina/brometo de etídio. Como pode ser visto nas figuras 15 e 16, não há muitas células mortas (núcleo vermelho). Porém alguns grânulos se coram em vermelho com esta técnica. Os núcleos condensados (verde intenso) não podem ser definidos como uma condensação para proliferação ou início de processo de morte celular. Devido a tantas variáveis, esse método não foi consistente para a avaliação qualitativa e quantitativa de morte celular.

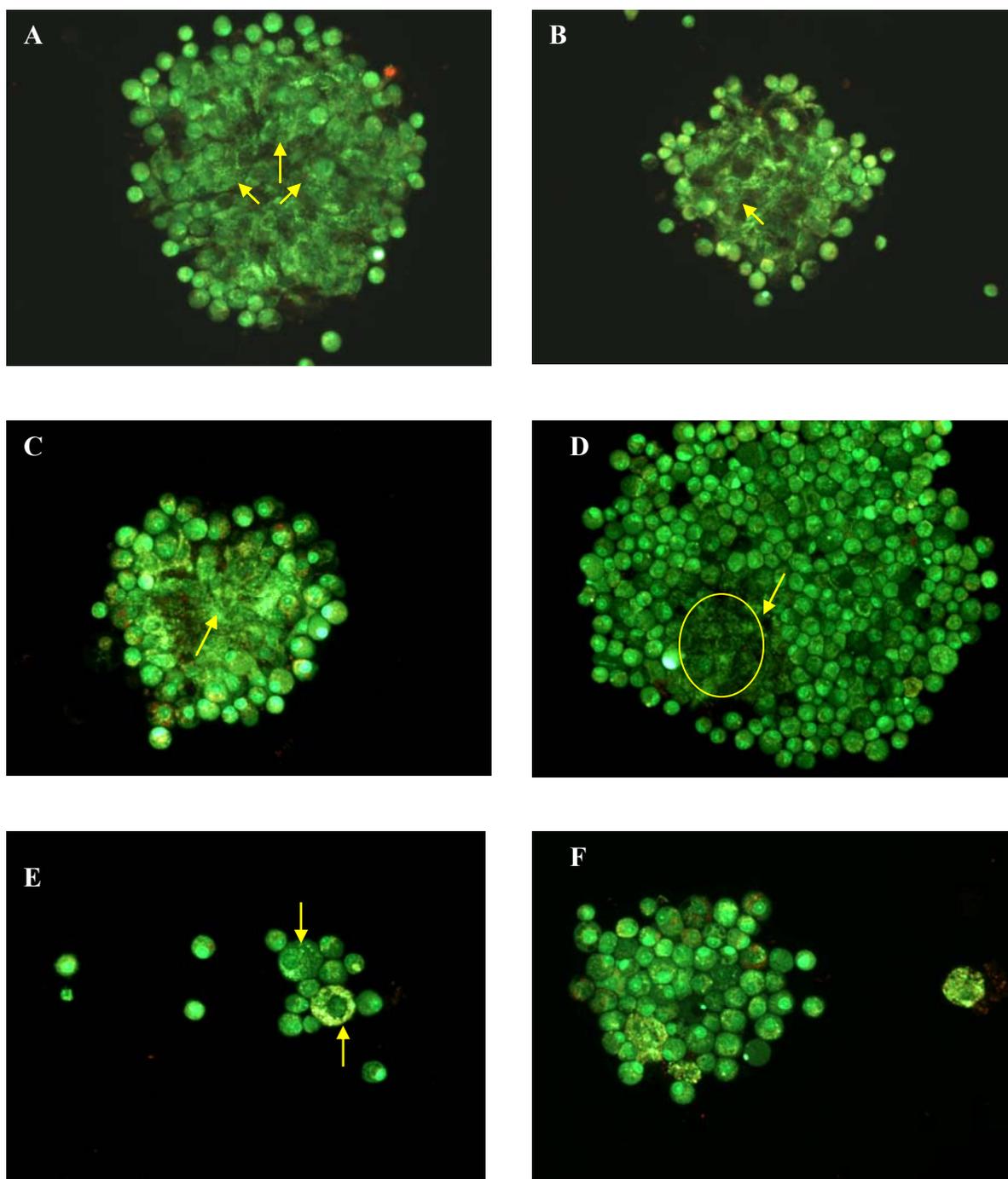


Figura 15 - Fotomicrografias da cultura primária de células de mastocitoma canino grau II **96 horas** de incubação, com marcação de **laranja de acridina e brometo de etídio (AO/EB)** e analisadas por microscopia de fluorescência. A - F: 200x. Setas amarelas indicam fibroblastos marcados. Notem que alguns grânulos dos mastócitos coram em laranja

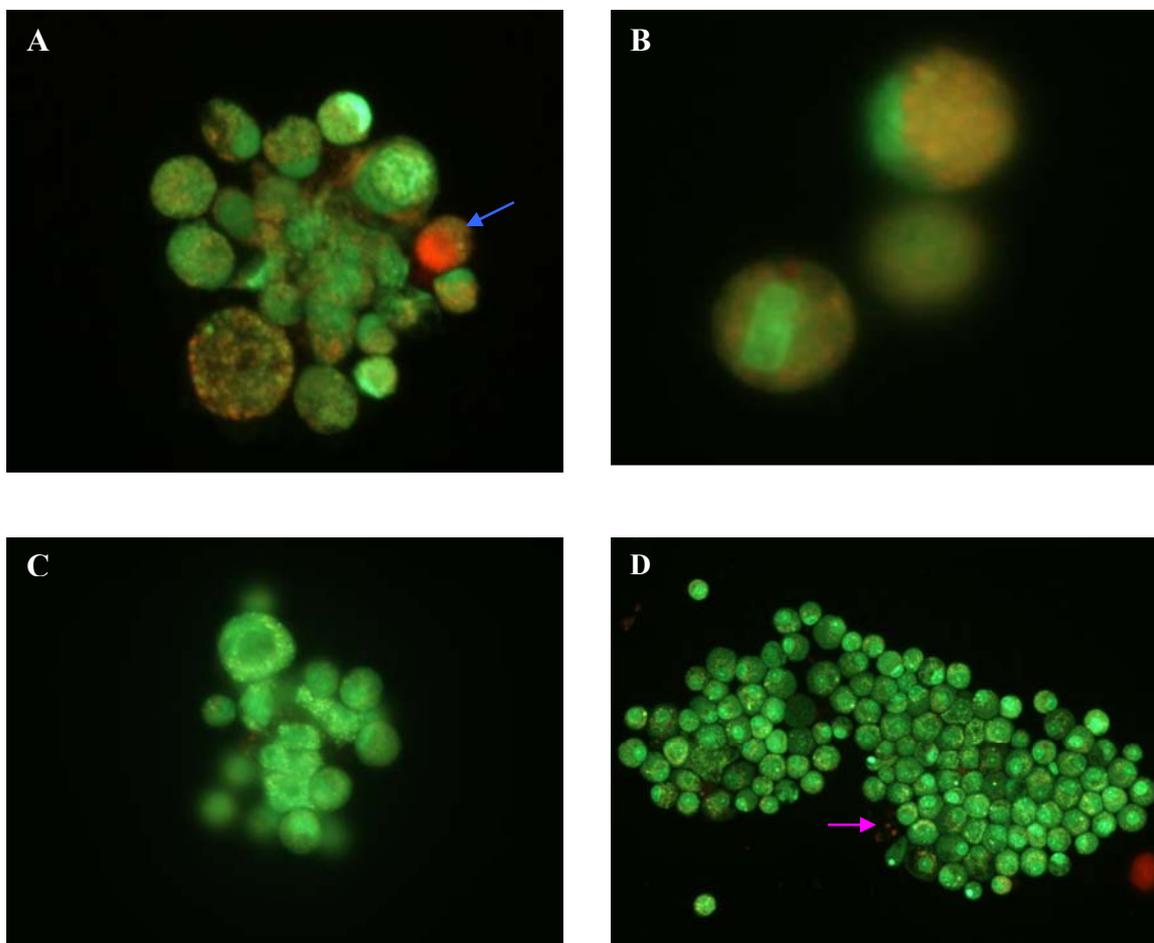


Figura 16 - Fotomicrografias da cultura primária de células de mastocitoma canino grau II **96 horas** de incubação, com marcação de **laranja de acridina e brometo de etídio (AO/EB)** e analisadas por microscopia de fluorescência. A e B: Detalhe aumentado de fotomicrografias em 200x. A: Seta indica célula morta, com núcleo marcado em vermelho. B: Notem os grânulos corados em laranja. C: Foco para fibroblastos; 200x.D: Notem grânulos marcados em vermelho fora das células (seta rosa); 200x

5.2 AVALIAÇÃO DA QUIMIOSENSIBILIDADE AO ÁCIDO RETINÓICO TODO- *TRANS*

Foram realizados 5 testes de quimiosensibilidade ao ácido retinóico *todo-trans* em 4 diferentes animais. Os dados com média e desvio padrão da análise estatística desses experimentos estão no apêndice.

A quimiosensibilidade foi analisada após 24 a 120h. Em alguns casos, não foi possível realizar os testes em todos os tempos devido à baixa quantidade de células obtida do cultivo celular.

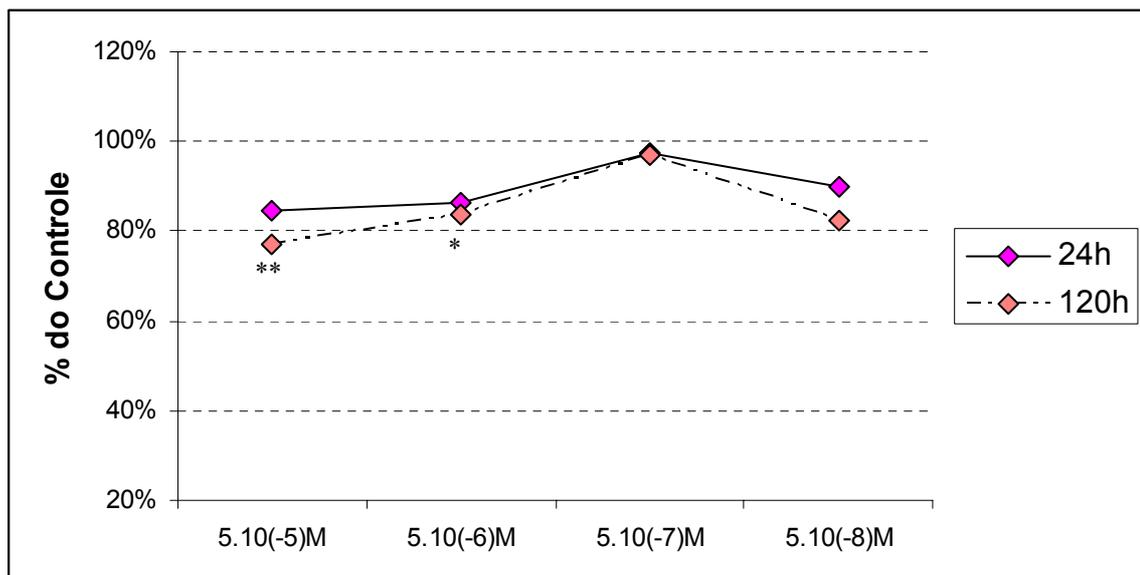
Embora a quimiosensibilidade ao ATRA tenha variado um pouco entre os animais, uma maior sensibilidade foi observada na dose de 10^{-4} M aumentando com o tempo de exposição.

Não foram observadas alterações na morfologia e/ou diferenciação dos mastócitos durante a exposição ao ATRA nas diferentes doses e tempos.

5.2.1 Animal nº. 1

- Cão, fêmea, com 6 anos de idade, da raça Boxer.
- Nódulo em região de membro posterior esquerdo.
- Mastocitoma **grau II**.

Neste experimento foram utilizadas as concentrações de 5.10^{-5} , 5.10^{-6} , 5.10^{-7} , 5.10^{-8} M de ATRA por 24 e 120 horas. O gráfico 1 mostra uma sensibilidade das células de mastocitoma canino grau II ao ATRA estatisticamente significativa após 120h de incubação nas doses de 5.10^{-5} e 5.10^{-6} M.



* $p < 0,05$, em comparação ao grupo controle por ANOVA seguido do teste de Tukey-Kramer

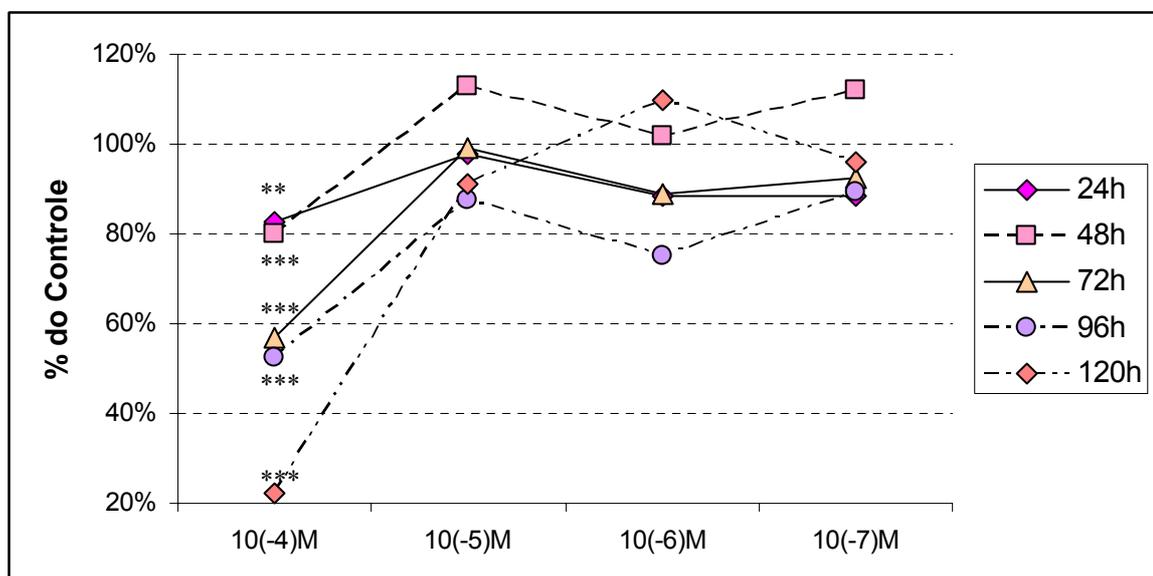
** $p < 0,01$, em comparação ao grupo controle por ANOVA seguido do teste de Tukey-Kramer

Gráfico 1 - Efeito do tratamento com ATRA nas concentrações de 5.10^{-5} , 5.10^{-6} , 5.10^{-7} , 5.10^{-8} M, por 24 e 120 horas em células de mastocitoma canino grau II em cultivo

5.2.2 Animal nº. 2

- Cão, fêmea, com 12 anos de idade, sem raça definida (SRD).
- Nódulo em região de membro posterior esquerdo.
- Mastocitoma **grau III**.

Neste experimento foram utilizadas as concentrações de 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7} M de ATRA por 24, 48, 72, 96 e 120 horas. O gráfico 2 mostra uma sensibilidade das células de mastocitoma canino grau III ao ATRA estatisticamente significativa já nas primeiras 24h, intensificando com o aumento do tempo de exposição, apenas na dose de 10^{-4} M.



** $p < 0,01$, em comparação ao grupo controle por ANOVA seguido do teste de Tukey-Kramer

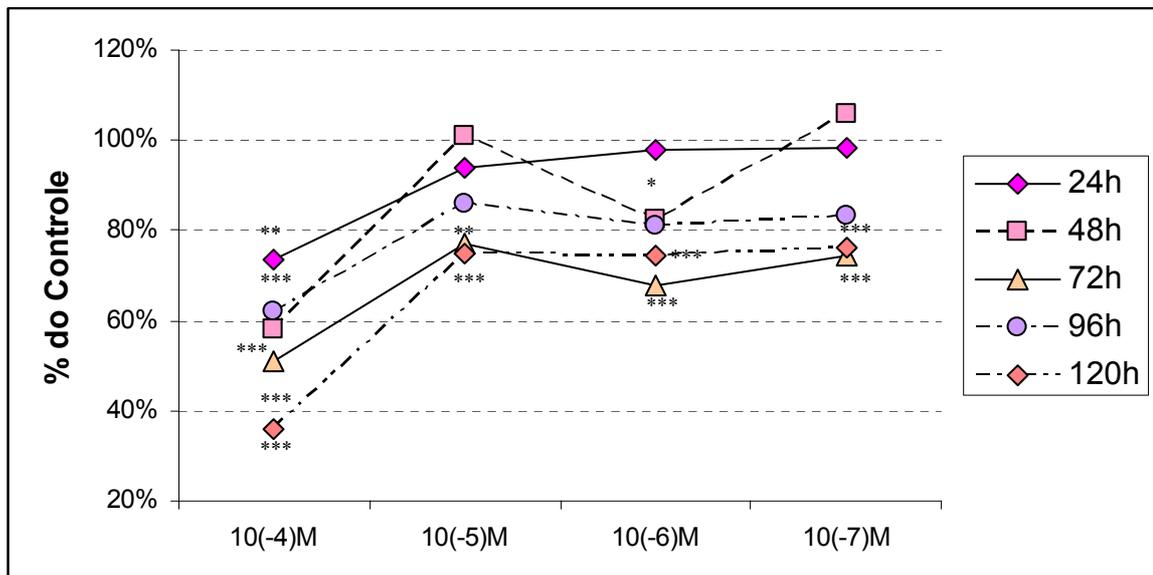
*** $p < 0,001$, em comparação ao grupo controle por ANOVA seguido do teste de Tukey-Kramer

Gráfico 2 - Efeito do tratamento com ATRA nas concentrações de 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7} M, por 24, 48, 72, 96 e 120 horas em células de mastocitoma canino grau III em cultivo

5.2.3 Animal nº. 3

- Cão, fêmea, com 9 anos de idade, da raça Boxer.
- Nódulo em região de membro posterior direito.
- Mastocitoma **grau II**.

Neste experimento foram utilizadas as concentrações de 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7} M de ATRA por 24, 48, 72, 96 e 120 horas. O gráfico 3 mostra uma sensibilidade das células de mastocitoma canino grau II ao ATRA estatisticamente significativa já nas primeiras 24h, intensificando com o aumento do tempo de exposição. Neste caso observamos quimiosensibilidade também nas doses mais baixas de 10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7} M após 72 horas de incubação.



* $p < 0,05$, em comparação ao grupo controle por ANOVA seguido do teste de Tukey-Kramer

** $p < 0,01$, em comparação ao grupo controle por ANOVA seguido do teste de Tukey-Kramer

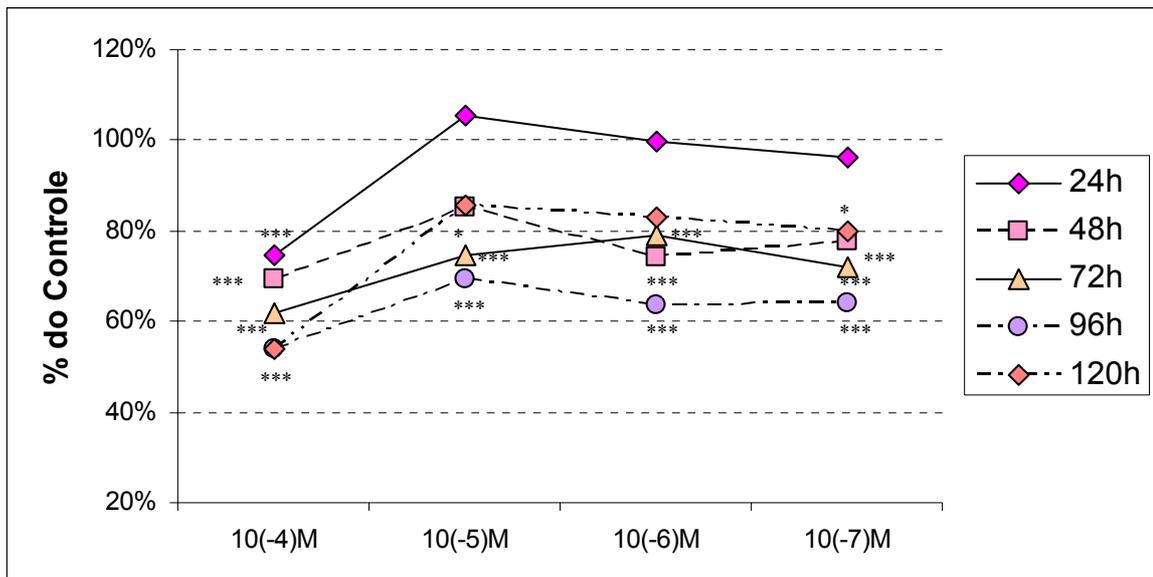
*** $p < 0,001$, em comparação ao grupo controle por ANOVA seguido do teste de Tukey-Kramer

Gráfico 3 - Efeito do tratamento com ATRA nas concentrações de 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7} M, por 24, 48, 72, 96 e 120 horas em células de mastocitoma canino grau II em cultivo.

5.2.4 Animal nº. 4

- Cão, fêmea, com 10 anos de idade, da raça Dobermann.
- Nódulo em região de flanco direito.
- Mastocitoma **grau III**

Neste experimento foram utilizadas as concentrações de 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7} M de ATRA por 24, 48, 72, 96 e 120 horas. O gráfico 4 mostra uma sensibilidade das células de mastocitoma canino grau II ao ATRA estatisticamente significativa já nas primeiras 24h, intensificando com o aumento do tempo de exposição. Neste caso observamos quimiosensibilidade também nas doses mais baixas de 10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7} M após 72 horas de incubação.



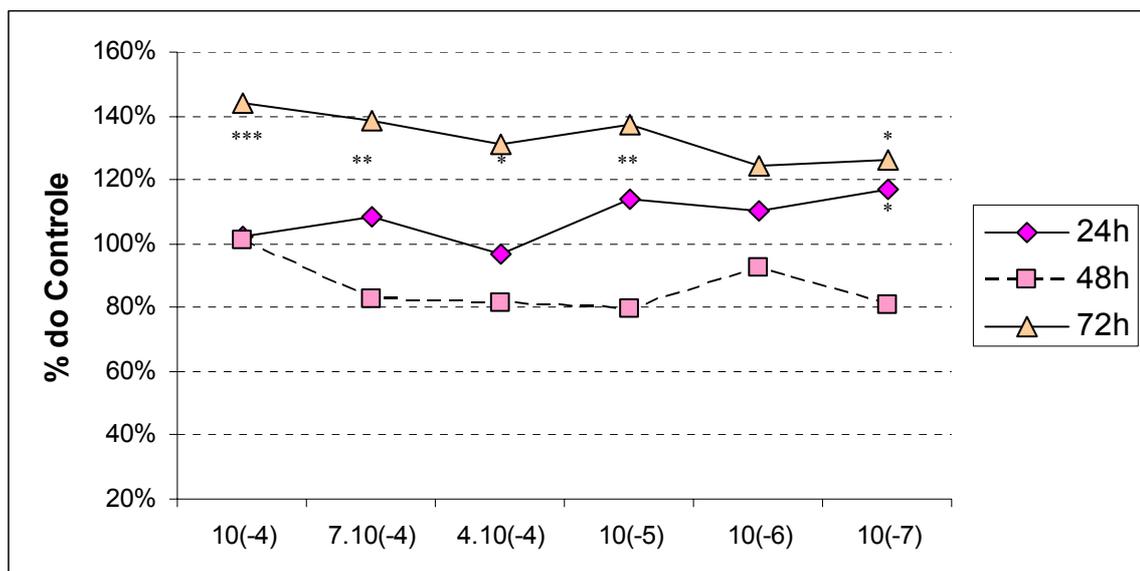
* $p < 0,05$, em comparação ao grupo controle por ANOVA seguido do teste de Tukey-Kramer

** $p < 0,01$, em comparação ao grupo controle por ANOVA seguido do teste de Tukey-Kramer

*** $p < 0,001$, em comparação ao grupo controle por ANOVA seguido do teste de Tukey-Kramer

Gráfico 4 - Efeito do tratamento com ATRA nas concentrações de 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7} M, por 24, 48, 72, 96 e 120 horas em células de mastocitoma canino grau III em cultivo

Após aproximadamente 2 meses, o tumor recidivou e foi realizado novamente o teste de quimiosensibilidade com concentrações de 10^{-4} , $7 \cdot 10^{-4}$, $4 \cdot 10^{-4}$, 10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7} M de ATRA, por 24, 48 e 72 horas. A análise do gráfico mostra resultados interessantes (gráfico 5). Ao invés de diminuição do número de células, como registrado em todos os demais experimentos, ocorreu o aumento do número de células após 72h de incubação praticamente em todas as doses estudadas.



* $p < 0,05$, em comparação ao grupo controle por ANOVA seguido do teste de Tukey-Kramer

** $p < 0,01$, em comparação ao grupo controle por ANOVA seguido do teste de Tukey-Kramer

*** $p < 0,001$, em comparação ao grupo controle por ANOVA seguido do teste de Tukey-Kramer

Gráfico 5 - Efeito do tratamento com ATRA nas concentrações de 10^{-4} , $7 \cdot 10^{-4}$, $4 \cdot 10^{-4}$, 10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7} M, por 24, 48 e 72 horas em células de recidiva de mastocitoma canino grau III em cultivo

A figura 22 a seguir ilustra o efeito do ATRA nas concentrações 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7} M de ATRA, por 48, 72 e 120 horas de incubação com células de mastocitoma canino grau II. Notar que na dose de 10^{-4} M, após 120h, não há muitos mastócitos, em comparação com o controle e com as outras concentrações e tempos.

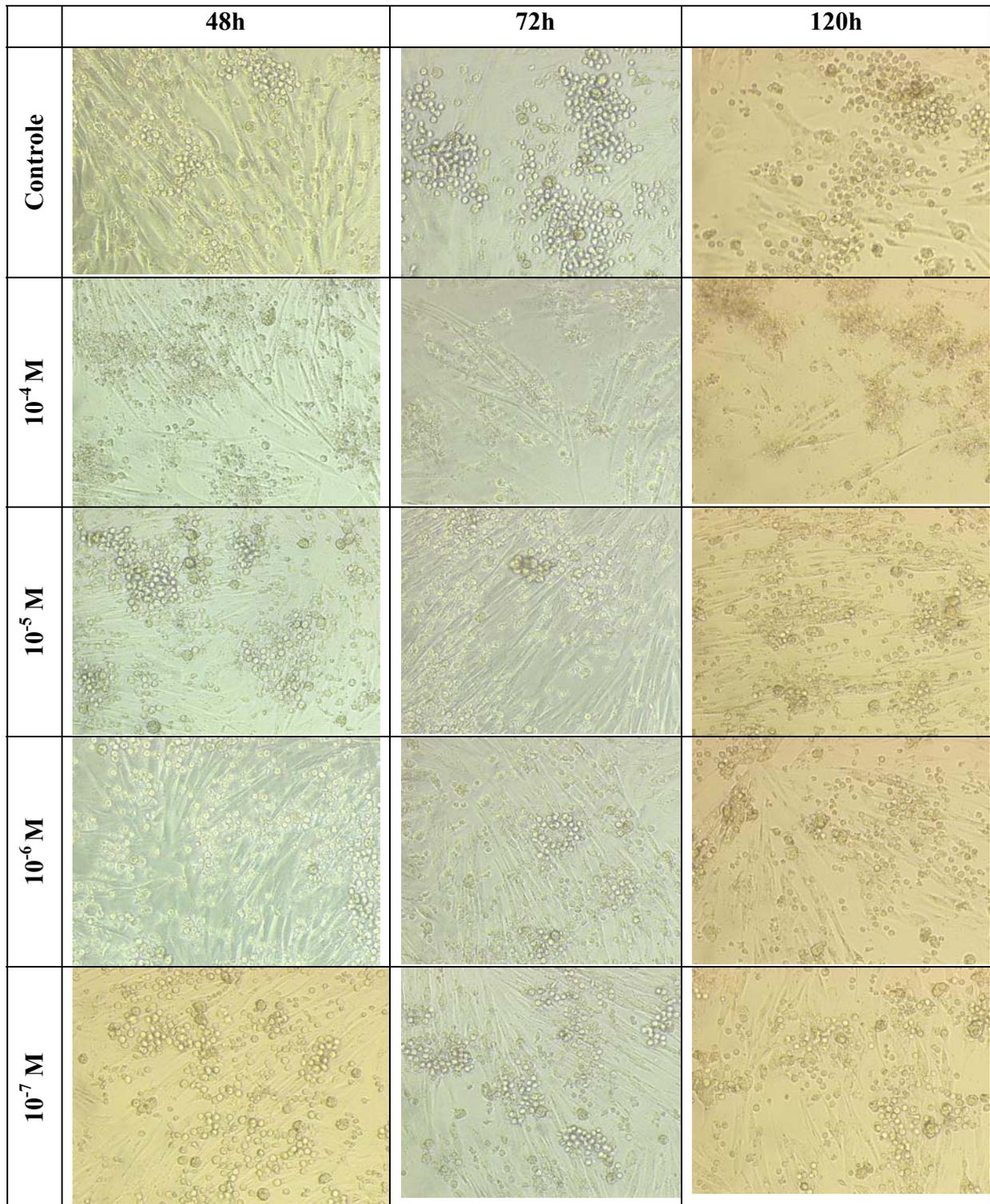


Figura 17 - Fotomicrografias do efeito do tratamento com ATRA nas diferentes concentrações por 48, 72 e 120h de incubação, em células de mastocitoma canino grau II em cultivo. Na dose de 10^{-4} M podemos notar uma diminuição dos mastócitos em comparação com outras doses. 100x

5.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados dos experimentos mostrados no item 5.2 foram analisados em conjunto através da ANOVA de medidas repetidas para podermos observar a existência de interação entre o grau dos mastocitomas (I, II e III), o tempo (24, 48, 72, 96 e 120h) e as concentrações (10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7} M). Os dados estão na tabela do apêndice B.

O caso da recidiva foi analisado a parte, pois apresentou um comportamento completamente diferente dos outros. Podemos notar claramente que ocorre um efeito contrário, com um aumento do número de células em vez de uma diminuição.

Através da análise dos dados, podemos inferir que:

➤ Em relação à variável TEMPO:

Encontramos diferenças significativas entre os tempos na resposta ao ATRA (teste ANOVA para medidas repetidas com $p < 0,001$). Não encontramos diferença significativa entre a média do tempo 24 h e o tempo 48 h ($p = 0,706$). Entretanto, os tempos 24 e 48 h diferem significativamente dos outros tempos (72, 96 e 120h), ($p < 0,015$ para as diversas comparações entre estes tempos). Os tempos 72, 96 e 120 h não diferem significativamente entre si (com $p > 0,465$ para as diversas comparações).

➤ Em relação à variável GRAU

Não houve diferença nas respostas entre o grau 2 e grau 3 ao longo dos tempos ($p = 0,765$).

Considerando os 5 tempos (24, 48, 72, 96 e 120h) e os graus 2 e 3, não encontramos interação entre o grau e o tempo ($p = 0,103$), o que significa que o grau não afeta o comportamento da resposta ao longo do tempo.

Não há interação entre o grau e o tempo ($p = 0,905$), ou seja, a diferença encontrada no tempo existe independentemente do grau.

➤ Em relação à variável CONCENTRAÇÃO

Há diferenças significativas nas respostas entre as concentrações testadas ($p = 0,002$). A resposta da concentração $10^{-4}M$ difere significativamente das demais ($p < 0,002$), sendo que as respostas das concentrações $10^{-5}, 10^{-6}$ e 10^{-7} não diferem entre si ($p > 0,511$).

Há diferenças significativas nas respostas nos diferentes tempos, e não há interação entre tempo e grau e entre tempo e concentração, nem entre os três ao mesmo tempo, ou seja, cada fator pode ser analisado independentemente.

Podemos inferir, então, que a maior quimiosensibilidade de mastocitomas caninos ao ATRA se dá após 72h de exposição na dose de $10^{-4}M$, independente do seu grau.

Os gráficos a seguir mostram a correlação entre os dados, que foram analisados separadamente: 24 e 48h – 72 a 120h, já que estes dois grupos se mostraram diferentes estatisticamente entre si e iguais dentro do grupo. Os gráficos foram feitos utilizando-se os pontos experimentais da resposta em função do logaritmo da dose, sendo realizada uma regressão linear e uma regressão

exponencial sobre estes conjuntos de dados. Os resultados são apresentados a seguir:

Regressao Linear e Exponencial para Log Dose x Resposta (24 e 48 h)

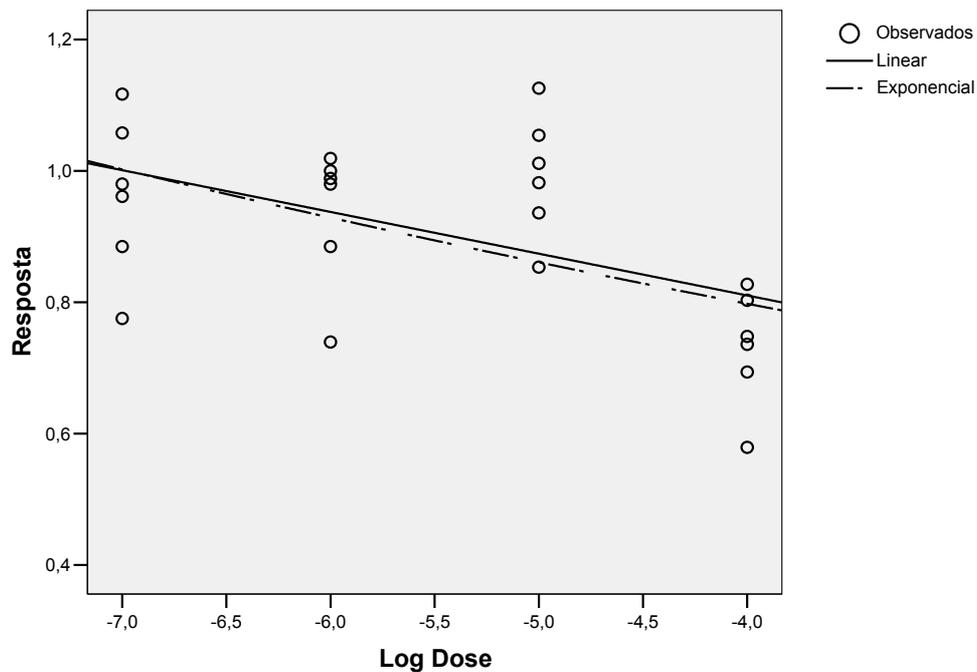


Gráfico 6 - Gráfico da regressão linear e exponencial para dose versus resposta (% do controle) nos tempo de 24 e 48h. A curva ajustada mostra o resultado para as concentrações de 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7} M de ATRA. Ajuste linear: $R^2 = 0,225$, com $p = 0,011$. Ajuste exponencial: $R^2 = 0,269$, com $p = 0,009$. A equação da reta é: Resposta = $0,556 - 0,064 \text{ Log(Dose)}$

Regressão Linear e Exponencial para Log Dose x Resposta (72 a 120 h)

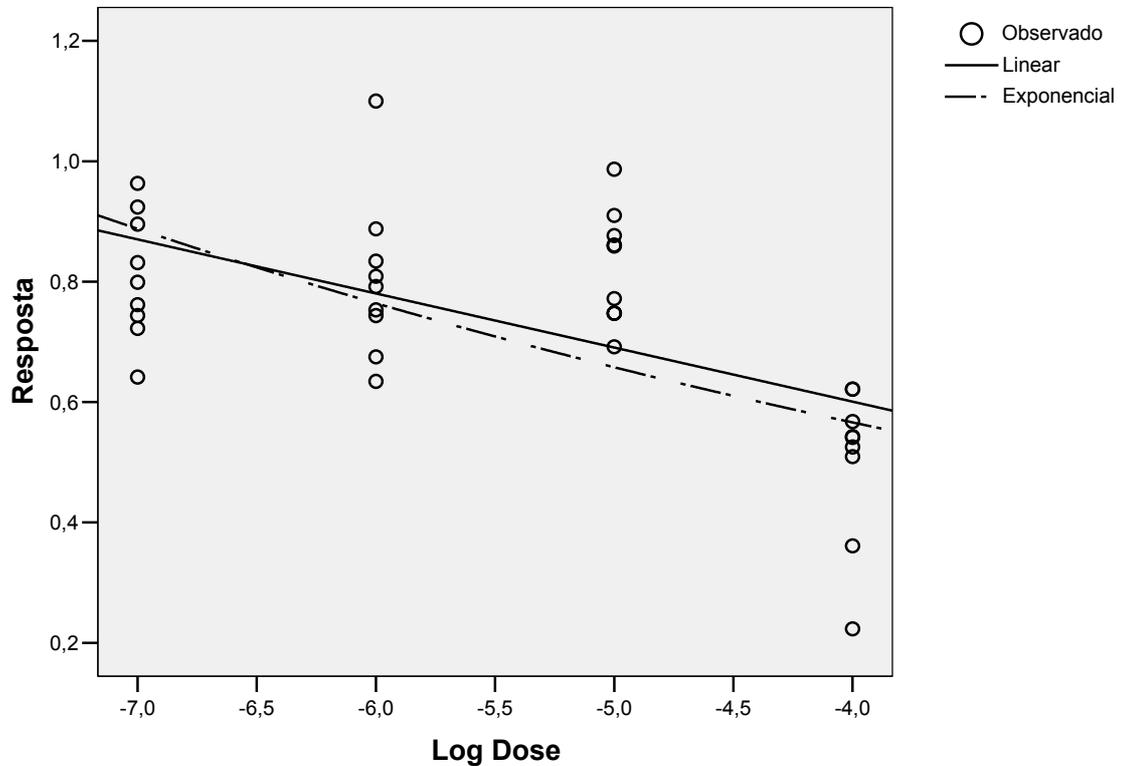


Gráfico 7 - Gráfico da regressão linear e exponencial para dose versus resposta (% do controle) nos tempo de 72, 96 e 120h. A curva ajustada mostra o resultado para as concentrações de 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7} M de ATRA. Ajuste linear: $R^2 = 0,330$, com $p < 0,001$. Ajuste exponencial: $R^2 = 0,324$, com $p < 0,001$. A equação da reta é: Resposta = $0,241 - 0,090 \text{ Log(Dose)}$

6 DISCUSSÃO

A cultura primária de mastocitomas caninos de diferentes graus tem sido estudada para possibilitar o estudo da quimiosensibilidade individual, já que o prognóstico difere tanto entre os animais e quanto aos graus do tumor (PATNAIK et al. 1984).

Estes experimentos realizados proporcionaram um grande aprendizado, viabilizando o contato com as células neoplásicas. Diferentemente de linhagens celulares de mastocitomas (P-815), os mastócitos da cultura primária crescem e se mantêm aderidos aos fibroblastos.

Os mastócitos são células altamente especializadas que possuem em seus grânulos substâncias capazes de induzir proliferação, angiogênese, reconstrução de matriz, entre outros, enfim, tudo que uma neoplasia necessita para progredir.

O isolamento e purificação de mastócitos a partir de tecidos são procedimentos, em algumas vezes, difíceis (ROSSI et al., 1998). Segundo Calonico et al. (1985), a proporção dos vários tipos celulares presentes na biópsia de um mastocitoma é a seguinte: mastócitos (66,7%), eosinófilos (13,4%), fibroblastos (8%), macrófagos (2,7%), células indiferenciadas (1,7%), outras células (3,6%) e células não identificadas (3,9%). Entretanto, com o aumento do tempo em cultura, o número dos outros tipos celulares diminui drasticamente, levando a uma população quase pura de mastócitos e fibroblastos.

Objetivou-se o co-cultivo de mastócitos neoplásicos com fibroblastos, pois estes são importantes devido aos vários fatores de crescimento que produzem para os mastócitos, como o stem cell factor (SCF), conhecido como c-kit ligante, o qual interage com o receptor c-kit presente nos mastócitos. Este fator permite a sobrevivência dos mastócitos neoplásicos, assim como regula outras funções dos mastócitos (ROSSI et al., 1998). Segundo Trautmann et al. (1998), mastócitos

também produzem fatores de crescimento para fibroblastos, como IL-4, depende de interação. Isso pôde ser visto na figura 8 que os mastócitos costumam estar aderidos aos fibroblastos. A presença de fibroblastos é então um bom indicador de que os mastócitos estão bem. Observamos também que na presença de mastócitos, ocorre produção possivelmente de colágeno, tornando o meio altamente viscoso (Figura 9). O aumento da produção de colágeno pode ocorrer pela liberação de histamina e heparina contidas nos grânulos dos mastócitos que estimulam o crescimento e síntese de colágeno pelos fibroblastos (NORRBY, 1973; NORRBY; SORBO, 1992).

Não foram observadas alterações de crescimento e/ou adesão com o uso de monocamada de colágeno de cauda de rato, forrando as garrafas de cultura. Esta técnica tinha como objetivo propiciar uma maior adesão dos mastócitos e conseqüente crescimento.

Pôde-se observar que, em média, os mastócitos sobrevivem durante 30 dias, sendo que os fibroblastos conseguem sobreviver por mais tempo.

Foi utilizada a técnica de citometria de fluxo para melhor caracterizar a cultura primária de mastocitomas caninos. Esta análise nos mostra a presença de 4 populações de células que diferem em tamanho e granulosidade (figura 13), que podem ser mastócitos e fibroblastos. Os mastócitos variam em tamanho (de 10-15 μm) e em quantidade dos grânulos presentes, enquanto que os fibroblastos são maiores e também possuem grânulos. A análise do ciclo celular por citometria de fluxo (Figura 14), nos mostra uma porcentagem baixa de proliferação de célula de um mesmo "gate". Porém podemos apenas sugerir, com base nas observações do crescimento da cultura, que estas células sejam mastócitos. Mais estudos por citometria de fluxo com uso de anticorpo específico para mastócitos são necessários.

Mastócitos são derivados de células hematopoiéticas imaturas que sob condições fisiológicas, alcançam os tecidos, proliferam e amadurecem sob a ação

de SCF (stem cell factor), conhecido também como ligante Kit (ISHIZAKA ET AL., 1993; IRANI ET AL., 1992). Proliferação descontrolada e acúmulo de mastócitos ocorrem nos mastocitomas. Alguns anos atrás, mutações pontuais no c-kit, que levam a uma ativação constitutiva de Kit na ausência do ligante (SCF), foram identificadas em três linhagens de mastocitomas (FURITSU et al., 1993; TSUJIMURA et al., 1995; TSUJIMURA et al., 1994) e também em mastocitomas caninos (LONDON et al., 1999; MA et al., 1999). Sabe-se que SCF promove a sobrevivência dos mastócitos suprimindo a apoptose (efeito resgate). Este fato leva a um acúmulo dos mastócitos nos tecidos.

A princípio objetivou avaliar a morte celular por apoptose pelo método de laranja de acridina. O principal ligante intranuclear para o laranja de acridina é o DNA (LOVE, 1979). O DNA de células de certos tipos tumorais é mais acessível para o laranja de acridina que o DNA de células normais. Isso pode ser explicado pelo motivo que células tumorais estão em constante divisão. As fortes marcações nucleares dos mastócitos da figura 16 mostram que o DNA está condensado, indicando uma possível proliferação dos mesmos ou início de processo de morte celular. Havia também marcações em vermelho no citoplasma das células. Segundo Hammel et al. (1998), existem dois tipos diferentes de mastócitos quando colocados em cultura, diferindo principalmente no tamanho e tipo de grânulos existentes, e que existe uma liberação rápida e uma lenta destes grânulos. Segundo este autor existe basicamente grânulos solúveis e insolúveis. Esta pode ser uma explicação para os grânulos corados em vermelhos em alguns mastócitos. Segundo Love (1979) a coloração também é dependente do tempo de exposição e concentração do corante utilizada. Infelizmente, essa técnica não se mostrou eficiente no seu objetivo. Muitas dúvidas surgiram ao avaliar as células e comprovar que realmente estava ocorrendo apoptose.

Os retinóides, metabólitos ativos da vitamina A, exibem vários efeitos interessantes no crescimento e diferenciação de células normais, pré-neoplásicas e neoplásicas *in vivo* e *in vitro*. Neste estudo, investigamos os efeitos do ácido retinóico *todo-trans* em células de mastocitoma canino de diferentes graus.

A análise dos gráficos de cada experimento mostra que a dose de 10^{-4} M de ATRA foi mais eficaz em inibir o crescimento dos mastócitos em todos os graus analisados. Entretanto no caso da recidiva do mastocitoma grau III houve um aumento significativo, diferindo de todos. Uma possível alteração dos receptores RARs e RXRs possa estar envolvida nessa resposta. A expressão destes receptores, RARs e RXRs, estão sendo analisadas em nosso laboratório e em breve poderá confirmar algumas hipóteses.

Ohashi et al. (2006), mostraram que linhagens de mastocitomas caninos são sensíveis aos retinóides nas doses de 10^{-5} a 10^{-10} M. Em nosso estudo, alguns mastocitomas caninos não foram sensíveis a doses de 10^{-5} a 10^{-7} M, evidenciando que testar substâncias em culturas primárias pode ser mais próximo do que realmente ocorre com o animal.

As fotomicrografias (Figura 22) mostram que os mastócitos são mais sensíveis do que os fibroblastos. Isso pode ser vantajoso no tratamento do mastocitoma canino.

A análise estatística de todos os dados reunidos mostrou que não há diferenças entre os graus de mastocitomas, ou seja, tanto uma mastocitoma grau II ou III respondem igualmente ao ATRA nas doses estudadas. Foi inferido que há diferença entre os tempos de 24 e 48h dos tempos 72, 96 e 120h. Assim, existe um efeito já nas primeiras 24h, mas esse não se altera em 48h, entretanto se altera após 72h. Podemos concluir que o melhor efeito do ATRA se dá após 72h de exposição na dose de 10^{-4} M. No caso da recidiva, o maior efeito de crescimento das células se deu após 72 horas.

Ohashi e colaboradores, (Ohashi et al., 2006) publicaram que retinóides inibiram o crescimento de células de linhagens de mastocitomas, induziram a apoptose (caspase dependente) e parada do ciclo celular.

Os mecanismos pelo os quais o retinóides agem nos mastocitomas são ainda desconhecidos. A ativação constitutiva de Kit leva a uma inibição constante da

apoptose e acúmulo de células. O ATRA pode, em altas doses como 10^{-4} M, bloquear esse efeito de inibição da apoptose, levando a morte celular. Esta pode ser uma das maneiras que os retinóides eliminem, ou induza a apoptose, as células dos mastocitomas caninos.

A fim de estabelecer uma linhagem de mastocitoma canino, foram inoculadas células da cultura primária de mastocitoma canino em camundongos nude BALB/c e avaliada a evolução. O crescimento tumoral ficou evidente após 4 semanas, e em 4 semanas adicionais o tumor atingiu tamanho ressecável. Esta linhagem continua sendo propagada em nosso laboratório e estamos aguardando resultados.

A continuação dos estudos com mastocitomas caninos se faz necessária para podermos combatê-lo de forma eficaz. Esses estudos tão importantes estão sendo realizados em nosso laboratório em diversas vertentes. Assim poderemos então reunir os dados e propor métodos de tratamentos e diagnósticos mais eficientes.

7 CONCLUSÕES

- Células de mastocitomas caninos se mantêm em cultura por aproximadamente 30 dias.
 - O co-cultivo com fibroblastos é importante para a sobrevivência dos mastócitos neoplásicos em cultura.
 - A taxa de proliferação dos mastócitos neoplásicos é muito baixa em cultura na ausência de fatores de crescimento adicionais.
 - A exposição ao ATRA não induz alteração morfológica e/ou diferenciação dos mastócitos.
 - A quimiosensibilidade de diferentes graus de mastocitomas ao ácido retinóico se dá após 72h de exposição na dose de 10^{-4} M.
 - Não há diferença no efeito do ATRA nas diferentes doses entre os mastocitomas graus II e III.
 - Aparentemente o tratamento com ATRA induziu aumento da proliferação celular em recidivas de mastocitoma grau III.
 - O ATRA pode ser utilizado como adjuvante no tratamento de mastocitomas caninos.
-

REFERÊNCIAS

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. 1629-34, Dec, 1999.

AIBA, M.; IRI, H.; SUZUKI, H.; KAGEYAMA, K.; KAWAI, T.; ABE, O.; MURAI, M.; TAZAKI, H.; SARUTA, T. Numerous mast cells in an 11-deoxycorticosterone-producing adrenocortical tumor. **Archives of pathology & laboratory medicine**, v. 109, p. 357-360, 1985.

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. D. **Biologia molecular da célula**. 3^a ed. Porto Alegre/RS: Editora Artes Médicas, 1997.

ALLENBY, G.; BOCQUEL, M. T.; SAUNDERS, M.; KAZMER, S.; SPECK, J.; ROSENBERGER, M.; LOVEY, A.; KASTNER, P.; GRIPPO, J. F.; CHAMBON, P. Retinoic acid receptors and retinoid X receptors: interactions with endogenous retinoic acids. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, n. 1, p. 30-34, Jan, 1993.

ALTUCCI, L.; GRONEMEYER, H. The promise of retinoids to fight against cancer - Review. **Nature Reviews Câncer**, v. 1, n. 3, p. 181-193, Dec, 2001.

AVVISATI, G.; TALLMAN, M. S. All-trans retinoic acid in acute promyelocytic leukaemia. Review. **Best Practice & Research. Clinical Haematology**, v. 16, n. 3, p. 419-32, Sep, 2003.

AZIZKHAN, R. G.; AZIZKHAN, J. C.; ZETTER, B. R.; FOLKMAN, J. Mast cell heparin stimulates migration of capillary endothelial cells in vitro. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 152, p. 931-944, 1980.

BARROGA, E. F.; KADOSAWA, T.; ASANO, K.; OKUMURA, M.; FUJINAGA, T. Apoptosis induction of POS canine osteosarcoma cells by vitamin D and retinoids. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 60, n. 11, p.1269-1272, Nov, 1998.

BARSUMIAN, E. L.; MCGIVNEY, A.; BASCIANO, L. K.; SIRAGANIAN, R. P. Establishment of four mouse mastocytoma cell lines. **Cellular Immunology**, v. 90, n.1, p. 131-141, Jan, 1985.

BIANCHINE, P. J.; BURD, P. R.; METCALFE, D. D. IL-3 mast cells attach to plate-bound vitronectin: demonstration of augmented proliferation in response to signals transduced via cell surface vitronectin receptors in the presence of IL-3. **Journal of Immunology**, v. 149, p. 3665-3671, 1992.

BIRD, M. C.; GODWIN, V. A.; ANTROBUS, J. H.; BOSANQUET, A. G. Comparison of a in vitro drug sensitivity by the differential staining cytotoxicity (DiSC) and colony-forming assays. **British Journal of Câncer**, v. 55, n. 4, p.429-431, Apr, 1987.

BLACK, M. M.; SPEAR, F. D. Effects of cancer chemotherapeutic agents on dehydrogenase activity of human cancer tissue in vitro. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 218, 1953.

BLECHMAN, J. M.; LEV, S.; GIVOL, D.; YARDEN, Y. Structure function analysis of the c-kit receptor for the steel factor. **Stem Cells**, v. 11, p. 12-19, 1993.

BLOOM, F. Spontaneous solitary and multiple mast cell tumors (mastocytoma) in dogs. **Archives of Pathology**, v. 33, p. 661-676, 1942.

BOOKBINDER, P. F.; BUTT, M. T.; HARVEY, H. J. Determination of the number of mast cells in lymph node, bone marrow and buffy coat cytological specimens in dogs.

Journal of the American Veterinary Medical Association, v. 200, p. 1648–1650, 1992.

BOSTOCK, D. The prognosis following surgical removal of mastocytomas in dogs. **Journal of Small Animal Practice**, v. 14, p. 27–40, 1973.

BOSTOCK, D. E.; CROCKER, J.; HARRIS, K.; SMITH, P. Nucleolar organiser regions as indicators of post-surgical prognosis in canine spontaneous mast cell tumours.. **British Journal of Câncer**, v. 59, n. 6, p. 915-918, Jun, 1989.

BURNET, F. M. The probable relationship of some or all mast cells to the T-cell system. **Cellular Immunology**, v. 30, p. 358-360, 1977.

CALONICO, L. D.; PHILLIPS, M. J.; MCDONALD, D. M.; GOLD, W. M. An ultrastructural analysis of dog mastocytoma cells and normal mast cells. **The Anatomical Record**, v. 212, n. 4, p. 392-393, 399-407, Aug, 1985.

CASTAIGNE, S.; CHOMIENNE, C.; DANIEL, M. T.; BALLERINI, P.; BERGER, R.; FENAUX, P.; DEGOS, L. All-*trans* retinoic acid as a differentiation therapy for acute promyelocytic leukemia. I. Clinical results. **Blood**, v. 76, p.1704, 1990.

CHAMBON, P. A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. Review. **The FASEB Journal**, v. 10, n. 9, p. 940-954, Jul, 1996.

CLAMAN, H. N. Mast cells and fibrosis: hints from graft-versus-host disease and scleroderma. In: Kaliner, M. A.; Metcalfe, D. D. (Ed). **The Mast cell in Health and Disease**, edited by New York: Dekker, p. 653-667, 1993.

CLARK, G. M.; VON HOFF, D. D. Quality control of a multicenter human tumor cloning system of the Southwest Oncology Group experience. IN: SALMON, S. E.; TRENT, J. M. (Ed.). **Human cloning**. Orlando, F.L.: Grune & Stratton, 255, 1984.

CLINTON, M.; LONG, W. F.; WILLIAMSON, F. B.; DUNCAN, J. I.; THOMPSON, W. D. Effect of the mast cell activator compound 48/80 and heparin on angiogenesis in the chick chorioallantoic membrane. **International journal of microcirculation, clinical and experimental**, v. 7, p. 315-326, 1988.

COBB, M. C.; HENNING, B.H.; DENYS, F.R. Ultrastructural characteristics of mast cells from a canine mastocytoma maintained in vitro. **Journal of Oral Pathology**, v. 4, p. 244-256, 1975.

COMBS, J. W. Maturation of rat mast cells. An electron microscope study. **The Journal of Cell Biology**, v.31, p. 563-575, 1966.

CZARNETZKI, B. M.; STERRY, W.; BRAZIN, H.; KAPVERAM, K. J. Evidence that tissue mast cells are derived from mononuclear phagocytes. **International Archives of allergy and Immunology**, v. 67, p. 44-48, 1982.

DASTYCH, J.; METCALFE, D. D. Stem cell factor induces mastcell adhesion to fibronectin. **Journal of Immunology**, v. 152, p. 213-219, 1994.

DAYTON, E. T.; CAULFIELD, J. P.; HEIN, A.; AUSTEN, K. F.; STEVENS, R. L. Regulation of the growth rate of mouse fibroblasts by IL-3-activated mouse bone marrow-derived mast cells. **Journal of Immunology**, v. 142, p. 4307-4313, 1989.

DEBERGH, P. C.; READ, P. E. Micropropagation In: DEBERGH, P.C.; ZIMMERMAN, R.H. (Ed.). **Micropropagation: Technology and Application**. London, Kluwer Academic Publishers, 1991.

DESCHRYVER-KECSKEMETI, K.; WILLIAMSON, J. R.; JAKSCHIK, B. A.; CLOUSE, R. E.; ALPERS, D. H. Mast cell granules within endothelial cells: a possible signal in the inflammatory process? **Modern pathology**, v. 5, p. 343-347, 1992.

DEVINNEY, R.; GOLD, W.M. Establishment of two dog mastocytoma cell lines in continuous culture. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 3, n. 5, p. 413-420, Nov, 1990.

DIETSCH, G. M.; HINRICHS, D. J. The role of mast cells in the elicitation of experimental allergic encephalomyelitis. **Journal of Immunology**, v. 142, p. 1476-1481, 1989.

DUNCAN, J. The lymph nodes. In: COWELL, R. L. (Ed.). **Diagnostic Cytology and Haematology of the dog and cat**, 2º ed, Mosby, St Louis, p. 97-103, 1999.

DUNCAN, J. I.; BROWN, F. I.; MCKINNON, A.; LONG, W. F.; WILLIAMSON, F. B.; THOMPSON, W.D. Patterns of angiogenic response to mast cell granule constituents. **International Journal of Microcirculation, Clinical and Experimental**, v. 11, p. 21-33, 1992.

DUNN, T. B.; POTTER, M. A transplantable mast-cell neoplasm in the mouse. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 18, n. 4, p. 587-601, Apr, 1957.

DVORAK, A. M. Mast cell secretory granules and lipid bodies contain the necessary machinery important for the in situ synthesis of proteins. **Chemical immunology and Allergy**, v. 85, p. 252-315, 2005.

EHRlich, P. Beitrage zur kenntniss der quilinfarbung und ihrer verivendung in der mikroskopischen technik. **Alch. Mikros. Anat.**, v. 13, p. 263-267, 1877.

ETTINGER, S. N.; SCASE, T. J.; OBERTHALER, K. T.; CRAFT, D. M.; MCKNIGHT, J. A.; LEIBMAN, N. F.; CHARNEY, S. C.; BERGMAN, P. J. J. Association of argyrophilic nucleolar organizing regions, Ki-67, and proliferating cell nuclear antigen scores with histologic grade and survival in dogs with soft tissue sarcomas: 60 cases (1996-2002). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 228, n. 7, p. 1053-1062, Apr, 2006.

FERRAO, A. V.; MASON, D R. M. The effect of heparin on cell proliferation and type-I collagen synthesis by adult human dermal fibroblasts. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1180, p. 225-230, 1993.

FOX, L. E.; ROSENTHAL, R. C.; TWEDT, D. C.; DUBIELZIG, R. R.; MACEWEN, E.G.; GRAUER, G.F. Plasma histamine and gastrin concentrations in 17 dogs with mast cell tumors. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 4, n. 5, p. 242-246, Sep-Oct, 1990.

FRESHNEY, I. R. **Culture of animal cells: a manual of basic technique**, 4th ed, Willy-liss Inc., 1990.

FRIMBERGER, A. E.; MOORE, A. S.; LARUE, S. M.; GLIATTO, J. M.; BENGTON, A. E. Radiotherapy of incompletely resected moderately differentiated mast cell tumours in the dog: 37 cases (1989–1993). **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 33, p. 320–323, 1997.

FRUEHALF, J. P.; BOSANQUET, A. G. In vitro determination of drug response: a discussion of clinical application. IN DEVITA, V.T. JR.; HELLMAN. S.; ROSEMBERG, S.A., (Ed.). **Principles and practice oncology**, 4th ed. Philadelphia: JB Lippincott, 4:1, 1993.

FURITSU, T.; TSUJIMURA, T.; TONO, T.; IKEDA, H.; KITAYAMA, H.; KOSHIMIZU, U.; SUGAHARA, H.; BUTTERFIELD, J. H.; ASHMAN, L. K.; KANAYAMA, Y. Identification of mutations in the coding sequence of the proto-oncogene c-kit in a human mast cell leukemia cell line causing ligand-independent activation of c-kit product. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 92, n. 4, p.1736-1744, Oct, 1993.

GALLI, S. J. New concepts about the mast cell. **The New England Journal of Medicine**, v. 328, n. 4, p. 257-265, 1993.

GALLI, S. J.; ZSEBO, K. M.; GEISLER, E. N. The kit ligand, stem cell factor. **Advances in Immunology**, v. 55, p. 1-96, 1994.

GRAHAN, J. C.; O'KEEFE, D. A. Soft Sarcomas and Mast cell tumors. In: Birchard, S. J., Scherding, R. G.: **Saunders manual of small animal practice**, Philadelphia: W. B. Saunders, p. 200-206, 1994.

GRIER, R. L.; DI GUARDO, G.; MYERS, R.; MERKLEY, D. F. Mast cell tumor destructions in dogs by hypotonic solution. **Journal of Small Animal Practice**, v. 36, n. 9, p. 385-388, Set, 1995.

GRIER, R. L.; DI GUARDO, G.; SCHAFFER, C. B.; PEDROSA, B.; MYERS, R.; MERKLEY, D. F.; THOUVENELLE, M. Mast cell tumor destruction by deionized water. **American Journal of Veterinary Research**, v. 7, n. 51, p. 1116-1120, Jul, 1990.

GRIFFIN, T. W.; BODGEN, A. E.; REICH, S. D.; ANTONELLI, D.; HUNTER, R. E.; WARD, A.; YU, D.T.; GREENE, H.L.; COSTANZA, M.E. Initial trials of the subrenal capsule assay predictor of tumor response to chemotherapy. **Cancer**, v. 52, n. 12, p. 2185-2192, Dec, 1983.

GÜZEY, M.; DEMIRPENÇE, E.; CRISS, W.; DELUCA, H. F. Effects of retinoic acid (*all-trans* and *9-cis*) on tumor progression in small-cell lung carcinoma. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 242, p. 369-375, 1998.

HAHN, K. A.; RICHARDSON, R. C. Detection of serum alpha-fetoprotein in dogs with naturally occurring malignant neoplasia. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 24, n. 1, p. 18-21, 1995.

HANSEN, L. A.; SIGMAN, C. C.; ANDREOLA, F.; ROSS, S. A.; KELLOFF, G. J.; DE LUCA, L. M. Retinoids in chemoprevention and differentiation therapy. Review. **Carcinogenesis**, v. 21, n. 7, p.1271-1279, Jul, 2000.

HARTVEIT, F.; THORESEN, S.; TANGEN, M.; MAARTMANN, H. Mast cell changes and tumor dissemination in human breast carcinoma. **Invasion Metastasis**, v. 4, p. 146-155, 1984.

HATFIELD, S. M.; ROEHM, N. W. Cyclosporine and FK506 inhibition of mast cell cytokine production. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 260, p. 680-688, 1992.

HAYDEN, L. J. Metabolic conversion of retinol to retinoic acid mediates the biological responsiveness of human mammary epithelial cells to retinol. **Journal of Cellular Physiology**, v.186, p.437-447, 2001.

HIGGINBOTHAM, R. D.; DOUGHERTY, T. F.; JEE, W. S. S. Fate of shed mast cell granules. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 92, p. 256-261, 1956.

HJERTSON, M.; KIVINEN, P.K.; DIMBERG, L.; NILSSON, K.; HARVIMA, I.T.; NILSSON, G. Retinoic acid inhibits in vitro development of mast cells but has no marked effect on mature human skin tryptase- and chymase-positive mast cells. **The Journal of Investigative Dermatology**, v.120, n.2, p. 239-245, Feb, 2003.

HOLGATE, S. T.; ROBINSON, C.; CHURCH, M. D. Mediators of immediate hypersensitivity. In: MIDDLETON, JR., E.; REED, C. E.; ELLIS, E. F.; ADKINSON, N. F.; YUNGINGER, J. W. (Ed.) **Allergy, principles and practice**, edited by. St. Louis, MO: Mosby, p. 267-301, 1988.

HONG, S. H.; MOCHIZUKI, M.; NISHIMURA, R.; SASAKI, N.; KADOSAWA, T.; MATSUNAGA, S. Differentiation induction of canine osteosarcoma cell lines by retinoids. **Research in Veterinary Science**, v. 68, n.1, p. 57-62, Feb, 2000a.

HONG, S. H.; KADOSAWA, T.; NOZAKI, K.; MOCHIZUKI, M.; MATSUNAGA, S.; NISHIMURA, R.; SASAKI, N. In vitro retinoid-induced growth inhibition and morphologic differentiation of canine osteosarcoma cells. **American Journal of Veterinary Research**, v. 61, n. 1, p. 69-73, Jan, 2000b.

HORIGOME, K.; BULLOCK, E. D.; JOHNSON, E. M. Effects of nerve growth factor on rat peritoneal mast cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, p. 2695-2702, 1994.

HORNY, H. P.; PARWARESCH, M. R.; LENNERT, K. Bone marrow findings in systemic mastocytosis. **Human Pathology**, v. 16, p. 808-814, 1985.

IEMURA, A.; TSAI, M.; ANDO, A.; WERSHIL, B. K.; GALLI, S. J. The c-kit ligand, stem cell factor, promotes mast cell survival by suppressing apoptosis. **The American Journal of Pathology**, v. 144, p. 321-328, 1994.

IRANI, A. A.; SCHECHTER, N. M.; CRAIG, S. S.; DEBLOIS, G.; SCHWARTZ, L. B. Two types of human mast cells that have distinct neutral protease composition. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of América**, v. 83, p. 4464-4468, 1986.

IRANI, A. M. A.; BRADFORD, T. R.; KEPLEY, C. L.; SCHECHTER, N. M.; SCHWARTZ, L. B. Detection of MCT and MCTC types of human mast cells by immunohistochemistry using new monoclonal anti-tryptase and anti-chymase antibodies. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 37, p. 1509-1515, 1989.

IRANI, A. M.; NILSSON, G.; MIETTINEN, U.; CRAIG, S. S.; ASHMAN, L. K.; ISHIZAKA, T.; ZSEBO, K. M.; SCHWARTZ, L. B. Recombinant human stem cell factor stimulates differentiation of mast cells from dispersed human fetal liver cells. **Blood**, v. 80, n. 12, p. 3009-3021, Dec, 1992.

ISHIDA, S.; KINOSHITA, T.; SUGAWARA, N.; YAMASHITA, T.; KOIKE, K. Serum inhibitors for human mast cell growth: possible role of retinol. **Allergy**, v. 58, n. 10, p. 1044-1052, Oct, 2003.

ISHIGURO, T.; KADOSAWA, T.; MORI, K.; TAKAGI, S.; OKUMURA, M.; FUJINAGA, T. Establishment and characterization of a new canine mast cell tumor cell line. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 63, n.9, p. 1031-1034, Sep, 2001.

ISHIZAKA, T.; MITSUI, H.; YANAGIDA, M.; MIURA, T.; DVORAK, A. M. Development of human mast cells from their progenitors. Review. **Current opinion in Immunology**, v. 5, n. 6, p. 937-943, Dec, 1993.

JAKOBSSON, A.; SORBO, J.; NORRBY, K. Protamine and mastcell-mediated angiogenesis in the rat. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 71, p. 209-217, 1990.

JANEWAY JR., C. A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; SHLOMCHIK, M. J. (Ed). The components of the immune system. In: _____ **Immunobiology**. New York: Garland Publishing, 2001. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?rid=imm>. Acesso em 26 out 2006.

KATAYAMA, I.; OTOYAMA, K.; YOKOZEKI, H.; NISHIOKA, K. J. Retinoic acid upregulates c-kit ligand production by murine keratinocyte in vitro and increases cutaneous mast cell in vivo. **Journal of Dermatological Science**, v. 9, n.1, p. 27-35, Jan, 1995.

KASTNER, P.; MARK, M.; CHAMBON, P. Nonsteroid nuclear receptors: what are genetic studies telling us about their role in real life? Review. **Cell**, v. 15, n. 83, p. 859-869, Dec, 1995.

KINOSHITA, T.; KOIKE, K.; MWAMTEMI, H. H.; ITO, S.; ISHIDA, S.; NAKAZAWA, Y.; KUROKAWA, Y.; SAKASHITA, K.; HIGUCHI, T.; TAKEUCHI, K.; SAWAI, N.; SHIOHARA, M.; KAMIJO, T.; KAWA, S.; YAMASHITA, T.; KOMIYAMA, A. Retinoic acid is a negative regulator for the differentiation of cord blood-derived human mast cell progenitors. **Blood**, v. 95, n. 9, p. 2821-2828, May, 2000.

KITAMURA, Y.; GO S.; HATANAKA, S. Decrease of mast cells in W/W^m mice and their increase by bone marrow transplantation. **Blood**, v. 52, p. 447-452, 1978.

KITAMURA, Y., YOKOHAMA, M.; MATSUDA, H.; OHNO, T.; MORI, J. J. Spleen colony-forming cell as common precursor for tissue mast cells and granulocytes. **Nature**, v. 291, p. 159-160, 1981.

KRAVIS, L. D.; VAIL, D. M.; KISSEBERTH, W. C.; OGILVIE, G. K.; VOLK, L. M. Frequency of argyrophilic nucleolar organizer regions in fine-needle aspirates and biopsy specimens from mast cell tumors in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 209, n. 8, p. 1418-20, Oct, 1996.

KUFE, D.; BAST, R.; HAIT, W.; HONG, W.; POLLACK, R.; WEICHSELBAUM, R.; HOLLAND, J.; FREI, E. (Ed.). Hematopoietic System. IN: _____ **Cancer medicine**. London: Bc Decker, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books>>. Aceso em 26 out 2006.

LADUE, T.; PRICE, G. S.; DODGE, R.; PAGE, R. L.; THRALL, D. E. Radiation therapy for incompletely resected canine mast cell tumors. **Veterinary radiology & ultrasound**, v. 39, n. 1, p. 57-62, Jan-Feb, 1998.

LAM, P. K.; TO, E. W. H.; CHAN, E. S. Y.; LIEW, C. T.; LUNG, I. W. H.; KING, W. K. *In vitro* inhibition of head and neck cancer-cell growth by human recombinant interferon α and 13-*cis* retinoic acid. **British Journal of Biomedical Science**, v. 58, p. 226-229, 2001.

LAZARUS, S. C.; DeVINNEY, R.; McCABE, L. J.; FINKBEINER, W. E.; ELIAS, D. J.; GOLD, W. M. Isolated canine mastocytoma cells: propagation and characterizations of two cell lines. **American Journal Physiology**, v. 20, p. 935-944, 1986.

LEVI-SCHAFFER, F.; KUPIETSKY, A. Mast cells enhance migration and proliferation of fibroblasts into an *in vitro* wound. **Experimental Cell Research**, v. 188, p. 42-49, 1990.

LONDON, C. A.; GALLI, S. J.; YUUKI, T.; HU, Z. Q.; HELFAND, S. C.; GEISLER, E. N. Spontaneous canine mast cell tumors express tandem duplications in the proto-oncogene *c-kit*. **Experimental Hematology**, v. 27, n. 4, p. 689-697, Apr, 1999.

LONDON, C. A.; SEGUIN, B. Mast cell tumors in the dog. **The Veterinary Clinics of North America. Small animal practice**, v. 33, n. 3, p. 473-489, May, 2003.

LOVE, L. D. Fluorescence microscopy of viable mast cells stained with different concentrations of acridine orange. **Histochemistry**, v. 62, n. 2, p. 221-225, Aug, 1979.

MA, Y.; LONGLEY, B. J.; WANG, X.; BLOUNT, J. L.; LANGLEY, K.; CAUGHEY, G. H. Clustering of activating mutations in *c-KIT*'s juxtamembrane coding region in canine mast cell neoplasms. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 112, n. 2, p. 165-70, Feb, 1999.

MADEWEEL, B. R.; THEILEN, G.H. Mast cell and melanocytic neoplasms. In: THEILEN, G. H.; MADEWELL, B. R. **Veterinary cancer medicine**, 2^a ed, Philadelphia: Lea & Febiger, p. 310-325, 1987.

MANGELSDORF, D. J.; ONG, E. S.; DYCK, J. A.; EVANS, R. M. Nuclear receptor that identifies a novel retinoic acid response pathway. **Nature**, v.17, n. 345, p. 224-229, May, 1990.

MATSSON, L. Mast cell heterogeneity in various oral mucosal sites in the rat. **Archives of Oral Biology**, v. 37, p. 445-450, 1992.

MCMANUS, P. Frequency and severity of mastocytemia in dogs with and without mast cell tumors: 120 cases (1995–1997). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 215, p. 355–357, 1999.

MEININGER, C. J.; ZETTER, B. R. Mast cells and angiogenesis. **Seminars in Cancer Biology**, v. 3, p. 73-79, 1992.

MEKORI, Y. A.; OH, C. K.; METCALFE, D. D. IL-3 dependent mast cells undergo apoptosis on removal of IL-3. Prevention of apoptosis by c-kit ligand. **Journal of Immunology**, v. 151, p. 3775-3784, 1993.

METCALFE, D. D.; BARAM, D.; MEKOR, Y. A. I. Mast Cells. **Physiological Reviews**, v. 77, n. 4, October, 1997

METCALFE, D. D. Biochemical and microscopic evidence for the internalization and degradation of heparin-containing mast cell granules by bovine endothelial cells. **Laboratory Investigation**, v. 12, p. 278-286, 1985.

MIYAJIMA, N.; WATANABE, M.; OHASHI, E.; MOCHIZUKI, M.; NISHIMURA, R.; OGAWA, H.; SUGANO, S.; SASAKI, N. Relationship between retinoic acid receptor alpha gene expression and growth-inhibitory effect of all-trans retinoic acid on canine tumor cells. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.20, n. 2, p. 348-54, Mar-Apr, 2006.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 16, n. 65, p. 55-63, Dec, 1983.

MURPHY, S. Canine mast cell tumours: a retrospective study. In: DOBSON, J.; LASCELLES, D. (Ed.). **Manual of Canine and Feline Oncology**, 2º ed, BSAVA, p.161-167, 2003.

NAPOLI, J. L. Retinoic acid biosynthesis and metabolism. **The FASEB Journal**, v. 10, p. 993-1001, 1996.

NIELSEN, S. W.; COLE, C. R. Canine mastocytoma – a report of one hundred cases. **American Journal of Veterinary Research**, v. 19, p. 417-432, 1958.

NOLI, C.; MIOLO, A. The mast cell in wound healing – Review. **Veterinary Dermatology**, v. 12, p. 303–313, 2001.

NORRBY, D. Effect of heparin, histamine and serotonin on the density-dependent inhibition of replication in two fibroblastic cell lines. **Virchows Archiv. B: Cell Pathology**, v. 15, p. 75-93, 1973.

NORRBY, K.; SORBO, J. Heparin enhances angiogenesis by asystemic mode of action. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 73, p. 147-155, 1992.

OHASHI, E.; HONG, S. H.; TAKAHASHI, T.; NAKAGAWA, T.; MOCHIZUKI, M.; NISHIMURA, R.; SASAKI, N. Effect of retinoids on growth inhibition of two canine melanoma cell lines. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 63, n. 1, p. 83-86, Jan, 2001.

OHASHI, E.; MIYAJIMA, N.; NAKAGAWA, T.; TAKAHASHI, T.; KAGECHIKA, H.; MOCHIZUKI, M.; NISHIMURA, R.; SASAKI, N. Retinoids induce growth inhibition and apoptosis in mast cell tumor cell lines. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 68, n. 8, p. 797-802, Aug, 2006.

O'KEEFE, D.; COUTO, C.; BURKE-SCHWARTZ, C.; JACOBS, R. M. Systemic mastocytosis in 16 dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 1, p. 75–80, 1987.

O'KEEFE, D.A.: Canine mast cell tumors – review, **Veterinary Clinics of North América**, v. 20, n. 4, p. 1105:1115, jul, 1990.

PATNAIK, A. K.; EHLER, W. J.; MACEWEN, E. G. Canine cutaneous mast cell tumor: morphologic grading and survival time in 83 dogs. **Veterinary Pathology**, v. 21, n. 5, p. 469-474, Sep, 1984.

PAULIS, A.; MINOPOLI, G.; ARBUSTINI, E.; CRESCENZO, G.; DAL PIAZ, F.; PUCCI, P.; RUSSO, T.; MARONE, G. Stem cell factor is localized in, released from, and cleaved by human mast cells. **The Journal of Immunology**, v. 163, p. 2799–2808, 1999,

RODRIGUEZ-TRADUCY, G.; COLLINS, M. K. L.; GARCIA, I.; LOPEZ-RIVAS, A. Insulin like growth factor-I inhibits apoptosis in IL-3 dependent hemopoietic cells. **Journal of Immunology**, v. 149, p. 535-540, 1992.

ROGERS, K. S.: Common questions about, diagnosing and treating canine mast cell tumors-reiview. **Veterinary Medicine**, p. 246-250, Mar, 1993.

ROSSI, G. L.; DI COMITE, V.; OLIVIERI, D. Mast cell cultures: bench to bedside. Review. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 28, n. 10, p. 1182-90, Oct, 1998.

ROTTEM, M.; GOFF, J. P.; ALBERT, J. P.; METCALFE, D. D. The effects of stem cell factor on the ultrastructure of Fc_εRI⁺ cells developing in IL-3 dependent murine bone marrow-derived cell cultures. **Journal of Immunology**, v. 151, p. 4950-4963, 1993.

RUOSS, S. J.; HARTMANN, T.; CAUGHEY, G. H. Mast cell tryptase is a mitogen for cultured fibroblasts **The Journal of Clinical Investigation**, v. 88, p. 493-499, 1991.

SANDBERG, H. Accelerated collagen formation and histamine. **Nature**, v. 194, p. 183, 1962.

SCASE, T. J.; EDWARDS, D.; MILLER, J.; HENLEY, W.; SMITH, K.; BLUNDEN, A.; MURPHY, S. Canine mast cell tumors: correlation of apoptosis and proliferation markers with prognosis. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 20, n. 1, p.151-158, Jan-Feb, 2006.

SCHWARTZ, L. B. Heterogeneity of human mast cells. In: KALINER, M. A.; METCALFE, D.D. (Ed.). **Mast Cell in Health and Disease**, New York: Dekker, p. 219-236, 1993.

SCHWARTZ, L. B.; IRANI, A. M. A.; ROLLER, K.; CASTELLS, C.; SCHECHTER, N. M. Quantitation of histamine, tryptase and chymase in dispersed human T and TC mast cells. **Journal of Immunology**, v. 138, p. 2611-2615, 1987.

SEGUIN, B.; LEIBMAN, N. F.; BREGAZZI, V. S.; OGILVIE, G. K.; POWERS, B. E.; DERNELL, W. S.; FETTMAN, M. J.; WITHROW, S. J. Clinical outcome of dogs with grade-II mast cell tumors treated with surgery alone: 55 cases (1996–1999). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 218, p. 1120–1123, 2001.

SELYE, H. **Mast cell – Review**, 1^a ed., Washington: Butterworths Inc, p. 275-278, 1965.

SEMENIUK, C. E.; WOLCZYNSKI, S.; DZIECIOL, J.; DABROWSKA, M.; ANCHIM, T.; TOMASZEWSKA, I. 13-*cis* retinoic acid and all-*trans* retinoic acid in the regulation of the proliferation and survival of human breast cancer cell line MCF-7. **Cellular & Molecular Biology Letters**, v.6, p. 925-939, 2001.

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.

SONDAK, V. K.; BERTELSEN, C. A.; TANIGAWA, N.; HILDEBRAND-ZANKI, S. U.; MORTON, D. L.; KORN, E. L.; KERN, D. H. Clinical correlations with chemosensitivities measured in a rapid thymidine incorporations assay. **Cancer Research**, v. 44, n. 4, p. 1725-1728, 1984.

SONODA, T.; KITAMURA, Y.; HAKU, Y.; HARA, H.; MORI, K. J. Mast cell precursors in various hematopoietic colonies of mice produced in vivo and in vitro. **British Journal of Haematology**, v. 53, p. 611-620, 1983.

SORBO, J.; JAKOBSSON, A.; NORRBY, K. Mast-cell histamine is angiogenic through receptors for histamine₁ and histamine. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 75, p. 343-350, 1994.

SORBO, J.; NORRBY, K. Mast-cell histamine expands the microvasculature spatially. **Agents Actions**, v. 32, p. 387-389, 1992.

SOTER, N. A. Mastocytosis and the skin. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, v.14, n. 3, p. 537-555, Jun, 2000.

SPERR, W. R.; WALCHSHOFER, S.; HORNY, H. P.; FODINGER, M.; SIMONITSCH, I.; FRITSCHKE-POLANZ, R.; SCHWARZINGER, I.; TSCHACHLER, E.; SILLABER, C.; HAGEN, W.; GEISLER, K.; CHOTT, A.; LECHNER, K.; VALENT, P. Systemic mastocytosis associated with acute myeloid leukaemia: report

of two cases and detection of the c-kit mutation Asp-816 to Val. **British Journal of Haematology**, v.103, n. 3, p. 740-749, Dec, 1998.

SPORN, M. B.; ROBERTS, A.B. Role of retinoids in differentiation and carcinogenesis. **Cancer Research**, v. 43, p. 3034-3040, 1983.

SUBBA RAO, P. V.; FRIEDMAN, M. M.; ATKINS, F. M.; METCALFE, D. D. Phagocytosis of mast cell granules by cultured fibroblasts. **Journal of Immunology**, v. 130, p. 341-349, 1983.

THAMM, D. H.; VAIL, D. M. Mast cell tumors. In: WITHROW S.J., MACEWEN, E.G. (Ed.). **Small animal clinical oncology**. 3rd ed. Philadelphia: WB Saunders, p. 261-282, 2001.

THAMM, D. H.; MAULDIN, E. A.; VAIL, D. M. Prednisone and vinblastine chemotherapy for canine mast cell tumor--41 cases (1992-1997). **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 13, n. 5, p. 491-497, Sep-Oct, 1999.

THOMPSON, H. L.; BURBELO, P. D.; SEGUI-REAL, B.; YAMADA, Y.; METCALFE, D. D. Laminin promotes mast cell attachment. **Journal of Immunology**, v. 143, p. 2323-2327, 1989.

THOMPSON, H. L.; BURBELO, P. D.; YAMADA, Y.; KLEINMAN, H. K.; METCALFE, D. D. Identification of an amino acid sequence in the laminin A chain mediating mast cell attachment and spreading. **Immunology**, v. 72, p. 144-149, 1991.

TRAUTMANN, A.; KROHNE, G.; BROCKER, E.B.; KLEIN, C.E. Human mast cells augment fibroblast proliferation by heterotypic cell-cell adhesion and action of IL-4. **Journal of Immunology**, v. 160, n. 10, p. 5053-5057, May, 1998.

TRAVIS, W. M.; CHING-YAND, L. Mast cell disease. In: KALINER, M. A.; METCALFE, D. D. (Ed). **The Mast Cell in Health and Disease**, New York: Dekker, p. 723-741, 1993.

TSAI, M.; TAKASHI, T.; THOMPSON, H.; LANGLEY, K.; ZSEBO, K. M.; METCALFE, D. D.; GEISSLER, E. N.; GALLI, S. J. Induction of mast cell proliferation, maturation and heparin synthesis by the rat c-kit ligand, stem cell factor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of América**, v. 88, p. 6382-6386, 1991.

TSUJIMURA, T.; FURITSU, T.; MORIMOTO, M.; ISOZAKI, K.; NOMURA, S.; MATSUZAWA, Y.; KITAMURA, Y.; KANAKURA, Y. Ligand-independent activation of c-kit receptor tyrosine kinase in a murine mastocytoma cell line P-815 generated by a point mutation. **Blood**, v. 83, n. 9, p. 2619-2626, May, 1994.

TSUJIMURA, T.; FURITSU, T.; MORIMOTO, M.; KANAYAMA, Y.; NOMURA, S.; MATSUZAWA, Y.; KITAMURA, Y.; KANAKURA, Y. Substitution of an aspartic acid results in constitutive activation of c-kit receptor tyrosine kinase in a rat tumor mast cell line RBL-2H3. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 106, n. 4, p. 377-385, Apr, 1995.

ULUKAYA, E.; COLAKOGULLARI, M.; WOOD, E.J. Interference by anti-cancer chemotherapeutic agents in the MTT-tumor chemosensitivity assay. **Chemotherapy**, v. 50, n. 1, p. 43-50, Apr, 2004.

UNGER, E. F.; SHEFFIELD, C. D.; EPSTEIN, S. E. Heparin promotes the formation of extracardiac to coronary anastomoses in a canine model. **The American Journal of Physiology**, v. 260, p. H1625-H1634, 1991, (Heart Circ. Physiol. 29).

VAIL, D. M. Mast cell tumors. In: WITHROW, S.J.; MACEWEN, E.G. **Small animal clinical oncology**, 2^a ed. Philadelphia PA.: WB Saunders, p. 192-210, 1996.

VAIL, D. M.; WITHROW, S. Tumours of the skin and subcutaneous tissues. In: WITHROW, S.; MACEWAN, E. (Ed.). **Small Animal Clinical Oncology**, 3rd ed. Philadelphia, WB Saunders, p. 233–273, 2001.

VERNON, S. W.; TILLEY, B. C.; NEALE, A. V.; STEINFELDT, L. Ethnicity, survival, and delay in seeking treatment for symptoms of breast cancer. **Cancer**, v. 55, n. 7, p. 1563-1571, Apr, 1985.

VON HOFF, D. D.; KRONMAL, R.; SALMON, S. E.; TURNER, J.; GREEN, J. B.; BONORRIS, J. S.; MOORHEAD, E. L.; HYNES, H. E.; PUGH, R. E.; BELT, R. J. A Southwest Oncology Group study on the use of human tumor cloning assay for predicting response in patients with ovarian cancer. **Cancer**, v. 67, n. 1, p. 20-27, Jan, 1999.

WALSH, L. J.; KAMINER, M. S.; LAZARUS, G. S.; LAVKER, R. M.; MIJRPHY, G. F. Role of laminin in localization of human dermal mast cells. **Laboratory Investigation**, v. 65, p. 433-439, 1991.

WEISS, E. Intranuclear and intracytoplasmatic glycogen deposits in mast cell tumours of dogs. **Pathology Veterinary**, v. 2, n. 5, p. 514-519, 1965.

WEISSE, C.; SHOFER, F.; SORENMO, K. Recurrence rates and sites for grade II canine cutaneous mast cell tumors following complete surgical excision. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 38, p. 71–73, 2002.

YAMASHITA, Y.; NAKAGOMI, K.; TAKEDA, T.; HASEGAWA, S.; MISUI, Y. Effect of heparin on pulmonary fibroblasts and vascular cells. **Thorax**, v. 47, p. 634-639, 1992.

ZEMKE, D.; YAMINI, B.; YUZBASCIYAN-GURKAN, V. Characterization of an undifferentiated malignancy as a mast cell tumor using mutation analysis in the proto-oncogene c-KIT. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 13, n. 4, p. 341-345, Jul, 2001.

ZOLI, W.; RICOTTI, L.; TESEI, A.; BARZANTI, F.; AMADORI, D. *In vitro* preclinical models for a rational design of chemotherapy combinations in human tumors. **Critical reviews in oncology/hematology**, v. 37, n. 1, p. 69-82, Jan, 2001.

ZUSI, F.C.; LORENZI, M.V.; VIVAT-HANNAH, V. Selective retinoids and rexinoids in cancer therapy and chemoprevention - Review. **Drug Discovery Today**, v.1, n.7, p.1165-1174, Dec, 2002.

APÊNDICE

Animal nº. 1

Efeito do ácido retinóico (ATRA) em diferentes concentrações por 24 e 120hrs de incubação com células de mastocitoma canino grau II. Teste de citotoxicidade por MTT. Média da absorbância e desvio padrão.

<i>Grupos</i>	24 horas (Média ± DP)	120 horas (Média ± DP)
<i>Controle</i>	0,307 ± 0,038 ⁽ⁿ⁼⁶⁾	0,358 ± 0,026 ⁽ⁿ⁼⁶⁾
5.10⁻⁵ M	0,259 ± 0,033 ⁽ⁿ⁼⁶⁾	0,276 ± 0,043 ^{(n=6) **}
5.10⁻⁶ M	0,265 ± 0,046 ⁽ⁿ⁼⁶⁾	0,299 ± 0,036 ^{(n=6) *}
5.10⁻⁷ M	0,299 ± 0,033 ⁽ⁿ⁼⁶⁾	0,348 ± 0,021 ^{(n=6) #}
5.10⁻⁸ M	0,276 ± 0,028 ⁽ⁿ⁼⁶⁾	0,296 ± 0,040 ⁽ⁿ⁼³⁾

* p<0,05, em comparação ao grupo controle por ANOVA seguido do teste de Tukey-Kramer

**p<0,01, em comparação ao grupo controle por ANOVA seguido do teste de Tukey-Kramer

p<0,01, em comparação ao grupo 5.10⁻⁵ M por ANOVA seguido do teste de Tukey-Kramer

Animal nº. 2

Efeito do ácido retinóico (ATRA) em diferentes concentrações por 24 a 120hrs de incubação com células de mastocitoma canino grau III. Teste de citotoxicidade por MTT. Média de absorbância e desvio padrão.

<i>Grupos</i>	24h (Md ± DP)	48h (Md ± DP)	72h (Md ± DP)	96h (Md ± DP)	120 h (Md ± DP)
<i>Controle</i>	0,278 ± 0,043 ⁽ⁿ⁼⁶⁾	0,309 ± 0,027 ⁽ⁿ⁼⁶⁾	0,303 ± 0,019 ⁽ⁿ⁼⁶⁾	0,316 ± 0,028 ⁽ⁿ⁼⁶⁾	0,300 ± 0,017 ⁽ⁿ⁼⁶⁾
10⁻⁴ M	0,230 ± 0,019 ^{(n=6) **}	0,248 ± 0,023 ^{(n=6) ***}	0,172 ± 0,016 ^{(n=6) ***}	0,166 ± 0,029 ^{(n=6) ***}	0,067 ± 0,012 ^{(n=6) ***}
10⁻⁵ M	0,273 ± 0,014 ^{(n=6) #}	0,348 ± 0,025 ^{(n=4) ###}	0,299 ± 0,025 ^{(n=6) ###}	0,277 ± 0,024 ^{(n=6) ###}	0,273 ± 0,049 ^{(n=6) ###}
10⁻⁶ M	0,246 ± 0,013 ⁽ⁿ⁼⁶⁾	0,315 ± 0,008 ^{(n=6) ###}	0,269 ± 0,032 ^{(n=6) ###}	0,238 ± 0,012 ^{(n=6) *** ###}	0,330 ± 0,068 ^{(n=6) ###}
10⁻⁷ M	0,246 ± 0,008 ⁽ⁿ⁼⁶⁾	0,345 ± 0,024 ^{(n=6) ###}	0,280 ± 0,031 ^{(n=6) ###}	0,283 ± 0,021 ^{(n=6) ###}	0,289 ± 0,062 ^{(n=3) ###}

** p<0,01, em comparação ao grupo controle por ANOVA seguido do teste de Tukey-Kramer

p<0,05, em comparação ao grupo 10⁻⁴ M por ANOVA seguido do teste de Tukey-Kramer

*** p<0,001, em comparação ao grupo controle por ANOVA seguido do teste de Tukey-Kramer

p<0,001, em comparação ao grupo 10⁻⁴ M por ANOVA seguido do teste de Tukey-Kramer

Animal n°. 3

Efeito do ácido retinóico (ATRA) em diferentes concentrações por 24 a 120hrs de incubação com células de mastocitoma canino grau II. Teste de citotoxicidade por MTT. Média de absorbância e desvio padrão.

<i>Grupos</i>	24h (Md ± DP)	48h (Md ± DP)	72h (Md ± DP)	96h (Md ± DP)	120 h (Md ± DP)
<i>Controle</i>	0,250 ± 0,029 (n=6)	0,259 ± 0,019 (n=6)	0,320 ± 0,042 (n=5)	0,309 ± 0,025 (n=6)	0,277 ± 0,022 (n=6)
10⁻⁴ M	0,184 ± 0,020 (n=6) **	0,150 ± 0,026 (n=6) ***	0,163 ± 0,019 (n=6) ***	0,192 ± 0,060 (n=6) ***	0,100 ± 0,010 (n=6) ***
10⁻⁵ M	0,234 ± 0,018 (n=6) #	0,262 ± 0,011 (n=6) ###	0,247 ± 0,020 (n=6) ** ###	0,266 ± 0,013 (n=6) ##	0,207 ± 0,015 (n=6) *** ###
10⁻⁶ M	0,245 ± 0,034 (n=6) ##	0,256 ± 0,014 (n=5) ###	0,216 ± 0,039 (n=6) *** #	0,250 ± 0,007 (n=6) * #	0,206 ± 0,025 (n=6) *** ###
10⁻⁷ M	0,245 ± 0,021 (n=6) ##	0,274 ± 0,011 (n=6) ###	0,238 ± 0,013 (n=6) *** ###	0,257 ± 0,016 (n=6) ##	0,211 ± 0,006 (n=3) *** ###

* p<0,05, em comparação ao grupo controle por ANOVA seguido do teste de Tukey-Kramer

** p<0,01, em comparação ao grupo controle por ANOVA seguido do teste de Tukey-Kramer

*** p<0,001, em comparação ao grupo controle por ANOVA seguido do teste de Tukey-Kramer

p<0,05, em comparação ao grupo 10⁻⁴ M por ANOVA seguido do teste de Tukey-Kramer

p<0,01, em comparação ao grupo 10⁻⁴ M por ANOVA seguido do teste de Tukey-Kramer

p<0,001, em comparação ao grupo 10⁻⁴ M por ANOVA seguido do teste de Tukey-Kramer

Animal n°. 4

Efeito do ácido retinóico (ATRA) em diferentes concentrações por 24 a 120hrs de incubação com células de mastocitoma canino grau III. Teste de citotoxicidade por MTT. Média de absorvância e desvio padrão.

<i>Grupos</i>	24h (Md ± DP)	48h (Md ± DP)	72h (Md ± DP)	96h (Md ± DP)	120 h (Md ± DP)
<i>Controle</i>	0,258 ± 0,011 (n=6)	0,307 ± 0,045 (n=6)	0,317 ± 0,028 (n=5) &	0,279 ± 0,026 (n=6)	0,199 ± 0,035 (n=6) & \$\$\$ @@@ ++
10⁻⁴ M	0,193 ± 0,014 (n=6) ***	0,213 ± 0,012 (n=6) ***	0,197 ± 0,025 (n=6) ***	0,151 ± 0,020 (n=6) ***	0,108 ± 0,018 (n=6) ***
10⁻⁵ M	0,272 ± 0,016 (n=6) ###	0,262 ± 0,011 (n=6) *	0,237 ± 0,020 (n=6) ***	0,193 ± 0,022 (n=6) *** #	0,171 ± 0,014 (n=6) ###
10⁻⁶ M	0,258 ± 0,017 (n=6) ###	0,227 ± 0,012 (n=5) ***	0,251 ± 0,030 (n=6) *** #	0,177 ± 0,011 (n=6) ***	0,166 ± 0,017 (n=6) ###
10⁻⁷ M	0,248 ± 0,013 (n=6) ###	0,238 ± 0,017 (n=6) ***	0,229 ± 0,016 (n=6) ***	0,179 ± 0,016 (n=6) ***	0,159 ± 0,013 (n=3) * ##

* p<0,05, em comparação ao grupo controle por ANOVA seguido do teste de Tukey-Kramer
 ** p<0,01, em comparação ao grupo controle por ANOVA seguido do teste de Tukey-Kramer
 *** p<0,001, em comparação ao grupo controle por ANOVA seguido do teste de Tukey-Kramer
 # p<0,05, em comparação ao grupo 10⁻⁴ M por ANOVA seguido do teste de Tukey-Kramer
 ## p<0,01, em comparação ao grupo 10⁻⁴ M por ANOVA seguido do teste de Tukey-Kramer
 ### p<0,001, em comparação ao grupo 10⁻⁴ M por ANOVA seguido do teste de Tukey-Kramer
 & p<0,05, em comparação ao grupo controle 24 horas por ANOVA seguido do teste de Tukey-Kramer
 \$\$\$ p<0,001, em comparação ao grupo controle 48 horas por ANOVA seguido do teste de Tukey-Kramer
 @@@ p<0,001, em comparação ao grupo controle 72 horas por ANOVA seguido do teste de Tukey-Kramer
 ++ p<0,01, em comparação ao grupo controle 96 horas por ANOVA seguido do teste de Tukey-Kramer

Efeito do ácido retinóico (ATRA) em diferentes concentrações por 24 a 72hrs de incubação com células de recidiva de mastocitoma canino grau III. Teste de citotoxicidade por MTT. Média de absorvância e desvio padrão.

<i>Grupos</i>	24h (Md ± DP)	48h (Md ± DP)	72h (Md ± DP)
<i>Controle</i>	0,256 ± 0,041 ⁽ⁿ⁼⁶⁾	0,325 ± 0,039 ⁽ⁿ⁼⁶⁾	0,234 ± 0,038 ⁽ⁿ⁼⁶⁾
10⁻⁴ M	0,262 ± 0,017 ⁽ⁿ⁼⁶⁾	0,328 ± 0,039 ⁽ⁿ⁼⁶⁾	0,337 ± 0,011 ^{(n=6) ***}
7.10⁻⁴ M	0,277 ± 0,020 ⁽ⁿ⁼⁶⁾	0,270 ± 0,061 ⁽ⁿ⁼⁶⁾	0,325 ± 0,039 ^{(n=5)**}
4.10⁻⁴ M	0,249 ± 0,025 ⁽ⁿ⁼⁶⁾	0,264 ± 0,014 ⁽ⁿ⁼⁶⁾	0,308 ± 0,033 ^{(n=6)*}
10⁻⁵ M	0,292 ± 0,014 ^{(n=6) #}	0,259 ± 0,039 ⁽ⁿ⁼⁶⁾	0,322 ± 0,017 ^{(n=5)**}
10⁻⁶ M	0,282 ± 0,024 ⁽ⁿ⁼⁶⁾	0,300 ± 0,027 ⁽ⁿ⁼⁶⁾	0,292 ± 0,040 ⁽ⁿ⁼⁶⁾
10⁻⁷ M	0,300 ± 0,012 ^{(n=6) *##}	0,263 ± 0,037 ⁽ⁿ⁼⁶⁾	0,296 ± 0,042 ^{(n=6) *}

* p<0,05, em comparação ao grupo controle por ANOVA seguido do teste de Tukey-Kramer
 ** p<0,01, em comparação ao grupo controle por ANOVA seguido do teste de Tukey-Kramer
 *** p<0,001, em comparação ao grupo controle por ANOVA seguido do teste de Tukey-Kramer
 # p<0,05, em comparação ao grupo 4.10⁻⁴ M por ANOVA seguido do teste de Tukey-Kramer
 ## p<0,01, em comparação ao grupo 4.10⁻⁴ M por ANOVA seguido do teste de Tukey-Kramer