



**UFSM**

Dissertação de Mestrado

**MASTÓCITOS EM CONDIÇÕES NORMAIS E  
PATOLÓGICAS COM ÊNFASE EM  
MASTOCITOMAS DE CÃES**

---

**Raquel Rubia Rech**

**PPGMV**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2003**

**MASTÓCITOS EM CONDIÇÕES NORMAIS E  
PATOLÓGICAS COM ÊNFASE EM  
MASTOCITOMAS DE CÃES**

---

**por  
Raquel Rubia Rech**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do  
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária,  
Área de Concentração em Patologia Veterinária, da  
Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS)  
como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Mestre em Medicina Veterinária**

**PPGMV**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2003**

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências Rurais  
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Dissertação de Mestrado

**MASTÓCITOS EM CONDIÇÕES NORMAIS E PATOLÓGICAS  
COM ÊNFASE EM MASTOCITOMAS DE CÃES**

elaborada por  
**Raquel Rubia Rech**

como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Mestre em Medicina Veterinária**

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

---

**Dominguita Lühers Graça**  
(Presidente/Orientadora)

---

**Célso Pilati**

---

**Glaucia Denise Kommers**

Santa Maria, 14 de fevereiro de 2003

## AGRADECIMENTOS

“No caminho encontrarás muitas provas, e elas te fortalecerão”. O que seria da caminhada sem a influência das pessoas que permitem nosso crescimento pessoal e profissional?

Em primeiro lugar, agradeço à professora Dominguita Lühers Graça pela compreensão e carinho “maternais”, apoio, contribuição na minha formação profissional e orientação na elaboração desta dissertação.

Aos professores Célsio Pilati e Dalmo da Silva Neves pelo incentivo inicial e despertar do meu interesse na área de Patologia Veterinária, além da amizade e companheirismo.

Ao professor Claudio Barros pelo exemplo de entusiasmo como patologista e ensinamentos em Patologia Veterinária, transmitidos durante esse período.

À professora Glaucia Kommers pela amizade, ensinamentos e confecção das fotografias microscópicas deste trabalho. Ao professor Luiz Francisco Irigoyen pelos conhecimentos transmitidos.

Aos meus familiares e todos meus amigos pela compreensão e constante incentivo nessa caminhada. Nessas horas, a saudade torna-se a memória do coração...

Aos amigos do Setor de Patologia Veterinária Fabiano Oliveira, Margarida Raffi, Shana Garmatz e Simone Sallis pelas horas de estudos comunitários e inúmeros momentos de descontração. Aos colegas do Setor, Aline Rodrigues, Cristina Krauspenhar, Daniela Rozza, Ingeborg Langohr, Márcia da Silva, Marta Rodrigues, Odair Avi, Rafael Figuera, Ricardo Barros e Tatiana de Souza pela pluralidade de idéias e atitudes que permitiram o crescimento pessoal.

Aos técnicos Sergio Perez da Silva, Sergio Augusto Ribeiro e Rosmarina pelas preparações histológicas deste estudo.

Ao professor José Henrique pela realização da análise estatística dos resultados desse trabalho.

À CAPES pela concessão da bolsa de mestrado.

E finalmente, aos companheiros da República “Autista”: Maicon, Yuri, Isa, Gabi, Fabi, Beto, Elizandra, Dallas, Rosana, Juliano e Eduardo pelo ótimo convívio, longas conversas, diversas festas, e principalmente pela amizade. Muito obrigada.

## SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS .....	iv
LISTA DE TABELAS .....	viii
LISTA DE QUADROS .....	ix
LISTA DE FIGURAS .....	xi
LISTA DE REDUÇÕES .....	xv
LISTA DE ANEXOS .....	xvii
LISTA DE APÊNDICES .....	xviii
RESUMO.....	xix
ABSTRACT .....	xx
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 Origem e Diferenciação .....	3
2.2 Morfologia dos mastócitos e métodos para estudo .....	6
2.3 Comparação entre mastócitos e basófilos .....	13
2.4 Ativação dos mastócitos e basófilos.....	17
2.4.1 Ativação dependente do receptor $Fc\epsilon RI$ .....	18
2.4.2 Ativação independente do $Fc\epsilon RI$ .....	20
2.5 Mediadores liberados pelos mastócitos .....	22
2.5.1 Mediadores associados aos grânulos .....	22
2.5.2 Mediadores lipídicos.....	23
2.5.3 Citocinas e Quimiocinas.....	24
2.6 Funções biológicas dos mastócitos .....	24
2.6.1 Inflamação aguda e crônica .....	25
2.6.2 Mastócitos e tecido nervoso.....	26
2.6.3 Imunidade contra patógenos.....	27
2.6.4 Hipersensibilidade do Tipo I.....	29
2.7 Mastocitose.....	34
2.8 Mastocitomas.....	35

3. MATERIAL E METODOLOGIA.....	41
4. RESULTADOS.....	44
4.1 Epidemiologia .....	44
4.2 Classificação dos mastocitomas de acordo com o grau histológico. ....	47
5. DISCUSSÃO .....	54
6. CONCLUSÕES .....	62
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	63

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Mastócitos em condições normais e patológicas com ênfase em mastocitomas de cães. Número anual de biópsias em cães no período de 1980 a 2002.....	44
TABELA 2 – Mastócitos em condições normais e patológicas com ênfase em mastocitomas de cães. Localização anatômica dos mastocitomas em 125 cães.....	46
TABELA 3 – Mastócitos em condições normais e patológicas com ênfase em mastocitomas de cães. Localização anatômica dos 45 mastocitomas classificados por grau histológico.....	49
TABELA 4 – Mastócitos em condições normais e patológicas com ênfase em mastocitomas de cães. Características histológicas dos mastocitomas classificados por grau.....	51



## LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - Mastócitos em condições normais e patológicas com ênfase em mastocitomas de cães. Efeitos das citocinas em mastócitos humanos imaturos e maduros <i>in vitro</i> . (modificado de Bischoff & Sellge, 2002).....	04
QUADRO 2 – Mastócitos em condições normais e patológicas com ênfase em mastocitomas de cães. Características dos mastócitos em roedores. Fonte: Metcalfe <i>et al.</i> , 1997.....	10
QUADRO 3 - Mastócitos em condições normais e patológicas com ênfase em mastocitomas de cães. Produtos dos mastócitos e basófilos humanos. Fonte: Kawakami & Galli, 2002.....	16
QUADRO 4 – Mastócitos em condições normais e patológicas com ênfase em mastocitomas de cães. Fatores que promovem a desgranulação dos mastócitos (Katsambas <i>et al.</i> , 1999).....	22
QUADRO 5 – Mastócitos em condições normais e patológicas com ênfase em mastocitomas de cães. Órgãos de choque na anafilaxia (Slauson & Cooper, 2002).....	31
QUADRO 6 – Mastócitos em condições normais e patológicas com ênfase em mastocitomas de cães. Sistema de estágios clínicos para mastocitomas caninos segundo a OMS.....	38

QUADRO 7 – Mastócitos em condições normais e patológicas com ênfase em mastocitomas de cães. Sistema de graduação histológica dos mastocitomas (Fonte: Patnaik *et al.*, 1984).....42

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Mastócitos em condições normais e patológicas com ênfase em mastocitomas de cães. Origem e desenvolvimento dos mastócitos humanos (modificado de Kirshenbaum, 2000).....05

FIGURA 2 – Mastócitos em condições normais e patológicas com ênfase em mastocitomas de cães. Mastócito metacromático em lesão remielinizada de nervo periférico de rato Wistar. Corte semi-fino. Azul de metileno. Obj. 10.....07

FIGURA 3 – Mastócitos em condições normais e patológicas com ênfase em mastocitomas de cães. Mastócito humano da mucosa bronquial (X19000). No canto superior direito observam-se os grânulos citoplasmáticos em rolos cilíndricos (X54000). Fonte: Ghadially, 1988.....08

FIGURA 4 – Mastócitos em condições normais e patológicas com ênfase em mastocitomas de cães. Morfologia de um mastócito (à esquerda) e basófilo (à direita) na submucosa do íleo de um paciente com doença de Crohn. Os grânulos citoplasmáticos do mastócito (cabeças de seta) são menores do que os do basófilo (setas). Muitos grânulos do basófilo contêm espirais de membranas (setas curvas). Fonte: Kawakami & Galli, 2002).....15

FIGURA 5 – Mastócitos em condições normais e patológicas com ênfase em mastocitomas de cães. Estrutura de cadeia polipeptídica do receptor FcεRI de IgE. A IgE se liga ao domínio tipo Ig da cadeia α. A cadeia β e as cadeias γ medeiam a transdução do sinal. As caixas na região citoplasmática das cadeias β e γ são motivos de ativação de tirosina do imunoreceptor (ITAMs), semelhantes aos achados no complexo do receptor da célula T. Fonte: Abbas <i>et al.</i> , 2000.....	18
FIGURA 6 – Mastócitos em condições normais e patológicas com ênfase em mastocitomas de cães. Ativação dos mastócitos mediada pela IgE. Fonte: Cotran <i>et al.</i> , 2000.....	20
FIGURA 7 – Mastócitos em condições normais e patológicas com ênfase em mastocitomas de cães. Atividades mediadas pela desgranulação dos mastócitos (modificado de Metcalfe <i>et al.</i> , 1997).....	28
FIGURA 8 – Mastócitos em condições normais e patológicas com ênfase em mastocitomas de cães. Patogenia da reação de hipersensibilidade do tipo I. Fonte: Cotran <i>et al.</i> , 2000.....	30
FIGURA 9 – Mastócitos em condições normais e patológicas com ênfase em mastocitomas de cães. Eritema na face ventral do abdômen em um cão atópico. Fonte: Wilkinson & Harvey, 1994.....	33
FIGURA 10 – Mastócitos em condições normais e patológicas com ênfase em mastocitomas de cães. Distribuição, de acordo com a idade, de 2883 biópsias (colunas azuis) e 125 mastocitomas (colunas vermelhas) de cães num período de 23 anos.....	45

FIGURA 11 – Mastócitos em condições normais e patológicas com ênfase em mastocitomas de cães. Distribuição, de acordo com a raça, de 2883 biópsias (colunas azuis) e 125 mastocitomas (colunas vermelhas) de cães num período de 23 anos.....	46
FIGURA 12 – Mastócitos em condições normais e patológicas com ênfase em mastocitomas de cães. Mastocitoma cutâneo bem diferenciado (grau I). Células de aspecto uniforme (Grau I). H&E. Barra = 40 µm. Detalhe: maior aumento da Figura 12. Barra = 30 µm.....	47
FIGURA 13 – Mastócitos em condições normais e patológicas com ênfase em mastocitomas de cães. Mastocitoma cutâneo moderadamente diferenciado (grau II). Pleomorfismo moderado. H&E. Barra = 40 µm. Detalhe: maior aumento da Figura 13. Barra = 30 µm.....	48
FIGURA 14 – Mastócitos em condições normais e patológicas com ênfase em mastocitomas de cães. Mastocitoma cutâneo pouco diferenciado (grau III). Pleomorfismo acentuado. H&E. Barra = 40 µm. Detalhe: maior aumento da Figura 14. Barra = 30 µm.....	48
FIGURA 15 – Mastócitos em condições normais e patológicas com ênfase em mastocitomas de cães. No citoplasma de mastócitos observam-se grânulos metacromáticos. Azul de Toluidina. Barra = 40 µm. Detalhe: maior aumento da Figura 15. Barra = 30 µm.....	50
FIGURA 16 – Mastócitos em condições normais e patológicas com ênfase em mastocitomas de cães. Mastocitoma cutâneo canino. Os pontos pretos representam as regiões organizadoras nucleolares argirofílicas (AGNOR). A. Mastocitoma de grau I (AgNOR = 1,6). B. Mastocitoma de grau III (AgNOR= 4,2). Barra = 30 µm.....	52

FIGURA 17 – Mastócitos em condições normais e patológicas com ênfase em mastocitomas de cães. Associação entre o grau histológico e a frequência de AgNOR de 45 mastocitomas em cães. As linhas horizontais (vermelhas) representam a média de AgNOR em cada grau.....53

## LISTA DE REDUÇÕES

<b>CAM</b>	Cell adhesion molecules	Moléculas de adesão celular
<b>CC</b>	$\alpha$ -chemokines	$\alpha$ -quimiocinas
<b>CCP</b>	-	Proteína dos granulócitos associada ao CD25
<b>CD</b>	Cluster of differentiation	Antígenos de diferenciação
<b>CTMC</b>	Connective tissue mast cell	Mastócito do tecido conjuntivo
<b>CXC</b>	$\beta$ -chemokines	$\beta$ -quimiocinas
<b>Fc<math>\epsilon</math>RI</b>	High affinity IgE receptor	Receptor de alta afinidade para IgE
<b>FGF</b>	Fibroblast growth factor	Fator de crescimento de fibroblasto
<b>GM-CSF</b>	Granulocytes monocytes stimulating colony factor	Fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos
<b>gp53</b>	Glycoprotein 53	Glicoproteína 53
<b>HLA</b>	Human leukocyte antigen	Antígeno leucocitário humano
<b>ICAM</b>	Intercellular adhesion molecules	Molécula de adesão intercelular
<b>IFN</b>	Interferon	Interferon
<b>Ig</b>	Immunoglobulin	Imunoglobulina
<b>IL</b>	Interleukin	Interleucina
<b>ITAM</b>	Immunoreceptor tyrosine-based activation motif	Motivos ativadores baseados nos imunoreceptores de tirosina
<b>LT</b>	Leukotrienes	Leucotrienos
<b>MAC</b>	Membrane attack complex	Complexo de ataque à membrana
<b>MadCAM-1</b>	Addressin	Proteína de adesão celular
<b>MC</b>	Mast cell	Mastócito
<b>MCP</b>	Monocyte chemoattractant protein	Proteína quimiotática monocitária
<b>MHC</b>	Major histocompatibility complex	Complexo de histocompatibilidade principal
<b>MIP</b>	Macrophage inflammatory protein	Proteína inflamatória macrófaga
<b>MMC</b>	Mucosal mast cell	Mastócito da mucosa

<b>NGF</b>	Nerve growth factor	Fator de crescimento neural
<b>NK</b>	Natural killers	Matadoras naturais
<b>PAF</b>	Platelet activating factor	Fator de ativação plaquetária
<b>PDGF</b>	Platelets derived growth factor	Fator de crescimento derivado das plaquetas
<b>PG</b>	Prostaglandins	Prostaglandinas
<b>PSGL</b>	P-selectin glycoprotein ligand-1	Glicoproteína ligante de P-selectina
<b>RANTES</b>	Regulated upon activation normal T-cell expressed and secreted	Regulado na ativação, expresso e secretado por células T normais
<b>SCF</b>	Stem cell factor, steel factor or mast cell growth factor, c-kit ligand	Fator de célula-tronco
<b>T/C</b>	Tryptase/chimase	Triptase/quimase
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Transforming growth factor $\beta$	Fator de crescimento transformador $\beta$
<b>Th</b>	Helper T lymphocyte	Linfócito T auxiliar
<b>TNF</b>	Tumor necrosis factor	Fator de necrose tumoral
<b>TPO</b>	Trombopoetin	Trombopoetina
<b>VCAM</b>	Vascular adhesion molecule	Molécula de adesão vascular
<b>VEGF/VPF</b>	Vascular endothelial growth factors	Fatores de crescimento endotelial vascular
<b>VLA</b>	Very late activation	Antígenos muito tardios de ativação



## LISTA DE ANEXOS

ANEXO A – Mastócitos em condições normais e patológicas com ênfase em mastocitomas de cães. Coloração de AgNOR.....79

ANEXO B – Mastócitos em condições normais e patológicas com ênfase em mastocitomas de cães. Antígenos CD relacionados aos mastócitos e basófilos.....80

ANEXO C – Mastócitos em condições normais e patológicas com ênfase em mastocitomas de cães. Citocinas e seus receptores relacionados com mastócitos e basófilos.....82

ANEXO D – Mastócitos em condições normais e patológicas com ênfase em mastocitomas de cães. Principais quimiocinas e seus receptores relacionados com mastócitos e basófilos.....83

## LISTA DE APÊNDICES

APÊNDICE A – Mastócitos em condições normais e patológicas com ênfase em mastocitomas de cães. Número anual de cães com menos de 6 anos e 6 anos de idade ou mais.....	84
--	----

## **RESUMO**

Dissertação de Mestrado

Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária

Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

### **MASTÓCITOS EM CONDIÇÕES NORMAIS E PATOLÓGICAS COM ÊNFASE EM MASTOCITOMAS DE CÃES**

AUTORA: RAQUEL RUBIA RECH

ORIENTADORA: DOMINGUITA LÜHERS GRAÇA

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 14 de fevereiro de 2003.

Foi realizada revisão sobre mastócitos como células importantes na imunidade e em condições patológicas de humanos e animais. A literatura consultada mostra a descoberta de numerosas funções dessas células e seu envolvimento em novas patogenias, bem como um aumento do número de modelos experimentais desenvolvidos com o emprego das técnicas mais avançadas. Dentre as patologias dos mastócitos, destaca-se a ocorrência de mastocitomas como a patologia de mastócitos mais prevalente em cães. Foi realizado um levantamento retrospectivo dos mastocitomas em cães remetidos ao Setor de Patologia Veterinária do HCV/UFSM entre 1980 e 2002. Os mastocitomas ocorreram em 16,2% das biópsias de pele e 23,2% das neoplasias cutâneas. Dos 125 mastocitomas diagnosticados no período, 45 foram selecionados aleatoriamente e classificados por grau histológico através do uso de H&E. Foram empregados os métodos de azul de toluidina e AgNOR para, respectivamente, evidenciar os grânulos citoplasmáticos e avaliar o índice de proliferação celular. Dos 45 tumores estudados, diversas características histológicas foram observadas, como distribuição das células na pele, tamanho, forma, aspecto de citoplasma e núcleo, quantidade de estroma, presença de eosinófilos e alterações associadas. Com base nesses parâmetros, 37,8% dos mastocitomas foram classificados como grau I; 51,1% como grau II e 11,1% como grau III. A média geral de AgNOR nos mastocitomas foi de 1,9 (1,2 a 4,3) e média em cada grau foi respectivamente para os Graus I, II e III de 1,5; 1,85 e 3,25. A técnica de AgNOR é de fácil execução, custo acessível e confiável como meio auxiliar para predizer um prognóstico mais objetivo para os mastocitomas.

**Palavras-chave:** mastócitos, mastocitomas, cães, azul de toluidina, AgNOR

## **ABSTRACT**

MS Dissertation in Veterinary Medicine  
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária  
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

### **MASTÓCITOS EM CONDIÇÕES NORMAIS E PATOLÓGICAS COM ÊNFASE EM MASTOCITOMAS DE CÃES**

**(MAST CELLS IN NORMAL AND PATHOLOGICAL CONDITIONS  
WITH EMPHASIS ON MAST CELL TUMORS IN DOGS)**

AUTHOR: RAQUEL RUBIA RECH

ADVISER: DOMINGUITA LÜHERS GRAÇA

Santa Maria, February 14, 2003.

A review on mast cells, outstanding cells on immunity and pathological conditions of humans and animals, was performed. New functions of these cells as well as their involvement in the pathogenesis of known diseases was emphasized in many experimental models that employ advanced molecular techniques. The most prevalent canine mast cell pathology is the mast cell tumor. A retrospective study of canine cutaneous mast cell tumors was made from the files of the Pathology Unit of the Pathology Department of the Universidade Federal de Santa Maria, Brazil, between 1980 and 2002. Mast cell tumors summed up 125 and corresponded to 16,2% of skin biopsies and 23,2% of all cutaneous tumors. From those 125, 45 were randomly selected and classified histologically on haematoxylin and eosin-stained sections. Toluidine blue and AgNOR methods were employed to enhance the intracytoplasmic granules and to assess cell proliferation, respectively. From these 45 samples, histological features were observed as cell distribution, size, shape, nuclear and cytoplasmic appearance, amount of stroma, presence of eosinophils and some associated changes. Based on those features, 37,8% of the mast cell tumors were classified as grade I, 51,1% as grade II and 11,1% as grade III. General AgNOR mean value was 1,9 (range 1,2-4,3) whereas for grades I, II and III the mean value was 1,2; 1,85 and 3,25 respectively. The AgNOR method is feasible, cheap and a reliable tool to predict a more accurate prognosis for mast cell tumors.

**Key-words:** mast cells, mast cell tumors, dogs, toluidine blue, AgNOR

## 1. INTRODUÇÃO

Desde a sua descoberta em tecidos conjuntivos humanos, por Paul Ehrlich no final do século XIX (Marone *et al.*, 1997; Kirshenbaum, 2000) os mastócitos têm se destacado, através de diversas pesquisas ao longo dos anos, por sua diversidade biológica (Metcalfe *et al.*, 1997). São células complexas, multifuncionais que tem papel central na imunidade natural e na adquirida (Kirshenbaum, 2000).

As pesquisas mais recentes concentram-se no estudo dos fatores teciduais e celulares que controlam o número e a função dos mastócitos (Kirshenbaum, 2000), já que sua ubiquidade e funcionalidade são primordiais às funções de defesa do organismo.

O tecido mais acessível para o estudo da atividade dos mastócitos tem sido a pele, desde o trabalho pioneiro de Blackley em 1865 (Charlesworth, 1997) e os resultados obtidos desde então, são de aplicação para tecidos menos acessíveis como o parênquima pulmonar. Os modelos experimentais que usam a pele, são fundamentais para a obtenção de informação, relativa ao papel desempenhado por moléculas de adesão no tráfego de células inflamatórias do sangue periférico para os locais de inflamação (Bochner & Schleimer, 2001). O padrão e a cinética de mediadores pré-formados e sintetizados pelos mastócitos ativados, têm sido elucidados através do uso desses modelos (Charlesworth, 1997).

Em cães, as principais patologias relacionadas com os mastócitos são as reações de hipersensibilidade tipo I local e sistêmica (Tizard, 1998; Jones *et al.*, 2000) e os mastocitomas (Scott *et al.*, 1996b). Mastocitoma é a neoplasia cutânea mais freqüente do cão, compreende 7 a 21% dos tumores cutâneos caninos (Rogers, 1996; Vail, 1996). O diagnóstico definitivo é realizado por preparações citológicas e histológicas. Para um prognóstico acurado, é necessário avaliar o grau histológico pelo método

de rotina (H&E), com auxílio de colorações especiais como Azul de toluidina e AgNOR (argirophilic nucleolar organizer region) (Simões *et al.*, 1994; Ginn *et al.*, 2000).

Os objetivos desse estudo foram atualizar o conhecimento dos processos fisiológicos e patológicos que envolvem mastócitos, fazer um levantamento dos mastocitomas diagnosticados em cães entre 1980 e 2002 no Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal de Santa Maria, bem como introduzir a técnica de AgNOR no laboratório.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

Os mastócitos são células de origem hematopoética de longa vida que mantêm a capacidade de proliferar após a maturação. Embora sejam associadas a reações danosas ao indivíduo como a anafilaxia, são células efectoras multifuncionais, ativadoras potenciais de respostas imunes dependentes de linfócitos T, essenciais na defesa contra helmintos e componentes da imunidade contra bactérias (Zappulla *et al.*, 2002).

### 2.1 Origem e Diferenciação

Os mastócitos derivam de células pluripotenciais da medula óssea que expressam o antígeno CD34 (Golkar & Bernhard, 1997; Katsambas *et al.*, 1999), e iniciam sua diferenciação sob a influência do SCF e da IL-3 (Robbie-Ryan & Brown, 2002) de uma linhagem distinta dos monócitos e macrófagos e dos precursores dos granulócitos (Scott & Stockham, 2000). Essas células CD34<sup>+</sup> respondem a várias citocinas hematopoéticas (Denburg, 1995). Os precursores dos mastócitos circulam no sangue periférico de roedores como células não-granulares com uma densidade de 1.060-1070 g/ml (Metcalfe *et al.*, 1997) em baixos títulos (Katsambas *et al.*, 1999) antes de migrarem para os tecidos.

O crescimento e maturação dos mastócitos dependem de diversos fatores: origem do tecido, uso de células mononucleares ou CD34<sup>+</sup> como população inicial ou o uso de SCF combinado a outras citocinas (Kirshenbaum, 2000).

Em mastócitos murinos e humanos, a aquisição de receptores de superfície e componentes intracelulares que caracterizam essas células como maduras ou totalmente diferenciadas, ocorre por um processo gradual realizado principalmente pelo SCF que se liga ao receptor

tirosina-quinase *c-kit* expresso na membrana dos mastócitos (Wedemeyer & Galli, 2000; Galli, 2000). O receptor *c-kit* também é expresso por melanócitos, gametócitos e em 70% das células CD34<sup>+</sup> na medula óssea. O SCF é produzido por células endoteliais, fibroblastos e células epiteliais e age em conjunto com diversas citocinas (Ashman, 1999) que incluem IL-3, IL-4, IL-9, IL-10 e NGF (Metcalf *et al.*, 1997; Scott & Stockham, 2000). Os mastócitos são expostos continuamente ou seqüencialmente a esses fatores de crescimento (Galli, 2000). As principais citocinas relacionadas com o crescimento e maturação dos mastócitos estão no Quadro 1.

QUADRO 1 - Mastócitos em condições normais e patológicas com ênfase em mastocitomas de cães. Efeitos das citocinas em mastócitos imaturos e maduros *in vitro*.

<b>Mastócitos</b>	<b>Imaturos</b>	<b>Maduros</b>
<b>Crescimento</b>	SCF IL-3 IL-5 IL-6 IL-9 GM-CSF NGF TPO	SCF IL-3 (intestinais) IL-4
<b>Maturação</b>	IL-4 IFN- $\alpha$ IFN- $\gamma$ TGF- $\beta$	

Modificado de Bischoff & Sellge, 2002.

Além de expressarem o receptor *c-kit*, os mastócitos expressam Fc $\epsilon$ RI e Fc $\gamma$ RII/III nos estágios iniciais de desenvolvimento antes de exibirem a maturação granular completa para serem reconhecidos morfologicamente (Metcalf *et al.*, 1997).

O modelo experimental utilizado para analisar o desenvolvimento e função dos mastócitos *in vivo* utiliza camundongos *Kit<sup>W</sup>/Kit<sup>W-v</sup>*. Esses camundongos são anêmicos, e virtualmente não possuem mastócitos, células germinativas e melanócitos, defeitos gerados por mutações que afetam ambas as cópias do *c-kit* (Galli, 2000). A atividade dos mastócitos nesses camundongos pode ser seletivamente reconstituída, transferindo



mastócitos imaturos derivados da medula óssea de camundongos cogênicos normais (Yong, 1997; Galli, 2000). Essa técnica produz camundongos “knockin”. Nesses animais é possível observar as diferentes respostas imunes na presença ou ausência dos mastócitos, bem como analisar a função dos mastócitos nos diferentes tecidos (Wedemeyer & Galli, 2000).

Segundo estudos prévios, células progenitoras pluripotenciais deram origem a células progenitoras bipotenciais  $CD34^+/c-kit^+/CD13^+$  na medula óssea e sangue periférico que formam exclusivamente mastócitos e monócitos. Os progenitores dos mastócitos humanos foram  $CD38^+/CD33^+/HLA-DR^+$  e mais de 80% foram quimase-triptase positivos (Figura 1) (Kirshenbaum, 2000).

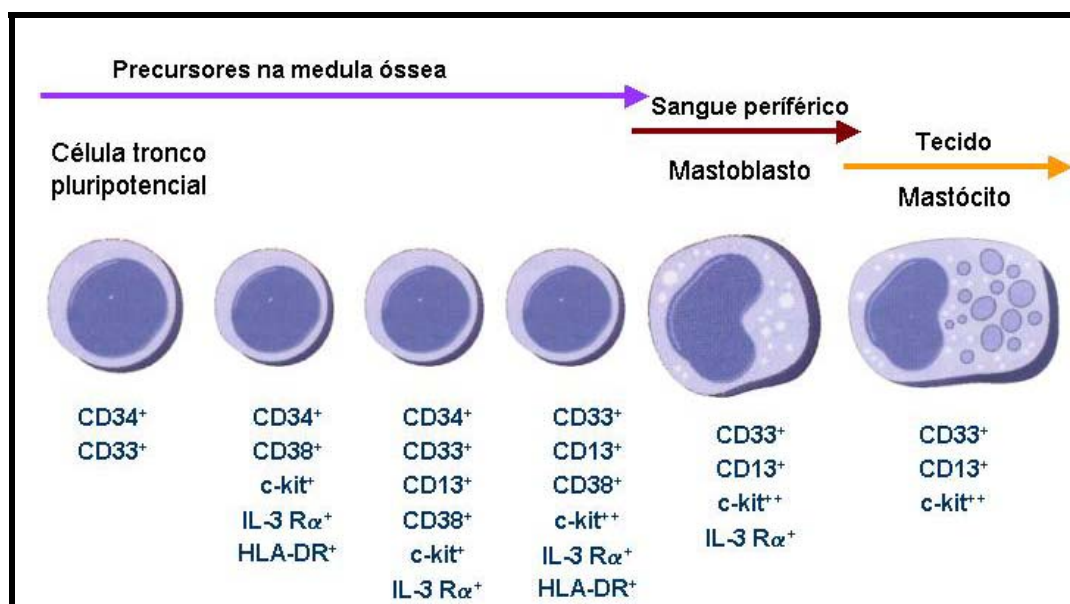


FIGURA 1 – Mastócitos em condições normais e patológicas com ênfase em mastocitomas de cães. Origem e desenvolvimento dos mastócitos humanos (modificado de Kirshenbaum, 2000).

Em mastócitos cultivados *in vitro*, durante a sua maturação essas células expressam uma variedade de integrinas como VLA-4, VLA5, p150,95, CD51 e CD61. Essas moléculas de superfície são importantes na determinação da adesão e migração dos mastócitos para os tecidos

(Katsambas *et al.*, 1999). Durante a diferenciação dos mastócitos, há expressão dos seguintes receptores quimiotáticos: CXCR2, CXCR4 e CCR5; mas quando maduros expressam apenas CCR3. As células epiteliais produzem uma ampla variedade de CCR3, quimiocinas ativas que influenciam nas mudanças de migração e localização dos mastócitos (Bochner & Schleimer, 2001).

Os precursores dos mastócitos migram da circulação para os tecidos periféricos, onde se relacionam intimamente com vasos sangüíneos e linfáticos, nervos periféricos e superfícies epiteliais (Golkar & Bernhard, 1997; Kawakami & Galli, 2002). Nesses locais, expressam o fenótipo final sob a influência do SCF e outras citocinas localmente produzidas como IL-3, IL-4, IL-9 e IL-10 (Metcalf *et al.*, 1997; Scott & Stockham, 2000). A maturação dos mastócitos é altamente dependente dos fatores microambientais produzidos pelos tecidos nos quais eles residem (Metcalf *et al.*, 1997).

## **2.2 Morfologia dos mastócitos e métodos para estudo**

A morfologia dos mastócitos depende da sua localização. No tecido conjuntivo são arredondados, em aposição a vasos são alongados a ovóides e nas fibras dermais são fusiformes, estrelados ou filiformes (YONG, 1997).

O mastócito maduro é uma célula relativamente grande, fusiforme, poligonal ou oval, de 15 a 20  $\mu\text{m}$  com citoplasma levemente eosinofílico contendo grânulos no seu interior. O núcleo é basofílico, levemente excêntrico e relativamente grande, com 4 a 7  $\mu\text{m}$  de diâmetro e múltiplos agregados de cromatina. Um ou mais nucléolos podem estar presentes. O mastócito é caracterizado por grânulos citoplasmáticos de 0,2 a 1,5  $\mu\text{m}$  de diâmetro (Young, 1997; Tizard, 1998; Katsambas *et al.*, 1999). Os grânulos citoplasmáticos tornam-se mais conspícuos por colorações

especiais, principalmente azul de toluidina que evidenciam a propriedade de metacromasia (Figura 2) (Katsambas *et al.*, 1999; Wedemeyer & Galli, 2000). Os grânulos usualmente ocupam 50 a 55% do citoplasma (Young, 1997).

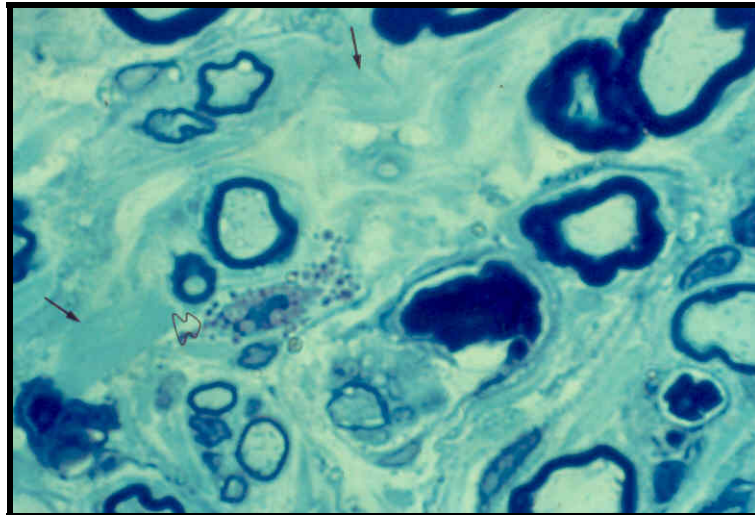


FIGURA 2 – Mastócitos em condições normais e patológicas com ênfase em mastocitomas de cães. Mastócito metacromático em lesão remielinizada de nervo periférico de rato Wistar. Corte semi-fino. Azul de metileno. Obj. 10.

Mastócitos são residentes normais de muitos tecidos, incluindo medula óssea e linfonodos. Em cães saudáveis, foram encontrados 1 a 16 mastócitos/lâmina de aspirados de linfonodo. Mastócitos diferenciados não são reconhecidos no sangue de mamíferos domésticos saudáveis (Scott & Stockham, 2000).

Do ponto de vista ultra-estrutural, há diferenças entre mastócitos imaturos e maduros. Os mastócitos imaturos circulam no sangue como precursores agranulares e desenvolvem grânulos após migrarem para os tecidos conjuntivos. Possuem o núcleo grande com cromatina dispersa e grande nucléolo. No citoplasma há maior número de ribossomos arranjados em rosetas livres ou ligados ao retículo endoplasmático, numerosos corpos lipídicos e pequenas estruturas pré-granulares com densidade condensada centralmente (Dvorak, 1995).

Os mastócitos maduros são caracterizados por grande número de grânulos secretores ligados a membrana. O núcleo é único, grande, com cromatina parcialmente condensada. A membrana celular possui longas e finas pregas. No citoplasma há pequenos complexos de Golgi, vários agregados de filamentos intermediários, corpos lipídicos não-ligados a membrana e pequenos ribossomos, muitos dos quais não estão ligados ao retículo endoplasmático. Os grânulos secretórios têm diversas formas ultra-estruturais: espiralados, cristalinos, ou em partículas. Pode existir um formato predominante ou a combinação deles (Ghadially, 1988; Dvorak, 1995). Os grânulos característicos dos mastócitos humanos contêm estruturas lamelares ou membranosas que estão dispostas em rolos cilíndricos semelhantes a papiros, e formações membranosas laminadas freqüentemente vistas em uma matriz eletrodensa (Figura 3). Em raras ocasiões, os grânulos contêm estruturas particuladas (Ghadially, 1984).

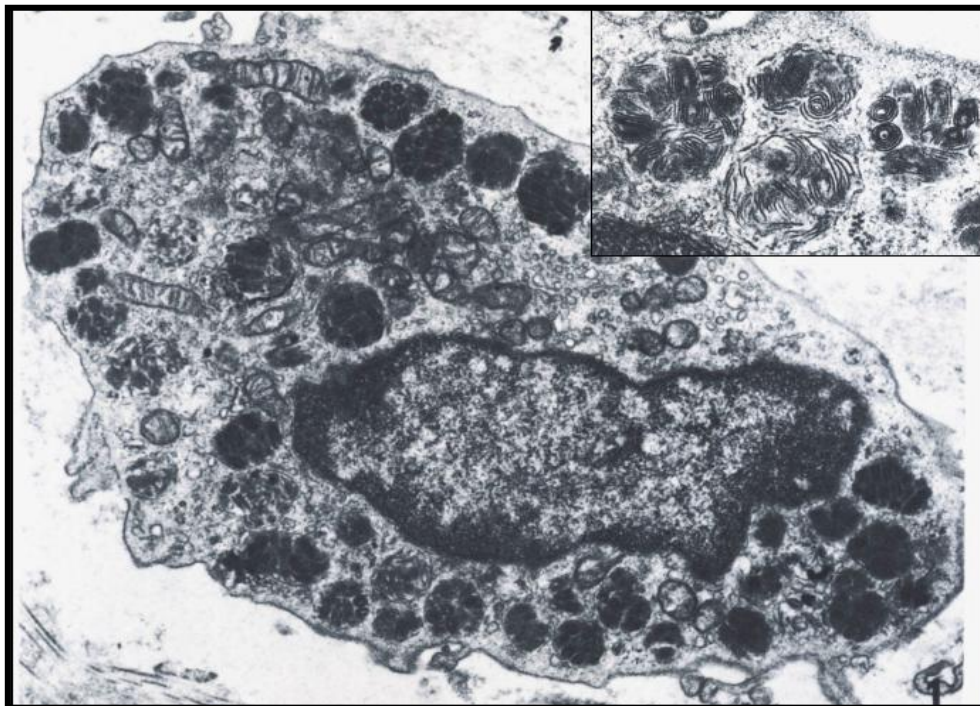


FIGURA 3 – Mastócitos em condições normais e patológicas com ênfase em mastocitomas de cães. Mastócito humano da mucosa bronquial (X19000). No canto superior direito observam-se os grânulos citoplasmáticos em rolos cilíndricos (X54000).  
Fonte: Ghadially, 1988.

No interior dos grânulos citoplasmáticos, certas substâncias são produzidas, estocadas e liberadas pelo processo de desgranulação. Simultaneamente ocorre a síntese de novos mediadores (Katsambas *et al.*, 1999). Os mediadores pré-formados incluem aminas biogênicas como histamina e serotonina (essa última somente em ratos e camundongos), enzimas (triptase, quimase, carboxipeptidase, catepsina G, hidrolases ácidas, fosfolipase, aminopeptidase e hexoaminodase) e proteoglicanos (heparina e sulfato de condroitina). Os mediadores sintetizados incluem IL1-8, TNF- $\alpha$ , IL-12, IL-13, IL-15, quimiocinas, fatores de crescimento e de angiogênese (VEGF e PDGF), bem como prostaglandinas e leucotrienos (Scott & Stockman, 2000; Robbie-Ryan & Brown, 2002).

A desgranulação dos mastócitos também segue uma seqüência de eventos característicos e pode ocorrer de duas formas. Na exocitose, após a ativação por diversos estímulos, a membrana e a matriz dos grânulos destacam-se e fusionam-se, formando canais de desgranulação. A fusão de um canal com a membrana citoplasmática promove a entrada de fluido extracelular, dispersão e dissolução dos grânulos. O processo final de expulsão leva à formação de grandes pacotes exocíticos que se abrem para o espaço extracelular (Dvorak, 1995; Jolly *et al.*, 2001). Os grânulos ficam maiores e perdem a eletrodensidade. Na desgranulação seqüencial ou fragmentada há redução do número dos grânulos e do seu conteúdo eletrodenso e é característica dos mastócitos em tecidos cronicamente inflamados (Beil *et al.*, 2000). Quando os mastócitos desgranulam total ou parcialmente, os grânulos alteram suas propriedades tintoriais e podem se apresentar como grânulos acidofílicos. Outros podem ficar com pequenos a grandes vacúolos no seu citoplasma (Ghadially, 1988).

Mastócitos de diferentes espécies e teciduais da mesma espécie possuem variações quantitativas, bioquímicas, histoquímicas e funcionais. São numerosos no homem, macaco, camundongo, rato e peixe; mas escassos no coelho (Young, 1997).

Em 1966, Enerbäch estabeleceu o conceito de heterogeneidade dos mastócitos. Examinando o intestino de ratos, ele observou que os mastócitos da submucosa eram muito semelhantes aos dos outros tecidos conjuntivos (CTMC) enquanto aqueles da mucosa (MMC) eram menores e de formas variáveis (Forsythe & Ennis, 2000). Diante dessas observações, foram estabelecidas duas categorias de mastócitos em camundongos (CTMC e MMC), determinados pela localização e pela dependência da ativação pelas células T. Os MMCs são altamente sensíveis à estimulação pelas células T (Mota, 1995; Metcalfe *et al.*, 1997; Zappulla *et al.*, 2002). No quadro 2 incluem-se as principais diferenças fenotípicas das duas subpopulações de mastócitos em roedores.

QUADRO 2 – Mastócitos em condições normais e patológicas com ênfase em mastocitomas de cães. Características dos mastócitos em roedores.

Características	Mastócitos da cavidade peritoneal	Mastócitos da mucosa intestinal
<b>Nomes alternativos</b>	mastócitos do tecido conjuntivo ou típicos	mastócitos da mucosa ou atípicos
<b>Tamanho</b>	10-20 $\mu\text{m}$	5-10 $\mu\text{m}$
<b>Fixação em formaldeído</b>	resistente	sensível
<b>Dependência das células T</b>	não	sim
<b>Conteúdo de proteases</b>	quimase (RMCP I)	quimase (RMCP II)
<b>Massa molecular de proteoglicanos</b>	Heparina 750-1000kDa	sulfato de condroitina B 100-150 kDa
<b>Histamina</b>	10-20 pg/cell	0,5 pg/cell
<b>PGD<sub>2</sub></b>	+	+
<b>LTC<sub>4</sub></b>	-	++
<b>Ativado por</b>		
- agregação do Fc $\epsilon$ RI	sim	sim
- composto 48/80	sim	não
- substância P	sim	não

Fonte: Metcalfe *et al.*, 1997.

Os mastócitos humanos são classificados principalmente pela presença de duas proteases neutras denominadas quimase e triptase (Zappulla *et al.*, 2002). De acordo com o conteúdo das proteases neutras há 3 subtipos: triptase e quimase (MC<sub>TC</sub>), quimase (MC<sub>C</sub>) e triptase (MC<sub>T</sub>). Em termos de localização, os MC<sub>T</sub> correspondem aos MMC de

roedores, e os MC<sub>TC</sub> correspondem aos CTMC (Metcalf *et al.*, 1997). Os MC<sub>TC</sub> também possuem catepsina G e carboxipeptidase.

Diversos estudos usando diferentes colorações, técnicas enzimo-histoquímicas e imunoistoquímicas avaliaram o fenótipo dos mastócitos em diversos locais e diferentes espécies (Beil *et al.*, 2000; Jolly, *et al.*, 2000; Shimizu, *et al.*, 2001). A diversidade funcional dos mastócitos em humanos é muito mais complexa que a divisão em três fenótipos. Diferenças na resposta, morfologia e tamanhos dos grânulos ocorrem em mastócitos da mesma subpopulação (Zappulla *et al.*, 2002). Em animais domésticos e de laboratório observam-se diferenças na quantidade de triptase e quimase nos mastócitos de diversos locais do organismo (Jolly, *et al.*, 2000; Shimizu, *et al.*, 2001).

Os grânulos dos mastócitos têm diversas formas dependendo da composição de diferentes proteases. Apenas os grânulos com quimase têm subestrutura lamelar, enquanto que apenas regiões que não possuem essa protease têm padrão espiralado (Schwartz & Kepley, 1994). Os mastócitos da interface, como pulmonares e intestinais, possuem grânulos secretórios em forma de cristais enrolados, portanto contêm triptase. O outro grupo de mastócitos interage com a microvasculatura e rede neural e é encontrado no tecido conjuntivo de diversos órgãos como a pele, submucosa intestinal, parênquima da mama e linfonodos. Esses mastócitos têm poucos grânulos enrolados e contêm triptase e quimase (McNeil, 1996).

Os grânulos coram-se metacromaticamente com certos corantes básicos, provavelmente naqueles grânulos que possuem proteoglicanos: sulfato de condroitina e heparina. Esses por sua vez, ligam-se à histamina, proteases neutras e carboxipeptidases primariamente por ligações iônicas que se atraem mutuamente contribuindo para a estocagem desse material em grânulos citoplasmáticos (Beil *et al.*, 2000; Wedemeyer & Galli, 2000). As proteínas dominantes dos grânulos são triptase e quimase que compreendem 25% das proteínas celulares

(Schwartz & Kepley, 1994; Beil *et al.*, 2000). Para observar as proteases é aconselhável usar a solução de Carnoy que proporciona rápida fixação (Culling *et al.*, 1985; Ramirez-Romero *et al.*, 2000). A heparina é liberada dos mastócitos da serosa dos ratos em um complexo macromolecular com quimase. A triptase é estocada separadamente, mas é rica em resíduos de histidina que podem se ligar à heparina (Beil *et al.*, 2000).

Com relação à fixação dos mastócitos, deve-se evitar a desgranulação artificial que pode ser causada por fixadores aquosos. As colorações de Romanowsky e Wright são ideais para corar mastócitos em preparações citológicas. Na coloração de Romanowsky as células são arredondadas, com núcleo redondo a oval, usualmente central e grânulos citoplasmáticos vermelho-púrpura (Scott & Stockham, 2000).

Os métodos histoquímicos mais eficientes para marcação dos mastócitos são: Azul de toluidina em pH baixo e técnicas enzimo-histoquímicas para detectar especificamente triptase ou quimase (Metcalf *et al.*, 1997; Jolly *et al.*, 1999; Jolly *et al.*, 2000). A atividade da quimase é detectada com naftol AS-D cloroacetato e atividade da triptase é detectada com Z-Ala-Ala-Lys-4-metóxi-2-naftilamida (Shimizu *et al.*, 2001). Mesmo assim, a densidade e propriedades de coloração dos mastócitos são influenciadas por diversos fatores como idade e saúde dos animais. Mastócitos imaturos expressam primeiramente proteoglicanos; a expressão de proteases ocorre no estágio final de maturação. Em condições inflamatórias agudas, o número de mastócitos detectáveis diminui, em resposta à desgranulação (Ramirez-Romero *et al.*, 2000).

Nas técnicas imunoistoquímicas utilizam-se anticorpos monoclonais contra triptase e quimase, ou contra receptores de superfície dos mastócitos (Jolly *et al.*, 1999; Jolly *et al.*, 2000; Ramirez-Romero *et al.*, 2000; Ozaki *et al.*, 2002). As proteases são o melhor marcador específico para mastócitos (Marone *et al.*, 1997; Metcalf *et al.*, 1997). Mas diferenças devem ser avaliadas entre diversas espécies. Por exemplo, em bovinos jovens infectados experimentalmente com *Mannheimia*



*haemolytica*, a detecção de mastócitos pelo azul de toluidina é mais sensível que a imunistoquímica usando anticorpo monoclonal anti-humano para triptase, talvez pelo tipo de triptase produzido por cada espécie (Ramirez-Romero *et al.*, 2000).

Análise de receptores de superfície usando uma combinação de imunofluorescência com anticorpos monoclonais e coloração de azul de toluidina ajuda a diferenciar os mastócitos dos basófilos e outras linhagens celulares, além de evidenciar sua heterogeneidade. Mastócitos da pele, pulmão, útero, tonsilas e rim expressam *c-kit*, CD9, CD29, CD43, CD44, CD49D, CD51, CD54, CD59 e CD63. Apenas os mastócitos da pele expressam CD88, e também são responsivos à substância P e à morfina (Beil *et al.*, 2000).

### **2.3 Comparação entre mastócitos e basófilos**

Mastócitos e basófilos são as únicas células em mamíferos que sintetizam histamina e possuem receptores de alta afinidade para IgE. Devido às similaridades funcionais, são consideradas células-irmãs, pois são efetoras nas respostas imunes associadas com a IgE (Galli, 2000; Scott & Stockham, 2000). Embora possuam algumas similaridades, são distingüíveis pela morfologia, localização, mediadores, marcadores de superfície celular e resposta a agentes químicos e fatores de crescimento (Schwartz & Kepley, 1994).

Basófilos são encontrados em números significativos em coelhos, pássaros, lagartixas, mas são escassos em ratos, cobaias, gatos e outros vertebrados superiores. Em algumas espécies, como em ratos, há uma relação inversa no número de basófilos e mastócitos (Yong, 1997).

Mastócitos e basófilos originam-se de células progenitoras pluripotenciais CD34<sup>+</sup>, mas progenitores dos basófilos diferenciam-se em unidades formadoras de colônias de basófilos (CFU-Ba) e completam sua

diferenciação na medula óssea ou outros tecidos hematopoéticos antes de migrarem para a circulação (Denburg, 1995; Galli, 2000). Dessa forma, não há inter-relação entre uma linhagem comum de basófilos e mastócitos, pois cepas mutantes de camundongos “knockout” para mastócitos desafiados com nematódeos demonstraram basofilia, sem reposta mastocítica (Denburg, 1995).

O crescimento e a diferenciação dos basófilos são controlados principalmente pela IL-3, mas GM-CSF, TGF- $\beta$  e IL-5 contribuem nesse processo. O processo de maturação e liberação para a corrente sanguínea leva aproximadamente 2,5 dias (Scott & Stockham, 2000).

Do ponto de vista morfológico, o basófilo é uma célula polimorfonuclear como neutrófilos e eosinófilos, de 10 a 18  $\mu\text{m}$  de diâmetro com núcleo em forma de S e sem nucléolo (Yong, 1997). Representam menos de 0,5% dos leucócitos circulantes (Marone *et al.*, 1997; Wedemeyer e Galli, 2000).

Em esfregaços sanguíneos, os basófilos são maiores que os neutrófilos, são arredondados e contém grânulos citoplasmáticos que se coram metacromaticamente com corantes básicos como azul de toluidina e azul alciano em pH 2,5 (Scott & Stockham, 2000).

O tempo médio de vida circulante dos basófilos é aproximadamente de 6 horas. Sob certas circunstâncias podem ser recrutados para locais de inflamação, em reações dependentes de IgE, principalmente em reações de hipersensibilidade tardia. Nesses casos, estudos *in vitro* indicaram que basófilos podem permanecer por até 2 semanas nesses locais (Marone *et al.*, 1997; Scott & Stockham, 2000). Quando presentes nos tecidos, os basófilos não são identificáveis por avaliação histológica de rotina (Scott & Stockham, 2000).

Ultra-estruturalmente os mastócitos imaturos são distingüíveis dos basófilos maduros pela presença de ribossomos livres no citoplasma, pelo grande número de corpos lipídicos e pelas microvilosidades na superfície citoplasmática (Dvorak, 1995). O basófilo imaturo é aproximadamente 3

vezes maior que o basófilo normal. O núcleo possui um grande nucléolo, não é segmentado e possui cromatina parcialmente dispersa (Dvorak, 1995). As principais diferenças morfológicas ultra-estruturais entre mastócitos e basófilos humanos são relacionadas aos grânulos citoplasmáticos (Figura 4). Os grânulos dos basófilos são em menor quantidade e não são tão pleomórficos. Eles são redondos, rodeados por uma simples membrana contendo partículas eletrodensas de 11-26 nm de diâmetro distribuídos em uma matriz menos eletrodensa. As partículas na periferia são arranjadas concentricamente (Ghadially, 1984). Dentro dos grânulos há a proteína cristal de Charcot-Leyden, uma lisofosfolipase associada à membrana (Schwartz & Kepley, 1994; Dvorak, 1995).

Grânulos de basófilos e mastócitos podem ser vistos livres na matriz extracelular, particularmente em processos patológicos. Muitas vezes é difícil diferenciar se é um fenômeno biológico *in vivo* ou um artefato de processamento (Ghadially, 1988).

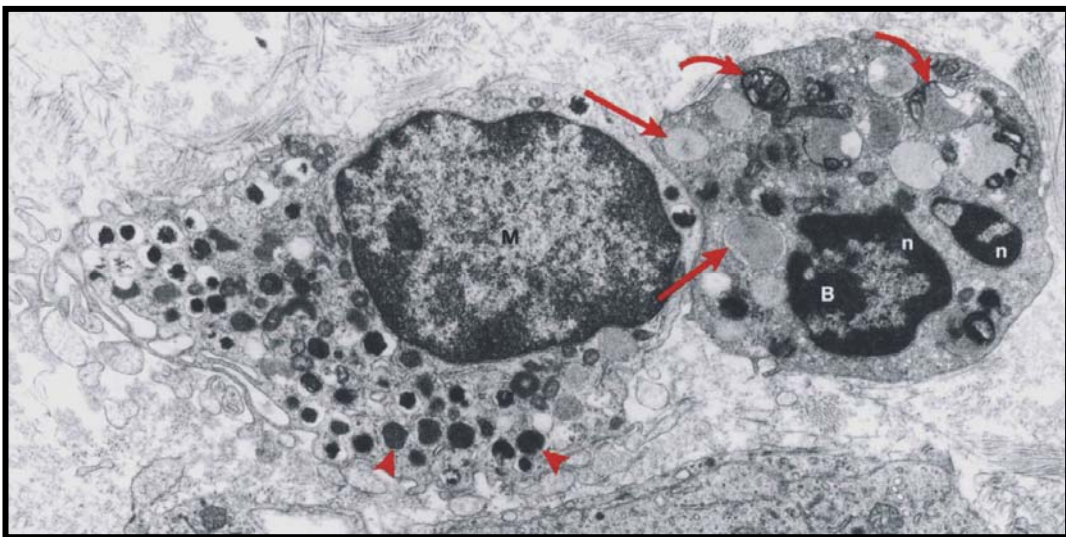


FIGURA 4 – Mastócitos em condições normais e patológicas com ênfase em mastocitomas de cães. Morfologia de um mastócito (à esquerda) e basófilo (à direita) na submucosa do íleo de um paciente com doença de Crohn. Os grânulos citoplasmáticos do mastócito (cabeças de seta) são menores do que os do basófilo (setas). Muitos grânulos do basófilo contêm espirais de membranas (setas curvas). Fonte: Kawakami & Galli, 2002).

Estudos ultra-estruturais do processo de desgranulação dos basófilos revelam 3 tipos de secreção de grânulos. A secreção regulada pela exocitose e a desgranulação fragmentada são semelhantes às dos mastócitos. O terceiro tipo, denominada desgranulação contínua, é um modelo desenvolvido para explicar as progressivas perdas que ocorrem durante dias em dermatites por contato experimentais da pele. Nesse modelo há um tráfego endocítico-exocítico de pequenas vesículas ligadas à membrana citoplasmática, sem a fusão ou extrusão de grânulos, permitindo que alguns grânulos permaneçam retidos dentro do citoplasma (Dvorak, 1995).

Como nos mastócitos, os grânulos citoplasmáticos dos basófilos também estocam diversas substâncias. A ativação dependente do FcεRI, produz a liberação e síntese de mediadores inflamatórios similares, mas não idênticos aos dos mastócitos (Galli, 2002). Os principais produtos liberados por mastócitos e basófilos humanos estão listados no Quadro 3.

QUADRO 3 - Mastócitos em condições normais e patológicas com ênfase em mastocitomas de cães. Produtos dos mastócitos e basófilos humanos.

<b>Produtos</b>	<b>Mastócitos</b>	<b>Basófilos</b>
<b>Grânulos estocados</b>		
- Aminas biogênicas	Histamina	Histamina
- Enzimas	Proteases neutras (quimase e/ou triptase), hidrolases ácidas, catepsinas, carboxipeptidases, peroxidase, proteína básica principal	Proteases neutras com atividade de bradicinina, β-glicuronidase, elastase, catepsina tipo g, proteína básica principal, peroxidase e carboxipeptidase A
- proteoglicanos	Heparina e/ou sulfato de condroitina	Sulfatos de condroitina
<b>Mediadores sintetizados</b>		
- lipídicos	PGD <sub>2</sub> , LTC <sub>4</sub> , PAF	Leucotrieno C <sub>4</sub>
- principais citocinas	TNF, MIP1α, VPF/VEGF, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13, IL-16, GM-CSF, MCP1	IL-4, IL-13

Fonte: Kawakami & Galli, 2002.

Os mastócitos possuem dois importantes proteoglicanos: heparina e sulfato de condroitina E, enquanto o sulfato de condroitina A é o mais importante dos basófilos (Schwartz & Kepley, 1994). Mastócitos são as

únicas células que estocam heparina verdadeira em seus grânulos, outro achado que os distingue dos basófilos. Enquanto os basófilos são a maior fonte de histamina no sangue de indivíduos normais, os mastócitos são responsáveis por estocar toda a histamina dos tecidos normais (Wedemeyer & Galli, 2000).

Basófilos expressam diversos marcadores para células T (CD25), para citocinas (IL-3R ou CD123, IL-4R ou CD124, IL-5R ou CD125 e IL-8R ou CD128), receptores para integrinas  $\beta 2$  (CD11 e CD18), receptores para IgG (Fc $\gamma$ RII) e marcadores únicos como a BSP-1 (proteína específica dos basófilos) (Denburg, 1995).

Eles expressam VLA-4, VLA-5, integrinas, L-selectinas, CD15s e CD162. Basófilos também podem se acumular nos tecidos nas repostas alérgicas tardias da pele e vias aéreas e na hipersensibilidade cutânea basofílica onde a prolongada aplicação de alérgenos da pele leva a uma acumulação seletiva de basófilos. Ligam-se a citocinas ativadas ao endotélio, porque eles possuem ligantes para E-selectinas, P-selectinas, ICAM-1, VCAM-1 e MadCAM-1. A ligação da IgE causa a liberação de L-selectinas. Com relação aos fatores quimiotáticos, os basófilos expressam CCR1, CCR2, CCR3 e CXCR4 e receptores para uma variedade de proteínas do complemento (Bochner & Schleimer, 2001).

## **2.4 Ativação dos mastócitos e basófilos**

Mastócitos e basófilos são células efetoras e imunoregulatórias na imunidade adquirida mediada pela IgE com efeitos benéficos ou resposta inapropriada do organismo (Wedemeyer & Galli, 2000). Os mastócitos também fazem parte da linha de frente das defesas do hospedeiro contra patógenos que penetram através das barreiras epiteliais produzindo uma reação inflamatória local (Janeway *et al.*, 2000).

### 2.4.1 Ativação dependente do receptor Fc $\epsilon$ RI

A membrana citoplasmática de mastócitos e basófilos possui receptores de alta afinidade para a imunoglobulina E (IgE) denominado Fc $\epsilon$ RI (Tizard, 1998; Cotran *et al.*, 2000; Galli, 2000; Wedemeyer & Galli, 2000). Altos níveis desse receptor são restritos aos mastócitos e basófilos, enquanto baixos níveis são detectados em células dendríticas, monócitos, eosinófilos e 30% das células B (Wedemeyer & Galli, 2000). Há de  $10^4$  a  $10^6$  receptores por mastócitos e basófilos e a desgranulação ocorre com a agregação de 1 a 15% desses receptores (Schwartz & Kepley, 1994). Fc $\epsilon$ RI possui estrutura tetramérica com 4 polipeptídeos transmembrana compostos por  $\alpha\beta\gamma\gamma$  ancorados firmemente na camada bilipídica (Figura 5) (Mota, 1995; Katsambas *et al.*, 1999). Em humanos pode ocorrer a forma  $\alpha\gamma_2$ . A porção extracelular da cadeia  $\alpha$  liga-se à porção Fc da IgE (Tizard, 1998; Abbas *et al.*, 2000). A cadeia  $\beta$  promove a transdução de sinais intracelulares. A subunidade  $\gamma$  é comum para outros receptores como Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RIIIA e Fc $\alpha$ R (Abbas *et al.*, 2000; Ott & Cambier; 2000).

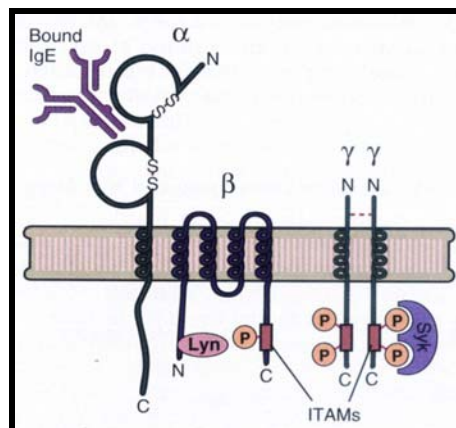


FIGURA 5 – Mastócitos em condições normais e patológicas com ênfase em mastocitomas de cães. Estrutura de cadeia polipeptídica do receptor Fc $\epsilon$ RI de IgE. A IgE se liga ao domínio tipo Ig da cadeia  $\alpha$ . A cadeia  $\beta$  e as cadeias  $\gamma$  medeiam a transdução do sinal. As caixas na região citoplasmática das cadeias  $\beta$  e  $\gamma$  são motivos de ativação de tirosina do imunoreceptor (ITAMs), semelhantes aos achados no complexo do receptor da célula T. Fonte: Abbas *et al.*, 2000.

A IgE é encontrada no sangue em quantidades muito pequenas (9 a 700  $\mu\text{g/ml}$  nos cães). A maior parte dela localiza-se nos tecidos e está ligada aos mastócitos pelo  $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$ . Quando a IgE está conjugada aos mastócitos e basófilos possui meia-vida de 11 a 12 dias; livre no soro, dura somente 2 dias (Tizard, 1998). Estudos em camundongos  $\text{IgE}^{-/}$  indicam que a concentração de IgE circulante é um dos principais reguladores da expressão de  $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$  em mastócitos e basófilos *in vivo* (Kawakami & Galli, 2000). A produção de IgE é favorecida por certos antígenos, geralmente enzimas, bem como vias específicas de apresentação de antígenos ao sistema imune (Janeway *et al.*, 2000).

Alérgenos são antígenos apresentados pelas células dendríticas aos precursores das células  $\text{T}_{\text{H}2}$  que produzem IL-3, IL-4, IL-5, GM-CSF. A IL-4 é essencial na ativação dos linfócitos B para a produção de IgE. Além disso, a IL-4 inibe o desenvolvimento de células  $\text{T}_{\text{H}1}$  que produzem  $\text{IFN-}\gamma$ . O  $\text{IFN-}\gamma$  impede a produção de IL-4 e conseqüentemente de IgE (Tizard, 1998; Cotran *et al.*, 2000; Janeway *et al.*, 2000). A ligação de células  $\text{T}_{\text{H}2}$  com linfócitos B e a produção de citocinas produz a mudança de classe para IgE e proliferação de células B (plasmócitos) (Tizard, 1998). A resposta de IgE pode ser amplificada pelos mastócitos que também podem estimular a produção de IgE pela secreção de IL-4 (Janeway *et al.*, 2000; Weiss & Brown, 2001).

A ligação cruzada dos antígenos com IgE pré-formada ligada ao receptor  $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$  dos mastócitos e basófilos, produz a liberação e síntese de uma série de mediadores pela ativação de diversas tirosinocinases (Metcalf *et al.*, 1997; Tizard, 1998; Cotran *et al.*, 2000; Kawakami & Galli, 2002). A transposição das moléculas de IgE ativa vias transdutoras de sinais da face citoplasmática dos receptores de Fc da IgE e provoca modificações metabólicas como aumento e posterior diminuição do AMP cíclico e síntese do fosfatidil-inositol, resultando na liquefação da membrana e exocitose dos grânulos citoplasmáticos contendo mediadores pré-formados (Katsambas *et al.*, 1999; Cotran *et al.*, 2000).

Nessa fase o aumento do cálcio intracelular é indispensável e pode ocorrer pela entrada de cálcio extracelular ou pela liberação das reservas intracelulares. Simultaneamente há síntese de novos mediadores lipídicos e secreção de citocinas (Figura 6) (Metcalfe *et al.*, 1997; Cotran *et al.*, 2000; Kawakami & Galli, 2002).

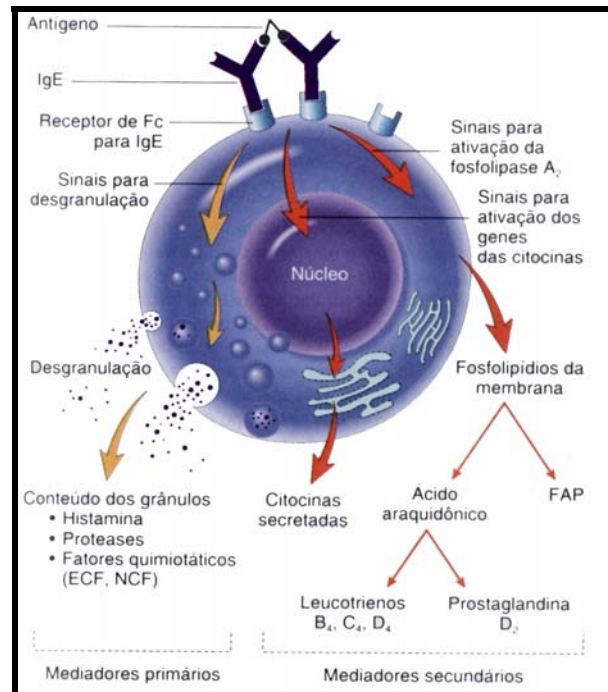


FIGURA 6 – Mastócitos em condições normais e patológicas com ênfase em mastocitomas de cães. Ativação dos mastócitos mediada pela IgE. Fonte: Cotran *et al.*, 2000.

### 2.4.2 Ativação independente do FcεRI

Mastócitos e basófilos podem ser ativados independentemente da ligação cruzada de IgE e antígeno ao FcεRI (Katsambas *et al.*, 1999; Galli, 2000). Essas vias adicionais de ativação são importantes em reações não-imunomediadas, ou amplificam as reações mediadas pela IgE (Abbas *et al.*, 2000). Mastócitos expressam receptores de baixa afinidade para IgG denominados FcγRII e FcγRIII (McNeil, 1996; Galli, 2000). A ativação do FcγRIII pela agregação de IgG ou complexos imunes promove a



adesão, desgranulação e síntese de TNF- $\alpha$  pelos mastócitos (Metcalf *et al.*, 1997).

Peptídeos, citocinas como IL-3 e GM-CSF e SCF, quimiocinas como IL-8, MCP-1, MIP-1 $\alpha$  e RANTES, fatores da cascata do complemento, parasitas e bactérias, podem ser responsáveis pela ativação dos mastócitos (McNeil, 1996; Zappulla *et al.*, 2002). Componentes da bainha de mielina como proteína básica miélnica (MBP) e glicoproteína oligodendrocítica miélnica também ativam mastócitos (Robbie-Ryan & Brown, 2002). Experimentos em camundongos comprovaram que as endotelinas, peptídeos secretados pelas células endoteliais, são potentes indutores da liberação de histamina (Yamamura *et al.*, 1994).

Estudos recentes sugerem a ativação de basófilos e mastócitos em respostas imunes alternativas. Basófilos humanos respondem ao estímulo da IgA liberando histamina e LTC<sub>4</sub>. A proteína Fv (pFv) é uma sialoproteína liberada no intestino em pacientes com hepatite viral e funciona como superantígeno endógeno porque estimula a liberação de histamina pelos mastócitos e basófilos e IL-4 pelos basófilos (Galli, 2000; Wedemeyer & Galli, 2000).

A desgranulação dos mastócitos pode ocorrer por múltiplos fatores que utilizam diversas vias metabólicas de ativação. A quantidade e a qualidade da desgranulação depende da natureza e intensidade desses fatores, bem como do pH e da temperatura (Metcalf *et al.*, 1997; Forsythe & Ennis, 2000). Esses fatores estão listados no Quadro 4.

QUADRO 4 – Mastócitos em condições normais e patológicas com ênfase em mastocitomas de cães. Fatores que promovem a desgranulação dos mastócitos.

<b>Fatores físicos</b>
Calor, queimaduras, cirurgias, infecções, traumas mecânicos
<b>Substâncias sintetizadas pelo organismo</b>
Componentes do complemento (C3a, C4a, C5a) substância P (neuropeptídeo produzido pelas terminações nervosas sensoriais), IL-3, acetilcolina, gastrina.
<b>Substâncias que facilitam a entrada de cálcio na célula</b>
Peptídeo 401 (veneno da abelha), composto 48/80
<b>Lectinas</b>
Concanavalina A
<b>Drogas</b>
Ácido acetilsalicílico, álcool, morfina, codeína, opiáceos, polimixina-B, anfotericina B, escopolamina, pilocarpina, dextranos, ACTH, halotano.
<b>Alimentos</b>
Queijos e bebidas fermentados, tomate, banana, morango,
<b>Fatores psicológicos</b>
Estresse, emoções.

Modificado de Katsambas *et al.*, 1999

## 2.5 Mediadores liberados pelos mastócitos

Os mediadores produzidos e liberados pelos mastócitos possuem diferentes atividades biológicas. Um mediador pode ter múltiplas funções, bem como vários deles podem ter funções similares (Metcalf *et al.*, 1997).

### 2.5.1 Mediadores associados aos grânulos

#### a) Histamina

A histamina é formada pela descarboxilação do aminoácido histidina. É estocada nos grânulos citoplasmáticos associados com proteoglicanos (Beil *et al.*, 2000).

Receptores específicos nas células-alvo denominados H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub> e H<sub>3</sub> são responsáveis por diversas alterações como vasodilatação,

broncoconstrição, produção de ácido gástrico e aumento da permeabilidade vascular das vênulas (Rang *et al.*, 1997; Wedemeyer & Galli, 2000). É indutor primário da expressão de P-selectina pelas células endoteliais e aumenta a atividade de células NK (McNeil, 1996). A histamina é metabolizada minutos após sua liberação (Metcalfe *et al.*, 1997).

#### **b) Proteoglicanos**

São responsáveis pelo armazenamento de mediadores pré-formados nos grânulos através de ligações estáveis; a heparina é um potente anti-coagulante (Cotran *et al.*, 2000; Wedemeyer & Galli, 2000). São degradados por fibroblastos e células endoteliais (Metcalfe *et al.*, 1997).

#### **c) Proteases Neutras**

Estão armazenadas na matriz dos grânulos. A triptase é a enzima predominante. A  $\alpha$ -triptase é o tipo predominante no sangue de indivíduos normais e está elevada em pacientes com mastocitose. A triptase cliva o fibrinogênio, ativa a colagenase latente, hidrolisa alguns neuropeptídeos e pode causar a secreção de muco. A quimase está em 85% dos mastócitos da pele e submucosa intestinal e converte a angiotensina I para II (Metcalfe *et al.*, 1997). Essas enzimas geram cininas e componentes ativados do complemento (Cotran *et al.*, 2000).

### **2.5.2 Mediadores lipídicos**

São derivados do ácido araquidônico da via lipoxigenase e cicloxigenase que produzem leucotrienos e prostaglandina (PGD<sub>2</sub>) respectivamente (McNeil, 1996). Os mastócitos formam três subtipos de leucotrienos denominados LTB<sub>4</sub>, LTC<sub>4</sub> e LTD<sub>4</sub> (Wedemeyer & Galli, 2000). LTC<sub>4</sub> e LTD<sub>4</sub> são mil vezes mais ativos que a histamina no aumento da permeabilidade vascular e na contração do músculo liso brônquico. LTB<sub>4</sub>

é potente quimiotático para neutrófilos e eosinófilos (Metcalf *et al.*, 1997; Cotran *et al.*, 2000). PGD<sub>2</sub> causa intenso broncoespasmo, edema da submucosa secundário ao aumento da permeabilidade vascular, e secreção de muco (McNeil, 1996).

Mastócitos são fontes potenciais de PAF (Wedemeyer & Galli, 2000). PAF provoca agregação de plaquetas, liberação de histamina, broncoespasmo, aumento da permeabilidade vascular e vasodilatação. Em altas concentrações agrega e desgranula células inflamatórias recém-recrutadas (Metcalf *et al.*, 1997; Cotran *et al.*, 2000).

### **2.5.3 Citocinas e Quimiocinas**

Essas moléculas protéicas são importantes para o recrutamento e ativação de células inflamatórias (McNeil, 1996; Ott & Cambier, 2000). As citocinas secretadas incluem IL-1, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, IL-16, TNF- $\alpha$  e GM-CSF. As quimiocinas sintetizadas incluem IL-8, MIP1 $\alpha/\beta$ , MCP-1 e RANTES (Cotran *et al.*, 2000; Ott & Cambier, 2000; Wedemeyer & Galli, 2000; Kawakami & Galli, 2002).

## **2.6 Funções biológicas dos mastócitos**

A ampla variedade de mediadores liberados pelos mastócitos permite desenvolver e modular diversos processos fisiológicos e patológicos (Metcalf *et al.*, 1997). Além disso, a versatilidade funcional dessas células está intimamente relacionada com o microambiente (Young, 1997). As respostas dos mastócitos aos diferentes estímulos são geralmente associadas com a ativação pela IgE (Marone *et al.*, 1997; Galli, 2000). A reação anafilática demonstra o poder dos mastócitos na iniciação da resposta inflamatória, mas esse efeito nem sempre é deletério. Quando apropriadamente regulada e localizada, a ativação dessas células é significativamente benéfica (Metcalf *et al.*, 1997). A

seguir, serão abordadas as principais condições fisiológicas e patológicas que cursam com o envolvimento dos mastócitos.

### **2.6.1 Inflamação aguda e crônica**

A inflamação é fundamentalmente uma resposta protetora, mas tanto a inflamação quanto a reparação podem ser potencialmente lesivas ao organismo (Cotran *et al.*, 2000). Os mastócitos estão intimamente envolvidos com a patogenia da inflamação aguda, principalmente pela liberação da histamina que produz a vasodilatação venular (Bochsler & Slauson, 2002) e PAF que promove a adesão leucocitária dependente de CD18 (McNeil, 1996).

Os mastócitos também produzem as substâncias necessárias para os três fatores essenciais do recrutamento dos leucócitos que incluem selectinas, moléculas de adesão e fatores quimiotáticos. Em leucócitos recrutados para os tecidos, os mastócitos liberam diversos produtos como GM-CSF, IL-5 e IL-3, que previnem a apoptose dessas células, prolongam o tempo de sobrevivência, bem como estimulam funções efetoras (McNeil, 1996).

Os leucócitos recrutados envolvidos na imunidade adquirida também são influenciados pelas citocinas imunomodulatórias liberadas pelos mastócitos. A IL-4 e provavelmente IL-10 induzem a diferenciação das células Th2. Estudos em mastócitos derivados da cavidade peritoneal de camundongos evidenciaram a expressão de complexos de histocompatibilidade da classe II (MHC II) que poderia levar à proliferação de linfócitos T (Metcalf *et al.* 1997). Mastócitos permitem a interação intercelular através da expressão de várias moléculas de superfície (Zappulla *et al.*, 2002).

Mastócitos também participam dos processos de fibrose e remodelação tecidual (Marone *et al.*, 1997; Yamamoto *et al.*, 2001). As áreas fibróticas possuem excesso de mastócitos, muitos dos quais estão desgranulados. (Metcalf *et al.*, 1997). A produção de colágeno pelos

fibroblastos é induzida por TNF- $\alpha$  e TGF- $\beta$  (Yamamoto *et al.*, 2001). Histamina e heparina podem estimular o crescimento dos fibroblastos, síntese de colágeno e formação de cicatriz (Metcalfe *et al.*, 1997). Triptase induz a síntese de metaloproteinases (McNeil, 1996). As quimiocinas também influenciam a remodelação tecidual porque muitas delas como IL-8, RANTES, MIP-1 $\alpha/\beta$  e MCP-1 induzem a expressão de metaloproteinases em diversos leucócitos (Gillitzer & Goebeler, 2001).

Mastócitos se acumulam em situações dependentes da angiogênese como cicatrização de feridas, formação de hemangiomas e outras neoplasias (Metcalfe *et al.*, 1997). Dentre as substâncias que estimulam a angiogênese direta ou indiretamente destacam-se a heparina, histamina e TGF- $\beta$  (Metcalfe *et al.*, 1997). MIP-1 $\alpha$  e MCP-1 possuem efeito angiogênico indireto (Gillitzer & Goebeler, 2001). A Figura 7 esquematiza a interação dos mastócitos com outras células.

### **2.6.2 Mastócitos e tecido nervoso**

Mastócitos são células residentes normais do encéfalo de diferentes espécies de mamíferos e aves. Não são numerosos e encontram-se próximos a vasos sanguíneos na leptomeninge, região tálamo-hipotalâmica, dura-máter e plexo coróide. A maioria deles possui fenótipo CTMC. Sob condições fisiológicas possuem poucos receptores Fc $\epsilon$ RI e não expressam c-kit (Zappulla *et al.*, 2002). Os mastócitos também estão em íntima aposição com terminações nervosas (endoneuro) e neurônios (Metcalfe *et al.*, 1997). A comunicação entre mastócitos e células nervosas é bidirecional, pois produtos secretados pelos dois tipos celulares possuem efeitos estimulatórios (Metcalfe *et al.*, 1997; Zappulla *et al.*, 2002).

Diversos estudos demonstraram aumento no número ou atividade dos mastócitos em doenças neurológicas como encefalomielite auto-imune experimental em camundongos e esclerose múltipla em humanos (Krüger *et al.*, 1990; Dietsch *et al.*, 1991; Zappulla *et al.*, 2002). Nessas

doenças, os mastócitos contribuem para a inflamação aumentando a permeabilidade da barreira hemato-encefálica, recrutando leucócitos para o sistema nervoso central e destruindo a bainha de mielina (Dietsch *et al.*, 1991; Zappulla *et al.*, 2002).

### **2.6.3 Imunidade contra patógenos**

Há proliferação local de mastócitos durante certas infecções parasitárias por helmintos ou ectoparasitas que são associadas à ligação com a IgE. Os mediadores liberados podem causar dano direto ao parasita ou recrutar células efetoras como eosinófilos, induzir a secreção de muco e aumentar o peristaltismo para expulsão do parasita. A ativação dos mastócitos pode ser inespecífica, por substâncias derivadas do parasita (Metcalfe *et al.*, 1997; Tizard, 1998). Os mastócitos são uma defesa complementar durante a resposta imune adquirida, mas podem secretar citocinas que promovem auto-regulação ou atenuação da resposta imune (Wedemeyer & Galli, 2000).

Lipopolissacarídeos e moléculas de adesão das bactérias induzem a liberação de TNF- $\alpha$  dos mastócitos que recruta leucócitos circulantes com propriedades bactericidas para o local da infecção (Robbye-Ryan & Brown, 2002; Uthaisangsook *et al.*, 2002). Essa ativação pode ser indireta, através do sistema complemento (Galli, 2000).

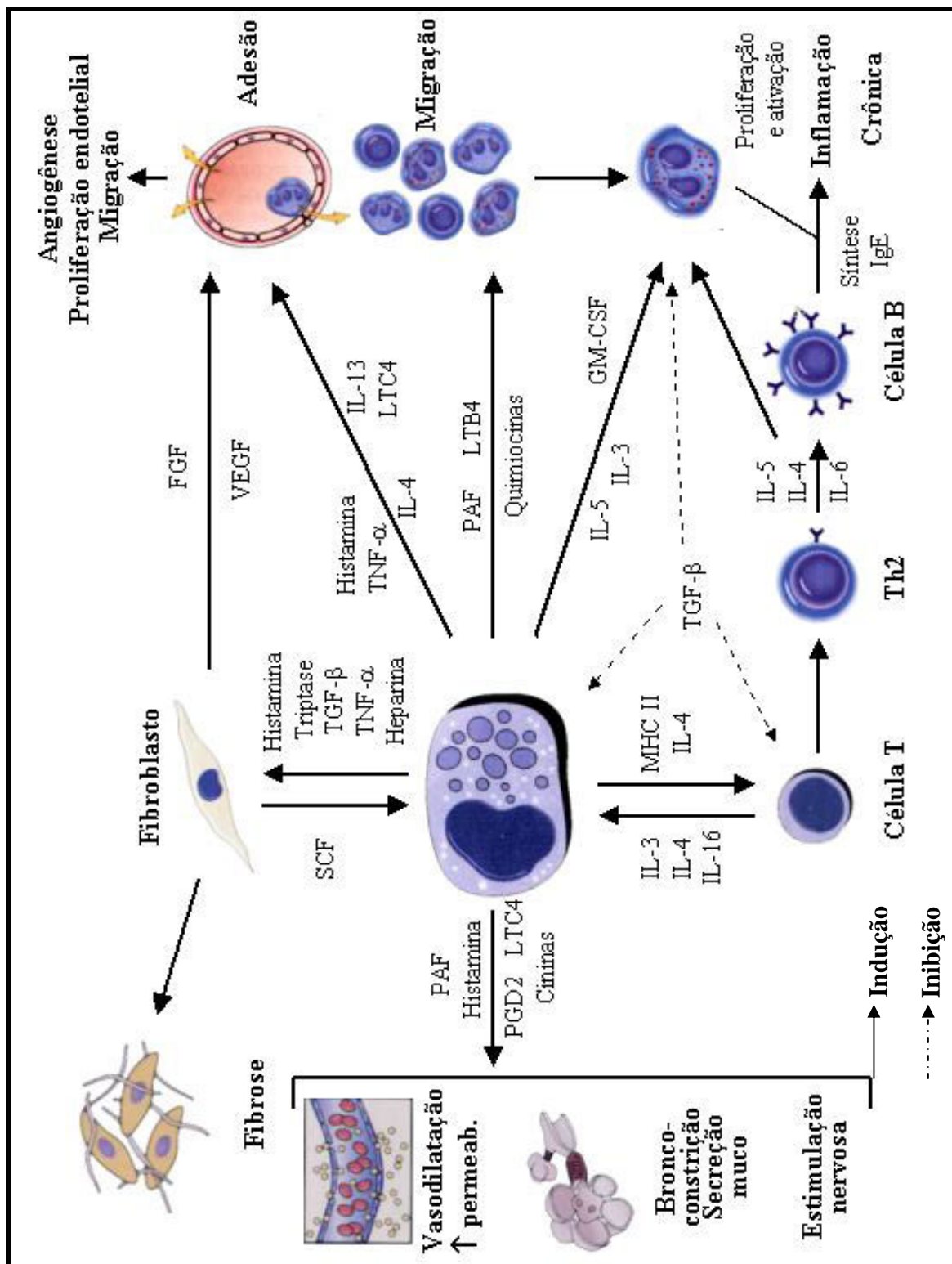


FIGURA 7 – Mastócitos em condições normais e patológicas com ênfase em mastocitomas de cães. Atividades mediadas pela desgranulação dos mastócitos (modificado de Metcalfe *et al.*, 1997).



#### 2.6.4 Hipersensibilidade do Tipo I

O contato com o antígeno leva à indução de uma resposta imune protetora, mas também a reações que podem ser lesivas ao tecido (Cotran *et al.*, 2000). A hipersensibilidade do tipo I é uma reação imunológica que se desenvolve rapidamente, resultante da combinação de um alérgeno com IgE ligadas a mastócitos e basófilos (McNeil, 1996).

A severidade e localização da reação dependem do número e localização de mastócitos estimulados que está intimamente relacionado ao grau de sensibilização do animal, da quantidade de antígenos envolvidos e da sua via de administração (Tizard, 1998). A composição genética do hospedeiro também influencia nos níveis de sensibilidade dos indivíduos a diferentes alérgenos (Brown *et al.*, 2002).

Geralmente há duas fases bem definidas: uma resposta inicial e uma fase tardia (Figura 8). A resposta inicial ocorre em segundos e se caracteriza pelo rápido aumento da permeabilidade vascular e espasmo do músculo liso (Wedemeyer & Galli, 2000). O principal mediador envolvido nessa fase é a histamina (Janeway *et al.*, 2000). A fase tardia surge 2 a 8 horas depois da exposição ao alérgeno e dura vários dias. É causada pela síntese e liberação de leucotrienos, quimiocinas e citocinas pelos mastócitos ativados que são responsáveis pelo recrutamento de leucócitos principalmente linfócitos  $T_H2$ , eosinófilos e basófilos (Mota, 1995; Janeway *et al.*, 2000). Um dos mediadores mais importantes na fase tardia é o PAF que pode causar a liberação de  $LTC_4$  dos eosinófilos (Charlesworth, 1997). Se o antígeno persistir, essa resposta tardia pode facilmente se converter para uma resposta inflamatória crônica pela estimulação das células  $T_H2$  (Janeway *et al.*, 2000). Certas citocinas dos mastócitos como  $TNF-\alpha$ , VEGF e  $TGF-\beta$  podem contribuir para a inflamação alérgica crônica com efeitos nos fibroblastos e células endoteliais vasculares (Wedemeyer & Galli, 2000).

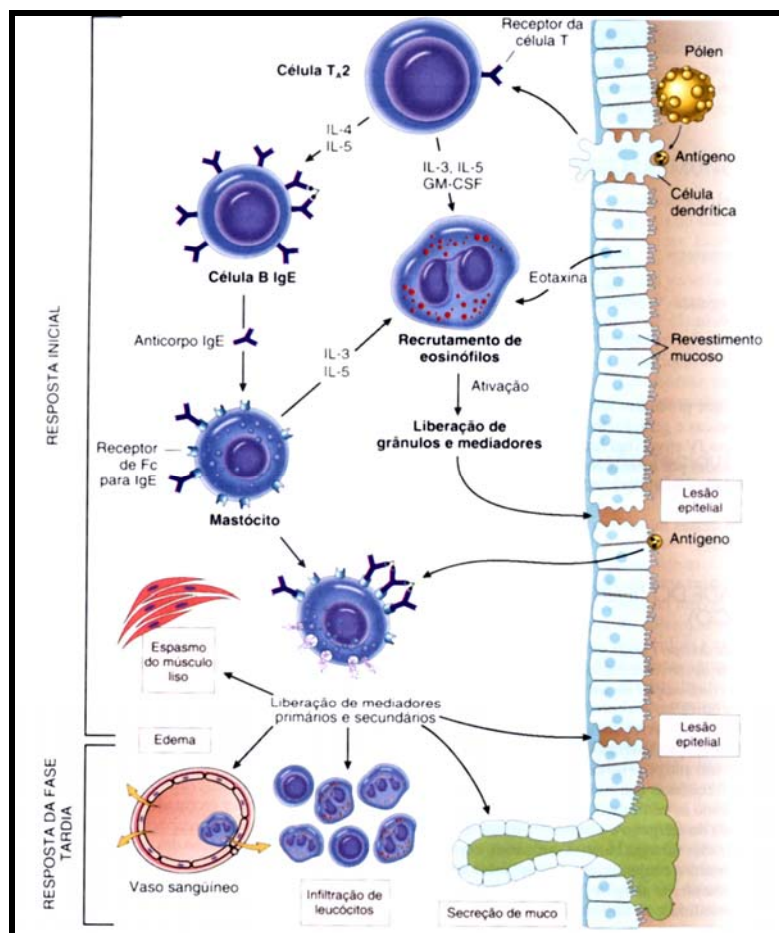


FIGURA 8 – Mastócitos em condições normais e patológicas com ênfase em mastocitomas de cães. Patogenia da reação de hipersensibilidade do tipo I. Fonte: Cotran *et al.*, 2000.

A reação pode ser sistêmica ou local e as manifestações clínicas associadas dependem da porta de entrada do alérgeno (Cotran *et al.*, 2000; Janeway *et al.*, 2000).

Na anafilaxia sistêmica há ativação disseminada dos mastócitos que pode culminar no choque anafilático e morte do paciente (Janeway *et al.*, 2000). Os sinais relacionados a esse evento são variáveis entre as espécies (Tizard, 1998). Os órgãos-alvo para o choque anafilático nas diferentes espécies estão listados no Quadro 5. Em humanos predominam o edema laríngeo e broncoespasmo que produzem dificuldade respiratória (Cotran *et al.*, 2000). A anafilaxia sistêmica é

tipicamente mediada pela histamina; contudo em bovinos, serotonina, cininas e leucotrienos são considerados mais importantes (Brown *et al.*, 2002).

QUADRO 5 – Mastócitos em condições normais e patológicas com ênfase em mastocitomas de cães. Órgãos de choque na anafilaxia.

<b>Espécies</b>	<b>Órgão de Choque</b>	<b>Sinais clínicos primários</b>
Humanos	Trato respiratório	Urticária, dispnéia (edema laríngeo)
Bovinos e ovinos	Pulmões	Tosse, dispnéia (edema pulmonar)
Suínos	Pulmões e intestino	Dispnéia e cianose
Eqüinos	Pulmões e intestino	Dispnéia e diarreia
Caninos	Fígado	Vômito e diarreia
Felinos	Pulmões e intestino	Dispnéia, vômito e diarreia

Fonte: Slauson & Cooper, 2002.

Uma das causas principais de anafilaxia aguda em humanos e animais é a administração sistêmica de drogas em indivíduos previamente sensibilizados. A penicilina e seus derivados são os mais importantes na clínica médica (Cotran *et al.*, 2000). Outra causa potencial são vacinas como a da raiva e vacina morta para febre aftosa (Brown *et al.*, 2002).

As reações alérgicas, específicas ou locais, dependem da porta de entrada do antígeno que pode ser por inalação, ingestão ou subcutânea (Janeway *et al.*, 2000).

A inalação é a via mais comum de entrada do alérgeno. As alergias leves a antígenos inalados produzem rinite, pois ativam os mastócitos do epitélio nasal, provocando edema e corrimento nasal rico em eosinófilos. Quando mastócitos da submucosa brônquica são ativados, ocorre a asma alérgica que se caracteriza por constrição brônquica e secreção aumentada de líquido e muco (Abbas *et al.*, 2000; Cotran *et al.*, 2000).

O melhor exemplo de afecção respiratória alérgica em animais é a doença pulmonar obstrutiva crônica em eqüinos. Ocorre em animais estabulados por longos períodos, alimentados e providos de cama de

produtos à base de cereais ou capins (Knottenbelt & Pascoe, 1998; Brown *et al.* 2002). Caracteriza-se clinicamente por intolerância ao exercício e dispnéia causada por bronquiolite mucopurulenta. Os alérgenos mais importantes na patogenia da doença são *Aspergillus fumigatus* e *Micropolyspora faeni* (Brown *et al.*, 2002).

A reação de hipersensibilidade do tipo I também está envolvida em diversas dermatopatias de pequenos animais (Scott *et al.*, 1996a). A atopia canina é uma hipersensibilidade hereditária a múltiplos alérgenos (Welle *et al.*, 1999) e representa 10% das desordens cutâneas em cães (Willemse, 1995). Em humanos a atopia manifesta-se por três condições clínicas que incluem rinite, asma e dermatite (Brown *et al.* 2002). A dermatite atópica é uma das causas mais comuns de prurido crônico em cães (Tizard, 1998). Predileções raciais em Terriers e Dálmatas e envolvimento familiar demonstraram que a atopia é geneticamente programada (Wilkinson & Harvey, 1994; Scott *et al.*, 1996a).

Os cães geneticamente predispostos absorvem por via cutânea, inalam ou possivelmente ingerem diversos alérgenos que provocam a produção de IgE ou IgG (Scott *et al.*, 1996a). Estudos em mastócitos isolados de cães saudáveis e atópicos demonstraram que não há diferenças nos níveis de liberação de histamina entre os dois grupos. Mas existe um aumento na densidade de receptores para IgE que poderia afetar a liberação de citocinas e outros mediadores neoformados associados com a fase tardia da reação alérgica (Brazís *et al.*, 1998). Os sinais clínicos mais comuns incluem prurido em áreas sem lesão visível ou com máculas eritematosas (Figura 9), podendo estar associados a rinite e conjuntivite (Willemse, 1995; Scott *et al.*, 1996a).

Outras dermatopatias com envolvimento da hipersensibilidade tipo I incluem hipersensibilidade alimentar, medicamentosa, à picada de pulga e urticária (Wilkinson & Harvey, 1994; Willemse, 1995; Scott *et al.*, 1996a).



FIGURA 9 – Mastócitos em condições normais e patológicas com ênfase em mastocitomas de cães. Eritema na face ventral do abdômen em um cão atópico. Fonte: Wilkinson & Harvey, 1994.

Para o tratamento dessas doenças, utilizam-se principalmente corticosteróides e anti-histamínicos. Os corticosteróides atuam de diversas formas na diminuição do número de mastócitos no local da lesão. Podem reduzir a produção local de SCF, inibem a produção de IL-4 e expressão de ICAM-1, diminuem a expressão de diversos mediadores incluindo citocinas (McNeil, 1996; Kirshenbaum, 2000). Esses medicamentos são altamente eficientes, mas possuem diversos efeitos sistêmicos. Outras alternativas de tratamento são o uso de anticorpos que bloqueiam o domínio de ligação da IgE com  $Fc\epsilon RI$  ou imunoterapia específica que envolve repetidas injeções de alérgenos em baixas doses. Recentes pesquisas demonstram a existência de diversos receptores inibitórios que atenuam a ativação de mastócitos induzida por  $Fc\epsilon RI$  e poderiam ser utilizados como alvos na terapia dessas doenças (Ott & Cambier, 2000).

## 2.7 Mastocitose

Sob condições normais, os mastócitos permanecem por meses nos tecidos, em número aproximadamente constante, por um balanço na proliferação, sobrevivência e apoptose. A proliferação excessiva dos mastócitos pode estar associada à expansão clonal dessas células com mutações no protooncogene *c-kit* que decodifica o receptor tirosina-quinase (Kröber *et al.*, 1997), ou desregulação da apoptose com aumento da expressão da proteína anti-apoptótica *bcl-2* (Kirshenbaum, 2000; Hartmann *et al.*, 2001).

Em humanos, mastocitose consiste de um grupo heterogêneo de condições crônicas que são caracterizadas pela proliferação excessiva de mastócitos na pele e órgãos internos (Katsambas *et al.*, 1999; Murphy & Mihm *et al.*, 2000). A doença é congênita em 15% dos casos e em 40% desses pacientes a doença ocorre antes dos 2 anos de idade. A manifestação cutânea atinge 90% dos casos. Em adultos, a mastocitose é mais freqüente entre 20 a 40 anos de idade (Hartmann *et al.*, 2001).

Há três tipos de manifestações: cutânea, reativa e sistêmica. As lesões cutâneas incluem urticária pigmentosa, mastocitoma, mastocitose cutânea difusa e telangiectasia macular eruptiva (Katsambas *et al.*, 1999; Hartmann *et al.*, 2001). Os mastocitomas solitários de crianças regredem espontaneamente depois de alguns anos (Katsambas *et al.*, 1999). As manifestações reativas são decorrentes da liberação dos mediadores pela desgranulação dos mastócitos. Esses sinais incluem úlceras gastrintestinais, hipotensão e reações anafiláticas. A mastocitose sistêmica caracteriza-se pela proliferação sistêmica dos mastócitos, principalmente em ossos, fígado, baço e linfonodos, associada ou não à leucemia mastocitária (Golkar & Bernhard, 1997; Katsambas *et al.*, 1999; Hartmann *et al.*, 2001, Hartmann & Henz, 2001).

O diagnóstico é baseado na história clínica, exame físico, biópsias, análise dos níveis de triptase e metabólitos da histamina no soro

(Hartmann *et al.*, 2001). Os mastócitos são identificados através de métodos histoquímicos, enzimo-histoquímicos ou imunoistoquímicos específicos (Maruyama *et al.*, 1998). Na forma sistêmica, o prognóstico é reservado a desfavorável. Pacientes com mastocitose limitada à pele tem o melhor prognóstico (Hartmann *et al.*, 2001).

Em animais, o termo mastocitose é empregado para designar a proliferação de mastócitos não-neoplásicos em processos reativos como reações inflamatórias e alérgicas. Nesses casos, geralmente designa-se a reação como “mastocitose reativa”. “Mastocitose maligna” é o termo utilizado quando há proliferação multifocal maligna de mastócitos, geralmente associada à leucemia mastocitária (Pulley & Stannard, 1990).

## **2.8 Mastocitomas**

Mastocitoma (sarcoma mastocitário ou mastocitoma histiocítico) é o tumor cutâneo mais freqüente em cães; e o segundo mais comum em gatos (Vail, 1996). Pode aparecer ocasionalmente em outras espécies domésticas como eqüinos (Johnson, 1998), bovinos, ovinos e suínos (Pulley & Stannard, 1990; Goldschmidt & Hendrick, 2002). Foi relatado em felídeos não-domésticos (Stolte & Welle, 1995), furões (Stauber *et al.*, 1990; Brown & Hillyer, 1998) e animais de laboratório inclusive macacos (Jones *et al.*, 2000).

Em cães, o mastocitoma representa 16 a 21% dos tumores cutâneos (Vail, 1996) e 11 a 27% de todas as neoplasias malignas (Rogers, 1996; Meleo, 1997). Ocorre principalmente em cães com idade média de 8-9 anos, mas já foi relatado em cães com 3 semanas a 19 anos (Scott *et al.*; 1996b; Vail, 1996). Não existe aparente predileção por sexo (Scott *et al.*, 1996b).

Diversos estudos apontam que certas raças como Boxer, Boston Terrier, Bull Terrier, Labrador Retriever, Fox Terrier, Beagle e Schnauzer são mais predispostas (Patnaik *et al.*, 1984; Vail, 1996). Recentes

levantamentos demonstram que cães sem raça definida e das raças Cocker Spaniel, Pit Bull Terrier e Shar-Pei também são predispostos aos mastocitomas (Miller, 1995).

Aproximadamente 50% dos mastocitomas cutâneos localizam-se no tronco e região perineal, 40% nas extremidades e apenas 10% na cabeça e pescoço (Meleo, 1997). Frequentemente as neoplasias são solitárias, contudo 11 a 14% dos cães apresentam lesões múltiplas (Vail, 1996).

Mastocitomas viscerais primários são menos frequentes em cães, mas já foram relatados em diversos locais como cavidade oral, mucosa nasal, nasofaringe, laringe, traquéia (Patnaik *et al.*, 1982; Iwata *et al.*, 2000), estômago, intestino (Ozaki *et al.*, 2002), linfonodos viscerais (Patnaik *et al.*, 1982), fígado, baço, rim (Meleo *et al.*, 1997), conjuntiva (Johnson *et al.*, 1988) e canal espinhal extradural (Moore *et al.*, 2002). Ocorrem metástases para os linfonodos regionais ou órgãos viscerais (Takahashi *et al.*, 2000). A cavidade oral é o local mais comum de mastocitomas extracutâneos no cão (Patnaik *et al.*, 1982). Recentes estudos indicam que os mastocitomas viscerais, especialmente aqueles com envolvimento do trato gastrintestinal, são mais frequentes em cães de pequenas raças como Maltês, Chihuahua, Yorkshire Terrier, Shih Tzu e Lulu da Pomerânia (Takahashi *et al.*, 2000; Ozaki *et al.*, 2002).

Em gatos os mastocitomas correspondem a aproximadamente 20% das neoplasias cutâneas (Vail, 1996; Johnson *et al.*, 2002). Ocorrem em gatos com 8-9 anos de idade, frequentemente na cabeça e pescoço (Vail, 1996; Molander-McCrary *et al.*, 1998). Não há predisposição sexual (Scott *et al.*, 1996b), embora alguns autores afirmem uma predileção por machos (Buerger & Scott, 1987).

A causa dos mastocitomas é desconhecida. Em raras ocasiões foi associado com dermatoses crônicas ou aplicação de substâncias irritantes na pele. Uma provável causa viral foi sugerida, pelo fato dos mastocitomas terem sido transmitidos experimentalmente usando-se



tecidos e extratos livres de células. Mas não há evidência epidemiológica para a transmissão horizontal (Rogers, 1996; Scott *et al.*, 1996b; Vail, 1996). Recentes estudos indicam que há mutações no ponto do gene *c-kit*, que codifica o domínio justamembrana do receptor tirosina-quinase, em mastócitos neoplásicos de cães (London *et al.*, 1996; Reguera *et al.*, 2000). A principal mutação encontrada foi duplicação que causa fosforilação constitutiva do receptor, sem a necessidade da ligação com SCF (Zemke *et al.*, 2001). Isso explica o crescimento descontrolado dos tumores e a relação positiva das duplicações como a malignidade do mastocitoma (Zemke *et al.*, 2002).

Mastocitomas têm apresentação clínica variada. As lesões podem ser firmes a amolecidas, papulares a nodulares ou pedunculadas, bem ou mal circunscritas, de localização dérmica a subcutânea (Scott *et al.*, 1996b). Quando localizados no tecido subcutâneo, podem ser confundidos com lipoma, pelo aspecto macio e flutuante (Vail, 1996). Ulceração é comum em grandes tumores (Goldschmidt & Hendrick, 2002). Outros sinais clínicos estão associados com a liberação de aminas vasoativas que produzem edema e eritema ao redor do mastocitoma, quando este é manipulado. Este fenômeno é chamado sinal de Darier (Vail, 1996). As síndromes paraneoplásicas relacionadas com os mastocitomas são: úlceras gastrintestinais, coagulação defeituosa, choque e retardo na cicatrização de feridas (Rogers, 1996).

O diagnóstico fácil e rápido é realizado por citologia através do aspirado de agulha fina do tumor (O'Keefe, 1990). A biópsia é essencial para determinar o grau dos mastocitomas, pois há ampla variação no padrão histológico desses tumores (Vail, 1996) bem como avaliar as margens cirúrgicas do mastocitoma excisado (O'Keefe, 1990). Em cães, foram subdivididos em 3 graus histológicos (Patnaik *et al.*, 1984), de acordo com a diferenciação do tumor, em bem diferenciados (grau I), moderadamente diferenciados (grau II) e pouco diferenciados (grau III). Em gatos os mastocitomas são classificados histologicamente em bem

diferenciados, pouco diferenciados e histiocíticos. A forma histiocítica é rara e tem predileção por gatos siameses jovens (Goldschmidt & Hendrick, 2002).

O grau histológico baseia-se na avaliação do índice mitótico, grau de granularidade e grau de anisocitose (Yager *et al.*, 1993). Adicionalmente ao grau histológico, outros fatores auxiliam na determinação do comportamento biológico e curso clínico dos mastocitomas em cães. Esses fatores incluem: estágio clínico do tumor, localização, contagem de AgNOR, taxa de crescimento, raça, ploidia de DNA, recorrência e sinais sistêmicos (Vail, 1996).

O estágio clínico é o modo de determinar a extensão da doença no organismo e determina a decisão terapêutica mais adequada (O'Keefe, 1990). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) há 4 estágios clínicos para mastocitomas caninos (Quadro 6) (Rogers, 1996).

Quadro 6 – Mastócitos em condições normais e patológicas com ênfase em mastocitomas de cães. Sistema de estágios clínicos para mastocitomas caninos segundo a OMS.

<b>Estágio 1</b>	Um tumor confinado à derme, sem envolvimento dos linfonodos regionais
<b>Estágio 2</b>	Um tumor confinado à derme, com envolvimento dos linfonodos regionais
<b>Estágio 3</b>	Múltiplos tumores na derme ou uma grande neoplasia infiltrativa com ou sem envolvimento dos linfonodos regionais
<b>Estágio 4</b>	Qualquer tumor com metástase à distância ou recidiva com metástase (incluindo sinais sistêmicos).

Para determinar o estágio clínico é necessário realizar um exame físico completo, com especial atenção à palpação dos linfonodos e presença de hepato e esplenomegalia. Exames complementares como aspirado de linfonodos com agulha fina (Langenbach *et al.*, 2001), esfregaço de capa leucocitária (McManus, 1999), avaliação citológica de medula óssea, radiografias e ultrassonografias podem detectar a

presença de envolvimento sistêmico da neoplasia (O'Keefe, 1990; Rogers, 1996).

Mastocitomas que apresentam crescimento lento e permanecem localizados por longo período possuem melhor prognóstico. Quando estão localizados nas regiões perineal e inguinal, possuem comportamento biológico mais agressivo (Scott *et al.*, 1996b; Vail, 1996).

Existem métodos adicionais para auxiliar no diagnóstico dos mastocitomas, principalmente naqueles de pouca diferenciação (Goldschmidt & Hendrick, 2002). São usadas colorações histoquímicas como azul de toluidina e azul alciano que possuem afinidade pelo conteúdo dos grânulos citoplasmáticos dos mastócitos (Simoes & Schoning, 1994). Recentemente, o uso de métodos imunoistoquímicos para *c-kit* e triptase tem demonstrado grande especificidade para marcar mastócitos neoplásicos (Ozaki *et al.*, 2002). Todos esses métodos auxiliam no diagnóstico diferencial dos mastocitomas pouco diferenciados de outros tumores de células redondas (Yager & Wilcock, 1994; Ozaki *et al.*, 2002).

Novos critérios também têm sido usados para determinar o prognóstico dos mastocitomas como a presença de regiões organizadoras nucleolares argirofílicas (AgNOR) e ploidia de DNA que medem o grau de proliferação celular (Goldschmidt & Hendrick, 2002). A técnica de AgNOR é útil para marcar o DNA ribossomal e seus níveis de transcrição, permitindo visualizar o nucléolo e estudar a variação do tamanho do nucléolo e o número de pontos corados pela prata em tecidos (Ploton *et al.*, 1986). Estudos da técnica em neoplasias humanas, mostra que o número de AgNORs por núcleo correlaciona com o grau histológico (Bostock *et al.*, 1989, Tomita *et al.*, 1993). Quanto maior o número de pontos argirofílicos intranucleares, pior é o prognóstico. A utilização da técnica de AgNOR em mastocitomas caninos foi descrita pela primeira vez por Bostock *et al.* (1989) que relatou médias de 1,4, 3,2 e 6,3 para os graus I, II e III respectivamente. A contagem de AgNOR variou entre 1.1 a

8.1. A média de sobrevivência de cães diagnosticados com mastocitomas foi de 40, 36 e 13 semanas para os graus I, II e III respectivamente. O número de mortes também foi inversamente proporcional à graduação histológica. A média de cães mortos foi 10%, 25% e 73% para os graus I, II e III respectivamente. Pela observação desses dados, foi possível validar a técnica de AgNOR para mastocitomas cutâneos caninos como valor prognóstico objetivo (Bostock *et al.*, 1989). Kravis *et al.* (1996) comparou a frequência de AgNOR de mastocitomas entre exame citológico e biópsia e encontrou correlação entre os dois exames, bem como correlação positiva com o grau histológico. A média da frequência de AgNOR para biópsias foi de 2,38 (variação de 1,22 a 4,13) e para exame citológico realizado por aspirado de agulha fina foi 3,04 (variação de 1,99 a 7,13). A diferença das frequências entre os dois exames foi explicada pelo fato de que no exame citológico a célula está inteira, sendo possível visualizar todos os nucléolos (Kravis *et al.*, 1996).

Mastocitomas podem ser tratados com cirurgia, radioterapia, quimioterapia ou combinação dos três tratamentos (Willemse, 1995; Scott *et al.*, 1996b; Moore *et al.*, 2002). O tratamento cirúrgico com amplas margens cirúrgicas é o de escolha para mastocitomas localizados (Turrel *et al.*, 1988; Vail, 1996). A radioterapia é utilizada em mastocitomas com excisão incompleta, recorrentes e com metástases nos linfonodos regionais (Frimberger *et al.*, 1997). Os agentes quimioterápicos, principalmente glicocorticóides, são usados para tratar mastocitomas sistêmicos ou quando não é possível realizar a ressecção (O'Keefe, 1990; Rogers, 1996).

### 3. MATERIAL E METODOLOGIA

Foram consultadas publicações até a presente data sobre a morfologia, fisiologia e patologia relacionadas aos mastócitos com ênfase nas doenças causadas por essas células.

Foram revisados todos os protocolos de biópsia em cães de janeiro de 1980 a dezembro de 2002, no Setor de Patologia Veterinária do Departamento de Patologia da Universidade Federal de Santa Maria. Desse levantamento, os seguintes dados foram coletados: idade, sexo, raça, número total de biópsias, biópsias de pele e mastocitomas diagnosticados em cães.

Dos mastocitomas diagnosticados, além das informações acima citadas, recolheram-se dados como localização da neoplasia e tempo de evolução quando mencionados. Foram aleatoriamente selecionados 45 mastocitomas do total de casos desta neoplasia para realização de três métodos histoquímicos com o objetivo de avaliar o grau histológico, presença de grânulos metacromáticos e regiões organizadoras nucleolares argirofílicas (argiophilic nucleolar organizer region - AgNORs).

#### **Grau Histológico**

Uma secção de 5 µm de espessura foi obtida de cada tumor e corada com hematoxilina-eosina (H&E) (Culling *et al.*, 1985). Cada mastocitoma foi graduado de acordo com os critérios propostos por Patnaik *et al.* (1984). Esses critérios incluem quantidade de citoplasma, forma e diferenciação celular, coloração e forma do núcleo, número de nucléolos, número de figuras mitóticas e outras alterações como edema e necrose. Esses dados permitem diferenciar os mastocitomas em três graus: grau I (bem diferenciado), grau II (moderadamente diferenciado) e grau III (pouco diferenciado) (Quadro 7).

QUADRO 7 – Mastócitos em condições normais e patológicas com ênfase em mastocitomas de cães. Sistema de graduação histológica dos mastocitomas\*.

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

Fonte: Patnaik *et al.*, 1984.

### Azul de toluidina

Essa técnica permite visualizar grânulos citoplasmáticos metacromáticos em mastócitos (Culling *et al.*, 1985), o que auxilia na confirmação do diagnóstico e diferenciação dos graus (Klatt *et al.*, 1983).

Cortes de 5 µm de espessura de cada mastocitoma foram desparafinados e hidratados em água destilada e posteriormente imersos em solução de toluidina a 0,1% por 1 a 2 minutos. Após esse procedimento, as lâminas foram lavadas em água destilada, desidratadas, clarificadas e montadas (Culling *et al.*, 1985).

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

Foi obtido um corte de 5 µm de espessura de cada mastocitoma. Os cortes foram desparafinados e hidratados em água deionizada e posteriormente corados em uma solução de gelatina a 2% e ácido fórmico a 1% em água deionizada e solução de nitrato de prata a 50% na proporção de 1:2. As lâminas ficaram imersas nessa solução durante 45 minutos em temperatura ambiente. Foram lavadas em água deionizada por 1 minuto, desidratadas, clarificadas e montadas com resina sintética (Bostock *et al.*, 1989; Simões *et al.*, 1994; Kravis *et al.*, 1996) (Anexo A).

Para definir a frequência de AgNOR, foram contados os pontos pretos no interior dos núcleos em 100 mastócitos tumorais, em campos aleatórios e representativos de maior aumento (1000x). Um campo representativo é definido como uma área do tumor de pelo menos 10 células tumorais entre a junção normal e as células neoplásicas. A frequência foi obtida dividindo-se o número de AgNOR por 100 (Kravis *et al.*, 1996).

### **Análise estatística**

As variáveis idade, sexo e raça, do número total de biópsias foram comparadas com as mesmas variáveis dos mastocitomas pelo teste  $\chi^2$  ("qui"-quadrado) em nível de 5% de significância. O mesmo teste foi utilizado para a variável Azul de toluidina em cada grau. Para as variáveis idade dos cães com mastocitomas e AgNOR utilizou-se estatística descritiva (média e desvio padrão). Para avaliar a diferença entre as médias de AgNOR nos três graus, utilizou-se análise da variância (teste F) e teste de Tukey. Foi utilizado o pacote estatístico *SAS for Windows* versão 6.11 (SAS, 1997).

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Epidemiologia

Entre 1980 e 2002 foram realizadas 2883 biópsias em cães no Setor de Patologia Veterinária do Departamento de Patologia da Universidade Federal de Santa Maria. O número anual de biópsias em cães está listado na Tabela 1. Dessas, 770 (26,7%) corresponderam a biópsias de pele, sendo que 125 foram diagnosticados como mastocitomas, correspondendo a 4,3% das biópsias em cães, 16,2% das biópsias de pele e 23,2% das neoplasias cutâneas.

TABELA 1 – Mastócitos em condições normais e patológicas com ênfase em mastocitomas de cães. Número anual de biópsias em cães no período de 1980 a 2002.\*

Ano	Número de Biópsias	Número de Mastocitomas	%
1980	75	2	2,7
1981	82	1	1,1
1982	58	1	1,7
1983	93	3	3,2
1984	59	0	0
1985	64	1	1,5
1986	136	6	4,4
1987	87	4	4,6
1988	63	2	3,2
1989	166	2	1,2
1990	132	3	2,3
1991	105	5	4,8
1992	79	4	5,0
1993	81	3	3,7
1994	113	3	2,6
1995	121	4	3,3
1996	157	10	6,3
1997	189	6	3,2
1998	149	5	3,3
1999	172	7	4,0
2000	204	16	7,8
2001	229	17	7,4
2002	269	20	7,4
<b>Total</b>	<b>2883</b>	<b>125</b>	<b>4,3</b>

Fonte: \*Arquivo do Setor de Patologia Veterinária – UFSM.



Das 2883 biópsias, 901 (31,25%) eram de machos, 1653 (57,34%) de fêmeas e em 329 protocolos (11,41%) o sexo do animal não foi informado. Dos 125 mastocitomas, 65 (52%) eram em cães machos, 55 (44%) eram em fêmeas e 5 (4%) animais não tiveram o sexo informado. Houve maior freqüência de machos com mastocitomas entre os animais que chegaram ao Setor de Patologia Veterinária durante o período considerado ( $p < 0,001$ ).

Quanto à idade dos cães com mastocitomas, 2 (1,6%) tinham menos de 1 ano, 29 (23,2%) tinham 1 a 5 anos, 53 (42,4%) tinham 6 a 10 anos, 31 (24,8%) tinham 11 anos ou mais e em 10 protocolos (8%) a idade não foi informada. Os mastocitomas foram mais freqüentes em cães com mais de 6 anos de idade ( $p < 0,001$ ). A Figura 10 mostra a distribuição de acordo com a idade do número total de biópsias e dos mastocitomas em cães no período de 1980 a 2002.

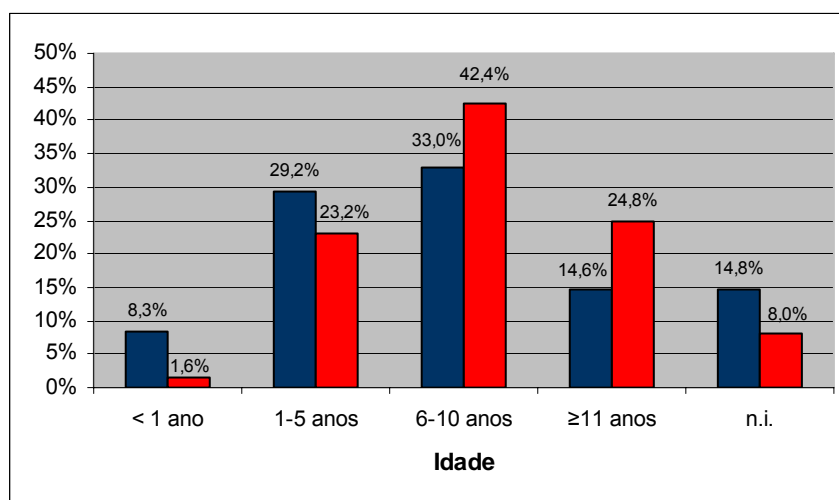


FIGURA 10 – Mastócitos em condições normais e patológicas com ênfase em mastocitomas de cães. Distribuição, de acordo com a idade, de 2883 biópsias (colunas azuis) e 125 mastocitomas (colunas vermelhas) de cães num período de 23 anos.

A média de idade dos cães com mastocitoma foi 7,9 ( $\pm 3,5$  anos). Os mastocitomas foram diagnosticados em 13 raças (Boxer, Fox, Cocker, Fila Brasileiro, Pinscher, Dogue Alemão, Dachshund, Pastor Alemão,

Pointer, Doberman, Poodle, Bulldog e Galgo) e em cães sem raça definida (SRD). Os mastocitomas foram mais freqüentes nas raças: Boxer, Fox, Fila e nos SRD ( $p < 0,001$ ). A Figura 11 mostra a distribuição, de acordo com a raça, do número total de biópsias e dos mastocitomas em cães no período de 1980 a 2002.

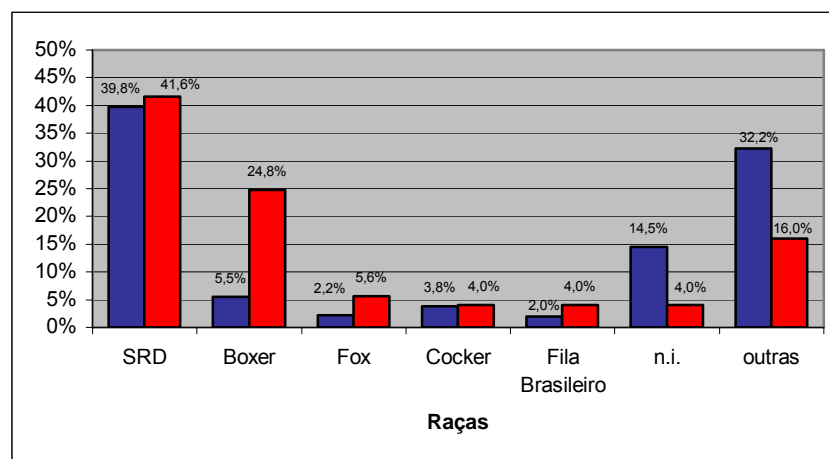


FIGURA 11 – Mastócitos em condições normais e patológicas com ênfase em mastocitomas de cães. Distribuição, de acordo com a raça, de 2883 biópsias (colunas azuis) e 125 mastocitomas (colunas vermelhas) de cães num período de 23 anos.

A localização anatômica dos mastocitomas está na Tabela 2. Quanto ao tempo de evolução, em 68 protocolos esse dado não foi informado. Nos casos informados, o tempo de evolução variou entre 1 semana e 1 ano.

TABELA 2 – Mastócitos em condições normais e patológicas com ênfase em mastocitomas de cães. Localização anatômica dos mastocitomas em 125 cães.\*

Localização	Número	Porcentagem (%)
Cabeça	10	8
Tronco	41	32,8
Membros	35	28
Escroto	20	16
Múltipla	7	5,6
Não informado	12	9,6
<b>Total</b>	<b>125</b>	<b>100</b>

\* Arquivo do Setor de Patologia Veterinária, UFSM.

## 4.2 Classificação dos mastocitomas de acordo com o grau histológico.

Dos 125 mastocitomas diagnosticados entre 1980 e 2002, 45 foram aleatoriamente selecionados para classificação pelo grau histológico, de acordo com os critérios de Patnaik *et al.* (1984), apresentados no capítulo anterior (Quadro 7).

Dezesseete mastocitomas foram classificados com o grau I (37,8%); 23 com o grau II (51,1%) e 5 com o grau III (11,1%) (Figuras 12, 13 e 14 respectivamente).

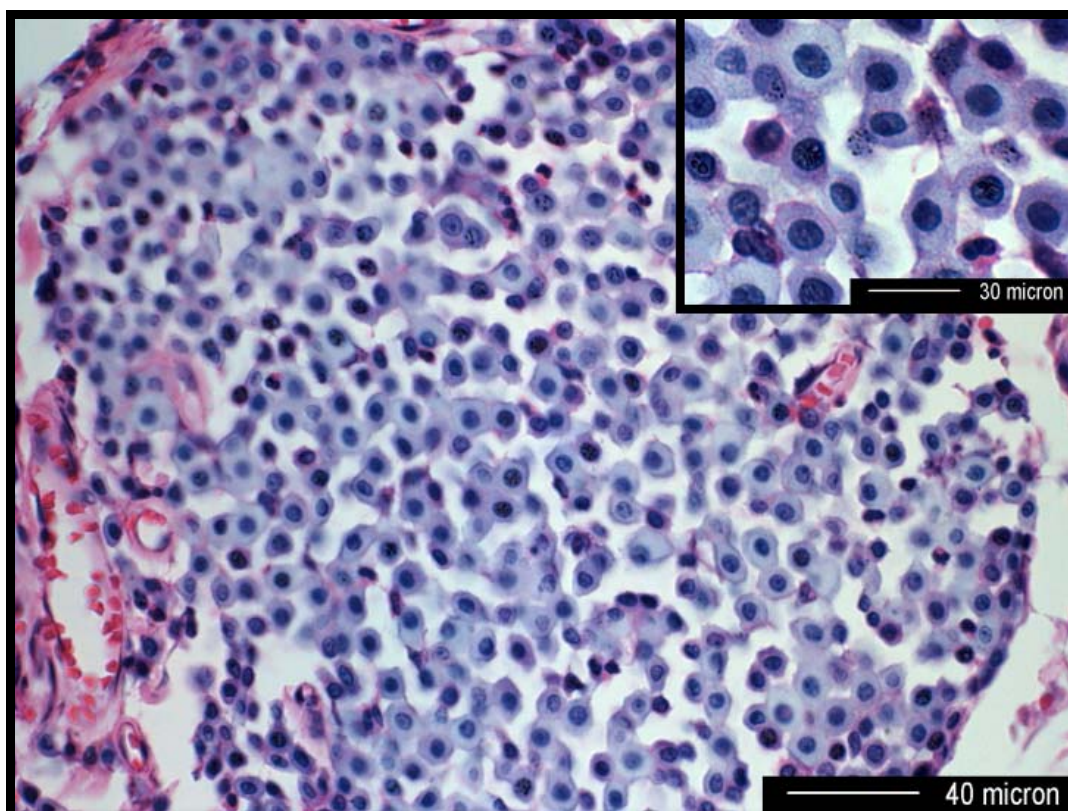


FIGURA 12 – Mastócitos em condições normais e patológicas com ênfase em mastocitomas de cães. Mastocitoma cutâneo bem diferenciado (grau I). Células de aspecto uniforme. H&E. Barra = 40  $\mu$ m. Detalhe: maior aumento da Figura 12. Barra = 30  $\mu$ m.

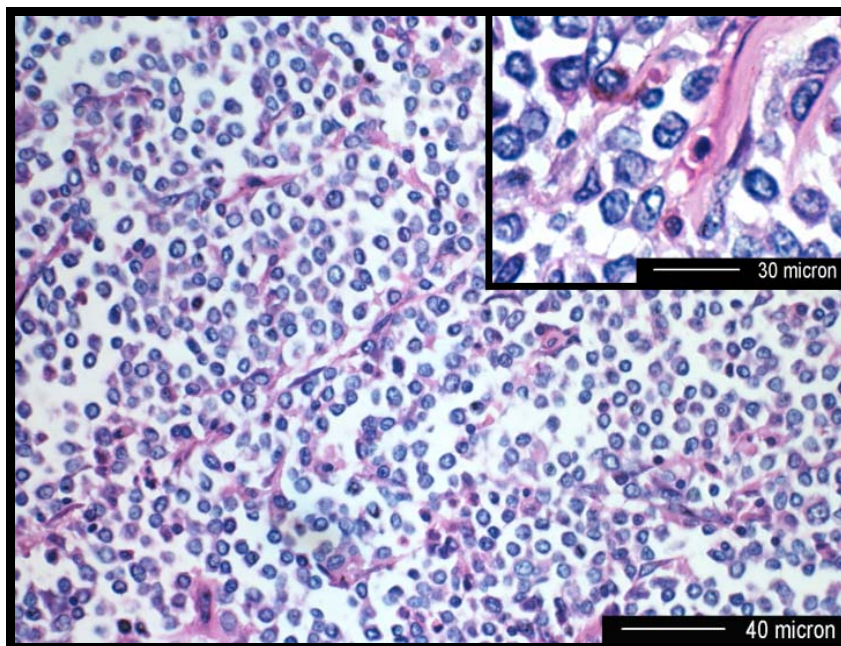


FIGURA 13 – Mastócitos em condições normais e patológicas com ênfase em mastocitomas de cães. Mastocitoma cutâneo moderadamente diferenciado (grau II). Pleomorfismo moderado. H&E. Barra = 40  $\mu$ m. Detalhe: maior aumento da Figura 13. Barra = 30  $\mu$ m.

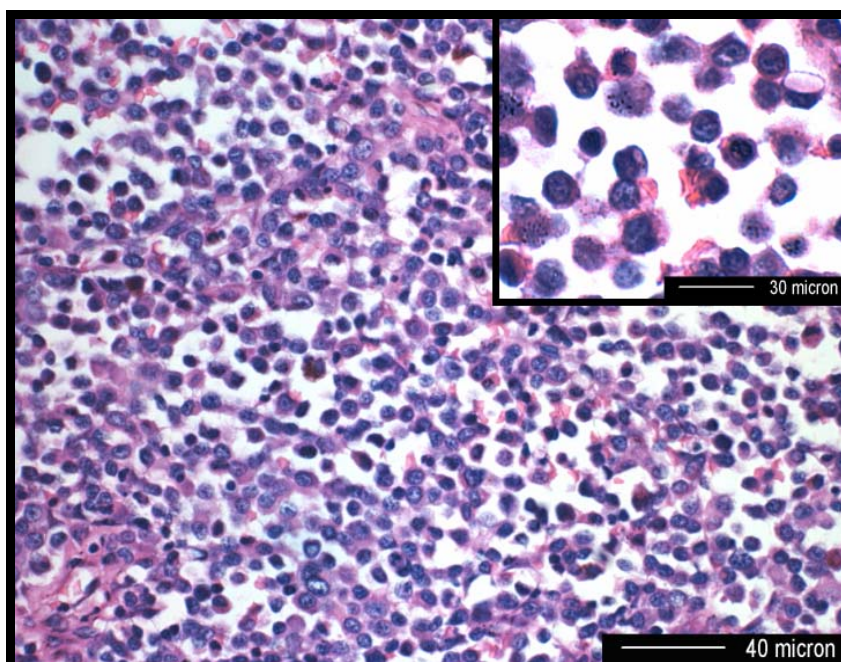


FIGURA 14 – Mastócitos em condições normais e patológicas com ênfase em mastocitomas de cães. Mastocitoma cutâneo pouco diferenciado (grau III). Pleomorfismo acentuado. H&E. Barra = 40  $\mu$ m. Detalhe: maior aumento da Figura 14. Barra = 30  $\mu$ m.

A localização anatômica dos 45 mastocitomas classificados por grau histológico está na Tabela 3.

TABELA 3 – Mastócitos em condições normais e patológicas com ênfase em mastocitomas de cães. Localização anatômica dos 45 mastocitomas classificados por grau histológico.\*

Localização	Graus		
	I	II	III
Cabeça	3	4	0
Tronco	5	5	4
Membros	8	5	1
Escroto	0	6	0
Não informado	1	3	0
<b>Total</b>	<b>17</b>	<b>23</b>	<b>5</b>

\* Arquivo do Setor de Patologia Veterinária, UFSM.

As características histológicas dos mastocitomas, distribuídas por grau, são apresentadas na Tabela 4. A presença de cápsula fibrosa incompleta foi detectada em poucos cortes, independentemente do grau histológico do tumor. A distribuição mais freqüente das células nos tumores de grau I, foi do tipo misto (64,7%), enquanto que nos do grau II foi do tipo difusa (65,3%). A distribuição menos comum, independente do grau, compreende ninhos e cordões (6,6%).

Nos três graus de mastocitomas, quantidade moderada de estroma foi mais freqüente (48,8%).

O tamanho das células neoplásicas foi predominantemente uniforme no grau I (94,1%). A anisocitose estava presente em 65,3% dos mastocitomas de grau II e em 60% dos de grau III. Anisocitose associada a células mutinucleadas foi detectada em 40% dos tumores de grau III.

Células redondas ou ovais eram predominantes no grau I (94,1%); em todos os mastocitomas de grau III as células eram pleomórficas.

O citoplasma era abundante em 58,8% dos tumores de grau I, enquanto que foi moderado em 56,5% e 80% nos graus II e III, respectivamente. Em nenhuma célula neoplásica de grau I o citoplasma

foi escasso, como observado nos tumores de grau II (39,2%) e de grau III (20%).

O método azul de toluidina permitiu observar captação diferenciada do corante nas células neoplásicas de diferentes graus. Os grânulos das células dos tumores de grau I coraram metacromaticamente (Figura 15) em 64,7% dos casos; os das células do grau II apresentaram metacromasia variada em 100% dos casos; os das células do grau III apresentaram somente discreta a moderada metacromasia. Houve diferença significativa na metacromasia das células entre as classificações discreta, moderada e acentuada ( $p < 0,001$ ).

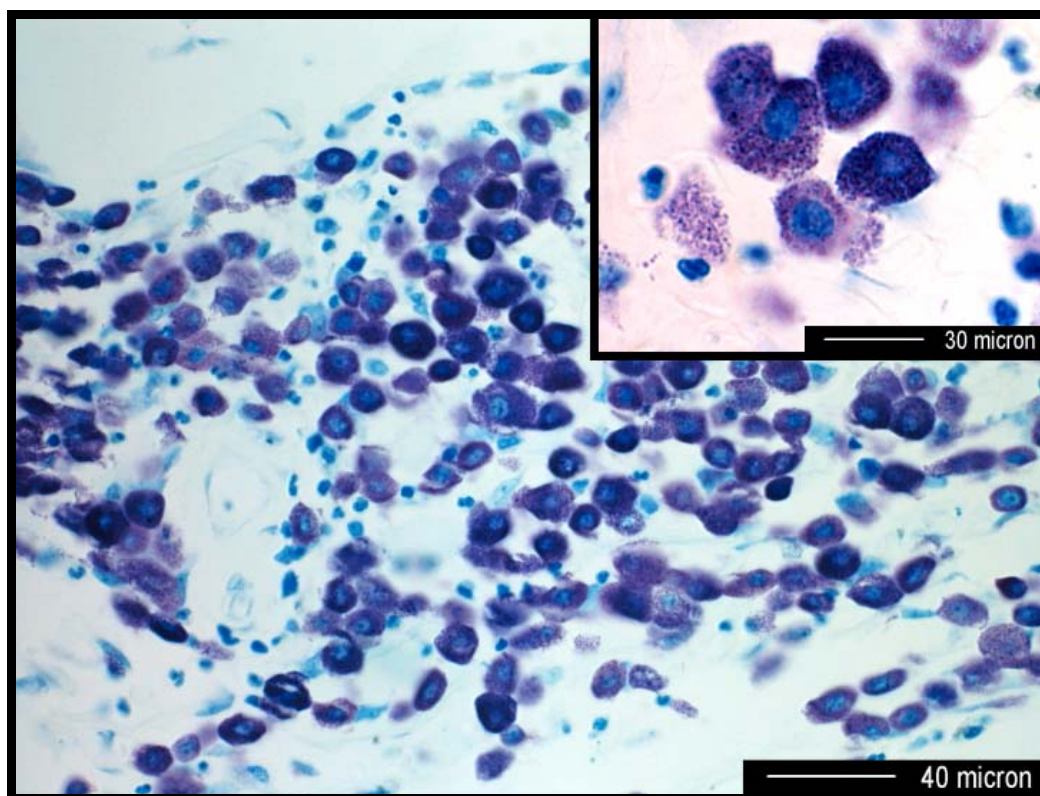


FIGURA 15 – Mastócitos em condições normais e patológicas com ênfase em mastocitomas de cães. No citoplasma de mastócitos observam-se grânulos metacromáticos. Azul de toluidina. Barra = 40  $\mu$ m. Detalhe: maior aumento da Figura 15. Barra = 30  $\mu$ m.

TABELA 4 – Mastócitos em condições normais e patológicas com ênfase em mastocitomas de cães.  
Características histológicas dos mastocitomas classificados por grau.

Achados histológicos	Graus							
	I		II		III		Total	
	n	%	n	%	n	%	n	%
<b>Distribuição</b>								
Derme superficial	4	23,2	3	13,0	1	20,0	8	17,8
Derme profunda	8	47,0	7	30,5	1	20,0	16	35,5
Subcutâneo	2	11,8	2	8,7	1	20,0	5	11,2
Múltipla	3	17,7	11	47,8	2	40,0	16	35,5
<b>Padrão</b>								
Difuso	5	29,4	15	65,3	1	20	21	46,6
Cordões	0	0	1	4,3	1	20	2	4,4
Ninhos	1	5,9	0	0	0	0	1	2,2
Tapete	0	0	4	17,7	2	40	6	13,4
Misto	11	64,7	3	13	1	20	15	33,4
<b>Tamanho da célula</b>								
Uniforme	16	94,1	5	21,7	0	0	21	46,6
Anisocitose	1	5,9	15	65,3	3	60	19	42,3
Anisocitose + céls multinucleadas	0	0	3	13	2	40	5	11,1
<b>Forma da célula</b>								
Redondo a oval	16	94,1	10	43,5	0	0	26	57,7
Pleomórfico	1	5,9	13	56,5	5	100	19	42,3
<b>Citoplasma</b>								
Abundante	10	58,8	1	4,3	0	0	11	24,5
Escasso	0	0	9	39,2	1	20	10	22,2
Moderado	7	41,2	13	56,5	4	80	24	53,3
<b>Núcleo</b>								
Uniforme	6	35,3	0	0	0	0	6	13,4
Anisocariose	0	0	12	52,2	5	100	17	37,4
Redondo a oval	11	64,7	11	47,8	0	0	22	48,8
Vesicular	2	11,8	15	65,2	4	80	21	46,7
Homogêneo basofílico	12	70,5	4	17,4	0	0	16	35,5
Cromatina condensada	3	17,7	4	17,4	1	20	8	17,8
<b>Mitose</b>	ausente	-	1/cma	-	4/cma	-	-	-
<b>Nucléolo</b>								
não visível	11	64,7	9	39,2	1	20	21	46,7
1	5	29,4	13	56,5	2	40	20	44,4
>1	1	5,9	1	4,3	2	40	4	8,9
<b>Estroma</b>								
Pouco	3	17,7	10	43,5	2	40	15	33,4
Moderado	8	47	11	47,8	3	60	22	48,8
Abundante	6	35,3	2	8,7	0	0	8	17,8
<b>Eosinófilos</b>								
Ausente	2	11,8	3	13	0	0	5	11,1
<50 cma	7	41,2	9	39,2	2	40	18	40,1
>50 cma	8	47	11	47,8	3	60	22	48,8
<b>Outras alterações*</b>								
Necrose (N)	3	-	10	-	2	-	15	-
Hemorragia (H)	0	-	5	-	1	-	6	-
Edema (E)	5	-	5	-	2	-	12	-
<b>Azul de Toluidina</b>								
+ (discreta metacromasia)	0	0	8	34,8	2	40	10	22,2
++ (moderada)	6	35,3	8	34,8	3	60	17	37,8
+++ (acentuada)	11	64,7	7	30,4	0	0	18	40,0

\* N, H, E ocorrem isoladas ou conjuntamente. CMA = campo de maior aumento.

Nos tumores de grau I predominaram os núcleos redondos a ovais (64,7%). Nos tumores de grau II foram observadas anisocariose (52,2%) e células redondas a ovais (47,8%); e nos de grau III somente foi observada anisocariose (100%). Os núcleos apresentaram aspecto vesicular predominantemente nos tumores de grau II e III, 65,2% e 80,0%, respectivamente. No grau I predominaram os núcleos homogêneos basofílicos. Na maioria das células (64,7%) dos tumores de grau I, não foi possível a visualização de nucléolos. Nos tumores de grau II só foi possível a visualização de um nucléolo (56,5%) por célula e nos de grau III, 80% das células mostraram um ou mais nucléolos.

As regiões organizadoras nucleolares argirofílicas coraram-se, intranuclearmente, como pontos pretos ou marrom-escuros (Figura 16). A média ( $\pm$  DP) de contagem de AgNOR em 100 células, nos tumores de grau I foi de  $1,5 \pm 0,19$ , nos tumores de grau II foi de  $1,85 \pm 0,9$  e nos de grau III,  $3,25 \pm 0,6$  (Figura 17). A contagem geral de AgNOR variou de 1,2 a 4,3. A média geral ( $\pm$  DP) foi  $1,9 \pm 0,7$ . Quando comparados pelo teste de Tukey, as médias de AgNOR dos graus I e II não foram significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ).

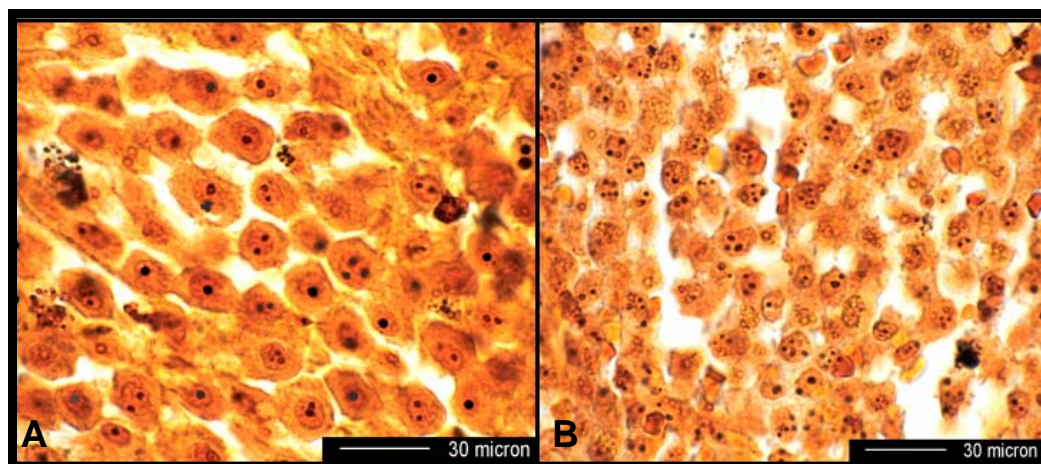


FIGURA 16 – Mastócitos em condições normais e patológicas com ênfase em mastocitomas de cães. Mastocitoma cutâneo canino. Os pontos pretos representam as regiões organizadoras nucleolares argirofílicas (AgNOR). A. Mastocitoma de grau I (AgNOR = 1,6). B. Mastocitoma de grau III (AgNOR= 4,2). Barra = 30  $\mu$ m.



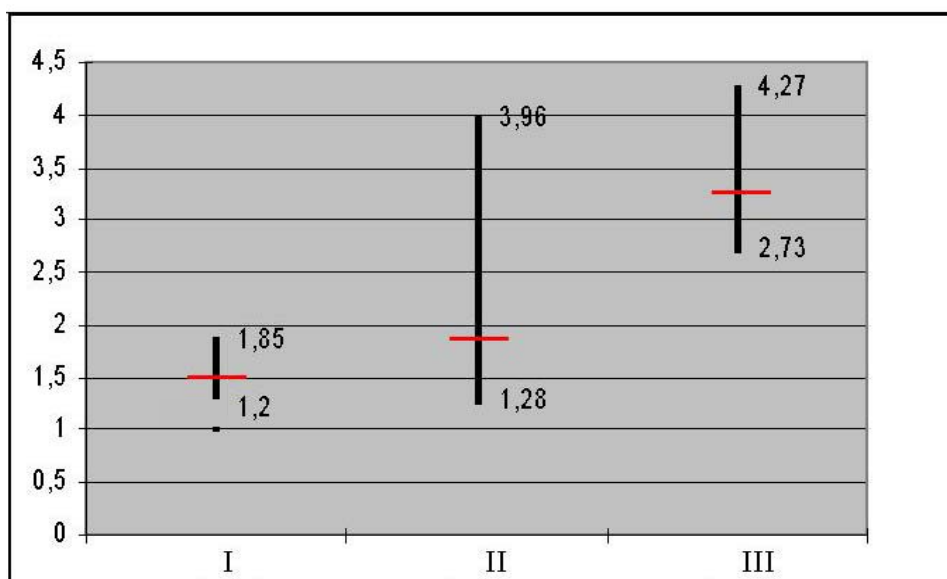


FIGURA 17 – Mastócitos em condições normais e patológicas com ênfase em mastocitomas de cães. Associação entre o grau histológico e a freqüência de AgNOR de 45 mastocitomas em cães. As linhas horizontais (vermelhas) representam a média de AgNOR em cada grau.

A presença de figuras mitóticas não foi detectada nos tumores de grau I; foram detectadas uma e quatro mitoses/CMA respectivamente, nos tumores de grau II e III.

A presença de eosinófilos foi marcada em todos os graus (I: 47 %; II: 47,8% e III: 60%).

Outras alterações teciduais como necrose, edema e hemorragia estavam relacionadas com as neoplasias. Essas alterações ocorreram em graus variados e, freqüentemente, associadas, sendo mais abundantes nos mastocitomas de grau II e III. Fibrose e infiltrado linfocitário também foram detectados nas lesões.

## 5. DISCUSSÃO

A revisão realizada sobre mastócitos mostra crescente investigação sobre a importância dessas células em diversos processos imunológicos (Robbye-Ryan & Brown, 2002; Zappulla *et al.*, 2002). Para estudar as múltiplas funções dos mastócitos, numerosos modelos experimentais são desenvolvidos em animais de laboratório (Galli, 2000) e *in vitro* (Metcalfe *et al.*, 1997) com emprego de técnicas avançadas (Kirshenbaum, 2000).

As patologias que envolvem mastócitos são conhecidas em diversas espécies (Tizard, 1998). Dentre elas, os mastocitomas destacam-se pela ocorrência e característica de malignidade em pequenos animais (Vail, 1996). Os mastocitomas são neoplasias cutâneas freqüentes em cães (Yager & Wilcock, 1994; Scott *et al.*, 1996b; Zemke *et al.*, 2002). Ocorreram em 16,2% das biópsias de pele e em 23,2% das neoplasias cutâneas num período de 23 anos (1980-2002), de acordo com os dados obtidos do levantamento realizado nos arquivos do Setor de Patologia Veterinária do Hospital de Clínicas Veterinárias da Universidade Federal de Santa Maria.

A freqüência de mastocitomas aumentou significativamente nos últimos 3 anos (Tabela 1). Nesse levantamento foi observada uma correlação positiva entre aumento do número de biópsias de animais com mais de 6 anos e a incidência de mastocitomas (Apêndice A). Sabe-se que há um aumento significativo na freqüência de neoplasias com o aumento da idade, pois fatores relacionados a danos genéticos ao longo do tempo, como o aumento da expressão de sítios cromossômicos frágeis observados em humanos e em cães Boxer (Vail, 1996), e a diminuição da função imune, são responsáveis por essa susceptibilidade (Cullen *et al.*, 2002).

De acordo com Cockerell & Cooper (2002), embora a idade não seja em si própria um fator direto no aparecimento de tumores, os

pequenos animais, que vivem mais tempo e são mais expostos aos efeitos acumulativos dos carcinógenos do ambiente, tendem a ter um índice mais elevado de neoplasias, o que corrobora a tendência determinada epidemiologicamente pelos dados mostrados nos resultados.

A idade média dos cães com mastocitoma foi 7,9 anos, sendo que essa neoplasia foi diagnosticada em cães entre 8 meses e 16 anos. Esses resultados foram similares aos apresentados por Miller (1995) e Patnaik *et al.* (1984) que analisaram 802 amostras - com idade média dos cães de 8,2-8,5 anos - e 83 amostras com idade média de 9 anos respectivamente. Miller (1995) observou que a idade média de cães Boxer com mastocitomas foi 6,9 anos. No levantamento realizado, a idade média dessa raça foi 6,1 anos. Esses dados sugerem que o Boxer é susceptível aos mastocitomas precocemente.

Os mastocitomas foram mais freqüentes em machos, mesmo considerando que o número de biópsias entre fêmeas e machos foi aproximadamente 2:1. Esse dado diverge dos achados de diversos autores que afirmam não existir predisposição sexual em cães (Scott *et al.*, 1996b; Vail, 1996). Embora registrada a predileção por machos, essa diferença com os dados da literatura, não pode ser explicada epidemiologicamente.

Tem sido mencionado que cães das raças Boxer, Boston Terrier, Labrador, Beagle e Schnauzer são mais predispostos aos mastocitomas (Vail, 1996). Nos nossos achados, os mastocitomas foram mais freqüentes em cães Boxer, Fox, Fila, SRD e Cocker Spaniel (Figura 11). A diferença na prevalência de mastocitomas em algumas raças pode estar relacionada à popularidade delas na região geográfica estudada. No entanto, em cães Boxer a prevalência de mastocitoma e outras neoplasias cutâneas como linfoma, melanoma e histiocitoma, entre outras, é elevada (Scott *et al.*, 1996b). Segundo Miller (1995), os mastocitomas em cães Boxer geralmente são bem diferenciados; por analogia, dos 13

mastocitomas aqui diagnosticados em cães Boxer, 9 (69,2%) foram bem diferenciados.

Quanto à localização, os mastocitomas foram mais freqüentes no tronco (32,8%), extremidades (28%) e escroto (16%) (Tabela 2). Turrel *et al.* (1988) sugeriram que mastocitomas das áreas prepucial, inguinal e perineal tendem à malignidade. Cabe ressaltar que no levantamento aqui realizado, o escroto foi considerado como entidade anatômica separada do tronco, onde a maioria dos autores o inclui (Vail, 1996). Considerando os 45 mastocitomas revisados histologicamente, todos os localizados no escroto (n=6) foram moderadamente diferenciados (grau II). Dos 5 mastocitomas de grau III, 4 localizavam-se no tronco e 1 nos membros. A maioria dos tumores de grau I localizou-se nas extremidades (Tabela 3). A localização do mastocitoma e a definição do grau histológico são importantes na escolha do tratamento. Por exemplo, em mastocitomas localizados nas extremidades, o uso da irradiação oferece uma solução mais cosmética e funcional do que a amputação (Turrel *et al.*, 1988).

Tem sido relatada grande variação na porcentagem dos tumores para cada um dos três graus histológicos (Vail, 1996). Confrontando os nossos dados, a porcentagem para cada grau foi similar à observada por Patnaik *et al.*, (1984) que relataram 36% dos mastocitomas de grau I, 43% de grau II e 20% de grau III.

O grau histológico é um parâmetro importante para determinar o prognóstico e a escolha do tratamento pelo clínico (Goldschmidt & Hendrick, 2002). Os nossos achados histológicos (Tabela 4) foram característicos e similares aos de investigações anteriores (Patnaik *et al.*, 1984; Simoes *et al.*, 1994). Nos mastocitomas de grau I predominaram células uniformes, redondas a ovais; com citoplasma abundante; núcleo redondo a oval, aspecto homogêneo basofílico; nucléolo não-visível e ausência de figuras mitóticas. Nos mastocitomas de grau II as células freqüentemente apresentaram anisocitose, pleomorfismo ou uniformidade; com citoplasma moderado a escasso; núcleo com anisocariose ou

redondo a oval, aspecto predominantemente vesicular com um nucléolo visível e uma figura mitótica/CMA. Nos mastocitomas de grau III, todas as células apresentaram anisocitose, anisocariose e pleomorfismo, por vezes associadas a células multinucleadas. Um ou mais nucléolos foram visíveis com média de 4 figuras mitóticas/CMA. Os mesmos critérios são usados atualmente com resultados semelhantes na distribuição dos graus (Goldschmidt & Hendrick, 2002).

Outras alterações como necrose, hemorragia e edema foram mais abundantes em mastocitomas de grau III. Eosinófilos isolados ou agrupados estavam presentes em todos os graus dos mastocitomas diagnosticados (Tabela 4), mas, é importante notar que estiveram presentes em 100% dos de grau III, enquanto estiveram ausentes em, respectivamente 11,8% e 13% nos de graus I e II. Segundo Goldschmidt & Hendrick (2002), a presença de eosinófilos pode auxiliar no diagnóstico de mastocitomas pouco diferenciados, para evitar o diagnóstico de tumor de células redondas, sem especificação da célula de origem.

Segundo Lukacs (2001), a migração de eosinófilos nos tecidos ocorre via atração seqüencial por quimiocinas (CCL5, CCL7, CCL11 e CCL13), após aderência à parede vascular mediada pela P-selectina, mobilizada por moléculas como histamina e trombina (Chénier & Doré, 1998). IL-5, produzida por mastócitos e pelos próprios eosinófilos tem, também, papel fundamental na atração dessas últimas células para o local da lesão (Lalani *et al*, 1999) e o aumento da migração transendotelial por interação com quimiocinas (Bochner & Schleimer, 2001).

Em humanos, algumas células tumorais produzem quantidades substanciais de IL-5, que é capaz de induzir crescimento e ativação de eosinófilos e expressão de moléculas semelhantes ao TNF na sua superfície. Essas moléculas interagem com as células tumorais promovendo sua proliferação, ativação e inibição da apoptose, o que promove o crescimento e a persistência do tumor (Lalani *et al*, 1999).

Nos mastocitomas, os eosinófilos também contribuem para a formação do estroma e na angiogênese, como observado em tumores mamários em humanos (Chénier & Doré, 1998). Nos mastocitomas observados, os eosinófilos foram associados com necrose e hemorragia, confirmando a responsabilidade atribuída a eles pelos efeitos deletérios nos tecidos infiltrados (Lukacs, 2001), atividade modulada pela própria P-selectina, inibidora da desgranulação dessas células (Chénier & Doré, 1998). Em tumores cutâneos de cães, como histiocitomas, a P-selectina não está envolvida e os eosinófilos não são relatados (Chénier & Doré, 1998).

Mastocitomas bem diferenciados são fáceis de diagnosticar em preparações histológicas de rotina (H&E). Contudo, mastocitomas pouco diferenciados podem ser confundidos com outros tumores de células redondas (Yager & Wilcock, 1994). O método histoquímico de azul de toluidina é importante, pois auxilia na confirmação do diagnóstico e, muitas vezes, permite diferenciar mastocitomas pouco diferenciados de outros tumores de células redondas. Nos mastocitomas, a interação dos corantes básicos com os grânulos citoplasmáticos tem relação positiva com o grau de diferenciação celular (Simoes & Schoning, 1994). Isso ocorre porque há uma diminuição da sulfatação dos grânulos em mastócitos neoplásicos, tornando-os menos metacromáticos (Klatt *et al.*, 1983). A captação diferenciada da metacromasia nos três graus de mastocitomas também foi observada nesse estudo. Em mastocitomas bem diferenciados predominou acentuada metacromasia, enquanto que nos mastocitomas pouco diferenciados a metacromasia foi menos evidente ou predominou a ortocromasia.

Apesar do sistema de graduação histológica seguir diversas características histológicas pré-definidas (Quadro 7), muitas vezes a classificação é subjetiva, pois patologistas podem determinar diferentes graus para o mesmo tumor. Essa subjetividade é mais acentuada em mastocitomas de diferenciação intermediária (grau II). O prognóstico é

mais difícil de prever e as mortes relatadas nesses animais variam entre 20 e 50% (Bostock *et al.*, 1989). O índice de sobrevivência de cães com mastocitomas de grau II pode variar de 44% (Patnaik *et al.*, 1984) a 94% (Séguin *et al.*, 2001). Esses valores dependem do tempo de avaliação do curso clínico após o diagnóstico, bem como do tamanho do tumor (Séguin *et al.*, 2001). Na nossa prática, o curso clínico dos casos tratados no Hospital Veterinário (HV) ou nas clínicas particulares da região não é registrado. Portanto, não é possível fazer avaliação quanto a esses parâmetros.

É descrito que uma proporção dos mastocitomas de grau II possui comportamento biológico de mastocitomas de grau I e outros de mastocitomas de grau III (Séguin *et al.*, 2001). Nesses casos, deve-se levar em consideração o índice mitótico e a frequência de AgNOR que mede o índice de proliferação celular (Simoes *et al.*, 1994). A frequência de AgNOR em biópsias de mastocitomas é uma técnica que permite objetividade e conseqüentemente, mais precisão no prognóstico (Kravis *et al.*, 1996; Goldschmidt & Hendrick, 2002).

Bostock *et al.* (1989) descreveram pela primeira vez a técnica de AgNOR em mastocitomas caninos e relataram médias de 1,5, 3,2 e 6,3 para os mastocitomas de grau I, II e III respectivamente. A média geral de AgNOR nos mastocitomas pesquisados foi de 1,9 (variação de 1,2 a 4,3), semelhante à média de 2,38 (variação de 1,22 a 4,13) em biópsias descrita por Kravis *et al.* (1996). A técnica de AgNOR foi incorporada ao laboratório de histoquímica para a realização deste trabalho, e, embora os resultados correlacionam com o grau histológico atribuído aos tumores, existem divergências com os resultados obtidos por Bostock *et al.* (1989).

Nos mastocitomas de grau II, os valores de AgNOR oscilaram entre 1,28 e 3,96 e se sobrepuseram aos valores de AgNOR dos graus I e III (Figura 17), pelo amplo comportamento biológico (Séguin *et al.*, 2001). A baixa frequência de AgNOR em relação à descrita por Bostock *et al.* (1989), pode ter ocorrido pelo fato de que os mastocitomas de grau III

aqui analisados apresentaram menor número de figuras mitóticas (4/CMA), quando comparadas com o apresentado por Patnaik *et al.* (1984) e Meuten (2002), que mencionam uma média de 3 a 6, e 8 figuras mitóticas/CMA respectivamente, para os mastocitomas de grau III.

Avaliação quantitativa de AgNOR, à semelhança do relatado em estudo sobre hiperplasia tireoideana (Serakides *et al.*, 1999), permitiu, mais do que o índice mitótico, a correlação entre grau histológico e prognóstico (Kravis *et al.*, 1996), já que essa contagem revela o estágio do ciclo celular. Um aumento no número de AgNOR seria resultado de proliferação celular com aumento na transcrição e aumento do conteúdo celular de DNA (Serakides *et al.*, 1999), o que ocorre em células que proliferam mais ativamente.

Não foi possível avaliar as margens tumorais pelas secções histológicas obtidas. Esse dado é importante em relação à recidiva local de mastocitomas. Recomenda-se uma margem de segurança de 3 cm cranial, caudal e lateralmente ao tumor. A margem inferior do tumor deve se estender pelo menos um plano fascial abaixo da lesão, se a margem de 3 cm nesse plano não puder ser obtida (Michels *et al.*, 2002).

Histologicamente as margens cirúrgicas livres de células tumorais são definidas como as margens com células tumorais mais distantes que 1 a 2 mm da extremidade tumoral, avaliadas em 4 margens laterais e 4 secções da base do tumor (Weisse *et al.*, 2002). Alguns estudos avaliaram o curso clínico de animais com mastocitomas de grau II tratados exclusivamente com cirurgia, geralmente com excisão completa do tumor, e obtiveram sucesso respectivamente em 84 e 89% dos casos (Séguin *et al.*, 2001; Weisse *et al.*, 2002). A discussão sobre a avaliação dos resultados da excisão completa ou incompleta dos tumores no presente estudo, ficou prejudicada pela falta de acompanhamento do curso clínico dos cães com mastocitomas excisados. Contudo, Michels *et al.* (2002), observaram que a recidiva local de mastocitomas não está relacionada com a excisão incompleta. As razões para a falta de



recorrência podem incluir: resposta imunológica às células remanescentes, falta de fatores de crescimento ou dormência tumoral.

## 6. CONCLUSÕES

A revisão sobre mastócitos permitiu conhecer profundamente os mecanismos fisiológicos nos quais essas células estão envolvidas, e que esses mesmos mecanismos são responsáveis por diversas patologias em humanos e animais.

O levantamento de biópsias em cães entre 1980 e 2002 mostrou que houve aumento da incidência de mastocitomas na rotina diagnóstica do Setor de Patologia Veterinária da UFSM.

A técnica de AgNOR, incorporada à rotina do Laboratório de Histoquímica do Setor de Patologia Veterinária é considerada eficaz, de custo acessível e permite predizer um prognóstico mais objetivo dos mastocitomas.

Para a realização de estudo epidemiológico mais acurado de mastocitomas, sugere-se o preenchimento completo dos protocolos relativos aos dados do animal, bem como do acompanhamento do curso clínico após tratamento.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J.S. **Cellular and molecular immunology**. 4<sup>th</sup> ed. Philadelphia : W.B. Saunders, 2000. 553 p.

ASHMAN, L.K. The biology of stem cell factor and its receptor C-kit. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 31, n. 10, p. 1037-1051, 1999.

BEIL, W.J.; SCHULZ, M.; WEFELMEYER, U. Mast cell granule composition and tissue location – a close correlation. **Histology and Histopathology**, v. 15, p. 937-946, 2000.

BISCHOFF, S.C. & SELLGE, G. Mast cell hyperplasia: role of cytokines. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 127, p. 118-122, 2002.

BOCHNER, B.S. & SCHLEIMER, R.P. Mast cells, basophils, and eosinophils: distinct but overlapping pathways for recruitment. **Immunological Reviews**, v. 179, p. 5-15, 2001.

BOCHSLER P.N. & SLAUSON, D.O. Inflammation and repair of tissue. In: SLAUSON, D.O. & COOPER, B.J. **Mechanisms of disease: a textbook of comparative pathology**. 3<sup>th</sup> ed. St Louis : Mosby, 2002. 445 p. cap. 4. p. 140-245.

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

BRAZÍS, P.; QUERALT, M.; MORA, F.; FERRER, L.; PUIGDEMONT, A. Comparative study of histamine release from skin mast cells dispersed from atopic, ascaris-sensitive and healthy dogs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 66; p. 43-51, 1998.

BROWN, S.A. & HILLYER, E.V. Distúrbios dos Animais de Estimação Aviários e Exóticos: Furões. In: BIRCHARD, S.J. & SHERDING, R.G. **Manual Saunders: Clínica de pequenos animais**. São Paulo : Roca, 1998. 1591 p. Seção 12, cap. 8. p. 1472-1502.

BROWN, T.T.; SUTER, M.M.; SLAUSON, D.O. Immunopathology. In: SLAUSON, D.O. & COOPER, B.J. **Mechanisms of disease: a textbook of comparative pathology**. 3<sup>th</sup> ed. St Louis : Mosby, 2002. 445 p. cap. 5. p. 246-297.

BUERGER, R.G. & SCOTT, D.W. Cutaneous mast cell neoplasia in cats: 14 cases (1975-1985). **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 190, n. 11, p. 1440-1444, 1987.

CHARLESWORTH, E.N. The role of basophils and mast cells in acute and late reactions in the skin. **Allergy: European Journal of Allergy & Clinical Immunology, Supplement**, v. 52, n. 34, p. 31-43, 1997.

CHÉNIER, S. & DORÉ, M. P-selectin expression in canine cutaneous inflammatory diseases and mast cell tumors. **Veterinary Pathology**. v. 35, p. 85-93, 1998.

COCKERELL, G.L. & COOPER, B.J. Disorders of cell growth and cancer biology. In: SLAUSON, D.O. & COOPER, B.J. **Mechanisms of disease: a textbook of comparative pathology**. 3<sup>th</sup> ed. St Louis : Mosby, 2002. 445 p. cap. 6. p. 298-377.

COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Robbins: Patologia estrutural e funcional**. 6ª ed. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 2000. 1251 p. cap. 7: Doenças da Imunidade: p. 168-232.

CULLEN, J.M.; PAGE, R.; MISDORP, W. An overview of cancer pathogenesis, diagnosis and management. In: MEUTEN, D.J. **Tumors in domestic animals**. 4<sup>th</sup> ed. Ames: Iowa State Press, 2002. cap. 1. p. 3-44.

CULLING, C.F.A.; ALLISON, R.T.; BARR, W.T. **Cellular pathology technique**. 4<sup>th</sup> ed. London : Butterworths, 1985. 642 p. cap. 3: Staining and impregnation: p. 111-152.

DENBURG, J.A. Differentiation of Human Basophils and Mast Cells. In: MARONE, G. Human Basophils and Mast Cells: Biological Aspects.. **Chemical Immunology**. Basel : Karger, 1985. v. 61, p. 49-71.

DIETSCH, G.N. & HINRICHS, D.J.. Mast cell proteases liberate stable encephalitogenic fragments from intact myelin. **Cellular Immunology**, v. 135, n. 2, p. 541-548, 1991.

DVORAK, A.M. Ultrastructural Analysis of Human Mast Cells and Basophils. In: MARONE, G. Human Basophils and Mast Cells: Biological Aspects. **Chemical Immunology**. Basel : Karger, 1985. v. 61, p. 1-33.

FORSYTHE, P. & ENNIS, M. Clinical consequences of mast cell heterogeneity. **Inflammation Research**, v. 49, p. 147-154, 2000.

FRIMBERGER, A.E.; MOORE, A.S.; LaRUE, S.M.; GLIATTO, J.M.; BENGSTON, A.E. Radiotherapy of incompletely resected, moderately differentiated mast cell tumors in the dog: 37 cases (1989-1993). **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 33, p. 320-324, 1997.

GALLI, S.J. Mast cells and basophils. **Current Opinion in Hematology**, v. 7, p. 32-39, 2000.

GHADIALLY, F.N. **Diagnostic Ultrastructural pathology. A self-evaluation manual**. Tiptree: Butterworths, 1984. 50 p.

GHADIALLY, F.N. **Ultrastructural pathology of the cell and matrix**. 3<sup>th</sup>. Tiptree : Butterworths, 1988. 587 p. 2 v. V. 1, cap. 4: Golgi complex and secretory granules. p. 396-402.

GILLITZER, R. & GOEBELER, M. Chemokines in cutaneous wound healing. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 69, p. 513-521, 2001.

GINN, P.E.; FOX, L.E.; BROWER, J.C.; GASKIN, A.; KURZMAN, I.D.; KUBILIS, P.S. Immunohistochemical detection of p53 tumor-suppressor protein is a poor indicator of prognosis for canine cutaneous mast cell tumors. **Veterinary Pathology**, v. 37, p. 33-39, 2000.

GOLDSCHMIDT, M.H. & HENDRICK, M.J. Tumors of the skin and soft tissues. In: MEUTEN, D.J. **Tumors in domestic animals**. 4<sup>th</sup> ed. Ames: Iowa State Press, 2002. cap. 3. p. 105-109.

GOLKAR, L. & BERNHARD, J.D. Mastocytosis. **The Lancet**, v. 349, p. 1379 –1385, 1997.

HARTMANN, K.; BRUNS, S.B.; HENZ, B.M. Mastocytosis: review of clinical and experimental aspects. **Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings**, v. 6. p. 143-147, 2001.

HARTMANN, K.; HENZ, B.M. Mastocytosis: recent advances in defining the disease. **British Journal of Dermatology**, v. 114, n. 4, p 682-695, 2001.

IWATA, N.; OCHIAI, K.; KADOSAWA, T.; TAKIGUCHI, M.; UMEMURA, T. Canine extracutaneous mast-cell tumors consisting of connective tissue mast cells. **Journal of Comparative Pathology**, v. 123, p. 306-310, 2000.

JANEWAY, C.A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; CAPRA, J.D. **Imunobiologia: o sistema imunológico na saúde e na doença**. 4<sup>a</sup> ed. Porto Alegre : Artes Médicas Sul, 2000. 634 p.

JOHNSON, P.J. Dermatologic tumors (excluding sarcoids). **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v. 14, n. 3, p. 625-658, 1998.

JOHNSON, B.M.; BRIGHTMAN, A.H.; WHITELEY, H.E. Conjunctival mast cell tumor in two dogs. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 24, p. 439-442, 1988.

JOHNSON, T.O.; SCHULMAN, F.Y.; LIPSCOMB, T.P.; YANTIS, L.D. Histopathology and biologic behavior of pleomorphic cutaneous mast cell tumors in fifteen cats. **Veterinary Pathology**, v. 39, p. 452-457, 2002.

JOLLY, S.; COIGNOUL, F.; GABRIEL, A.; DESMECHT, D. Detection of triptase in bovine mast cells: comparison of enzyme- and immunohistochemistry. **Journal of Comparative Pathology**. v. 120, p. 269-279, 1999.

JOLLY, S.; DETILLEUX, J.; COIGNOUL, F.; DESMECHT, D. Enzyme-histochemical detection of a chymase-like proteinase within bovine mucosal and connective tissue mast cells. **Journal of Comparative Pathology**. v. 122, p. 155-162, 2000.

JOLLY, S.; THOMAS, C.; GENICOT, B.; DESSY-DOIZÉ, C.E.; COIGNOUL, F.L.; DESMECHT, D. Effect of intravenous platelet-activating factor on bovine pulmonary mast cells. **Journal of Comparative Pathology**. v. 125, p. 81-89, 2001.

JONES, T.C.; HUNT, R.D.; KING, N.W. **Patologia veterinária**. 6<sup>a</sup> ed. São Paulo : Manole, 2000. 1415 p. cap. 5: Inflamação e reparo: p. 119-166.

KATSAMBAS, A.D.; KARPOUZIS, A.J.; KOUMANTAKI-MATHIOUDAKI, E.; JORIZZO, J.L. Mastocytosis with skin manifestations: current status. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 13, p. 155-165, 1999.

KAWAKAMI, T.; GALLI, S. Regulation of mast-cell and basophil function and survival by IgE. **Nature reviews: Immunology**, v. 2, p. 773-783, 2002.

KIRSHENBAUM, A. Regulation of mast cell number and function. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, v. 14, n. 3, p. 497-516, 2000.

KLATT, E.C.; LUKES, R.J.; MEYER, P.R. Benign and malignant mast cell proliferations: diagnosis and separation using a pH-dependent toluidine blue stain in tissue section. **Cancer**, v.51, p. 1119-1124, 1983.



KNOTTENBELT, D.C. & PASCOE, R.R. **Afecções e distúrbios do cavalo**. São Paulo : Manole, 1998. 432 p. cap. 3: Distúrbios do trato respiratório: p. 91-156.

KRAVIS, L.D.; VAIL, D.M.; KISSEBERT, W.C. et al. Frequency of argyrophilic nucleolar organizer regions in fine-needle aspirates and biopsy specimens from mast cell tumors in dogs. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 209, n. 8, p. 1418-1420, 1996.

KRÖBER, S.M., HORNY, H.P.; RUCK, P.; KÄMMERER, U.; GEISELHART, A.; HANDGRETINGER, R.; GRIESSER, H.; MENKE, D.M.; KAISERLING, E. Mastocytosis: reactive or neoplastic? **Journal of Clinical Pathology**. v. 50, p. 525-533, 1997.

KRÜGER, P.G.; BO, L.; MYHR, K.M.; KARLSEN, A.E.; TAULE, A.; NYLAND, H.I.; MORK, S. Mast cells and multiple sclerosis: a light and electron microscopic study of mast cells in multiple sclerosis emphasizing staining procedures. **Acta Neurologica Scandinavica**, v. 81, p. 31-36, 1990.

LALANI, T.; SIMMONS, R.K.; AHMED, A.R. Biology of IL-5 in health and disease. **Annual Allergy Asthma Immunology**, v. 82, p. 317-333, 1999.

LANGENBACH, A.; MCMANUS, P.M.; HENDRICK, M.J.; SHOFER, F.S.; SORENMO, K.U. Sensitive and specificity of methods of assessing the regional lymph nodes for evidence of metastasis in dogs and cats with solid tumors. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 218, n. 9, p. 1424-1428, 2001.

LONDON, C.A.; KISSERBERTH, W.C.; GALLI, S.J.; GEISLER, E.N.; HELFAND, S.C. Expression of stem cell factor receptor (*c-kit*) by the malignant mast cells from spontaneous canine mast cell tumors. **Journal of Comparative Pathology**, v. 115, p. 399-414, 1996.

LUKACS, N.W. Role of chemokines in the pathogenesis of asthma. **Nature reviews: Immunology**, v. 1, n. 2, p. 108-116, 2001.

MARONE, G.; CASOLARO, V.; PATELLA, V.; FLORIO, G.; TRIGGIANI, M. Molecular and cellular biology of mast cells and basophils. **International Archives and Allergy Immunology**, v. 114, p. 207-217, 1997.

MARUYAMA, H.; SUGIHARA, S.; ISHIHARA, K.; SADA, K.; TSUTSUMI, M.; TSUJIUCHI, T.; NAKAE, D.; KONISHI, Y. Systemic mast cell disease with splenic infarction: a case report. **Pathology International**, v. 48, p. 403-411, 1998.

McMANUS, P.M. Frequency and severity of mastocytosis in dogs with and without mast cell tumors: 120 cases (1995-1997). **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 215, n. 3, p. 355-357, 1999.

McNEIL, H.P. The mast cell and inflammation. **Australian and New Zealand Journal of Medicine**, v. 26, p. 216-225, 1996.

MELEO, K.A. Tumors of the skin and associated structures. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 27, n. 1, p. 73-94, 1997.

METCALFE, D.D.; BARAM, D.; MEKORI, Y.A. Mast cells. **Physiological Reviews**, v. 77, n. 4, p. 1033-1079, 1997.

MEUTEN, D.J. Appendix: Diagnostic Schemes and Algorithms. In: \_\_\_\_\_. **Tumors in domestic animals**. 4<sup>th</sup> ed. Ames: Iowa State Press, 2002. p. 755-769.

MICHELS, G. M.; KNAPP, D.W.; DENICOLA, D.B.; GLICKMAN, N.; BONNEY, P. Prognosis following surgical excision of canine cutaneous mast cell tumors with histopathologically tumor-free versus nontumor-free margins: a retrospective study of 31 cases. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 38, p. 458-466, 2002.

MILLER, D.M. The occurrence of mast cell tumors in young Shar-Peis. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 7, p. 360-363, 1995.

MOLANDER-McCRARY, H.; HENRY, C.J.; POTTER, K.; TYLER, J.W.; BUSS, M.S. Cutaneous mast cell tumors in cats: 32 cases (1991-1994). **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 34, p. 281-284, 1998.

MOORE, L.E.; GARRETT, L.D.; DEBEY, B.; BILLER, D.S. Spinal mast cell tumor in a dog. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 38, p. 67-70, 2002.

MOTA, I. The mast cell revisited. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 28, p. 895-901, 1995.

MURPHY, G.F. & MIHM, M.C. A Pele. In: COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Robbins: Patologia estrutural e funcional**. 6<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 2000. 1251 p. cap. 27: p. 1048-1086.

O'KEEFE, D.A. Canine mast cell tumors. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**. v. 20, n. 4, p. 1105-1115, 1990.

OTT, V.L. & CAMBIER, J.C. Activating and inhibitory signaling in mast cell: new opportunities for therapeutic intervention? **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.106, p. 429-440, 2000.

OZAKI, K.; YAMAGAMI, T.; NOMURA, K.; NARAMA.I. Mast Cell Tumors of the Gastrointestinal Tract in 39 Dogs. **Veterinary Pathology**, v. 39, p. 557-564, 2002.

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

PATNAIK, A.K.; MacEWEN, E.G.; BLACK, A.P.; LUCKOW, S. Extracutaneous mast-cell tumor in the dog. **Veterinary Pathology**. v. 19, p. 608-615, 1982.

PLOTON, D.; MENAGER, M.; JEANNESSON, P.; HIMBER, G.; PIGEON, F.; ADNET, J.J. Improvement in the staining and in the visualization of the argyrophilic proteins of the nucleolar organizer region at the optical level. **Histochemical Journal**, v. 18, p. 5-14, 1986.

PULLEY, L. & STANNARD, A.A. Tumor of the skin and soft tissues. In: MOULTON, J. **Tumors in the domestic animals**. 3<sup>rd</sup> ed. Berkeley : University of California, 1990. 672 p, cap. 3. p. 23-87.

RAMÍREZ-ROMERO, R.; BROGDEN, A.; GALLUP, J.M.; DIXON, R.A.F.; ACKERMANN, M.R. Reduction of pulmonary mast cells in areas of acute inflammation in calves with *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* pneumonia. **Journal of Comparative Pathology**, v. 123, p. 29-35, 2000.

RANG, H.P.; DALE M.M.; RITTER, J.M. **Farmacologia**. 3ª ed. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 1997. 743 p. cap. 11: Hormônios locais, inflamação e alergia: p. 169-193.

REGUERA, M.J.; RABANAL, R.M.; PUIGDEMONT, A.; FERRER, L. Canine mast cell tumors express stem cell factor receptor. **The American Journal of Dermatopathology**, v. 22, p. 49-54, 2000.

ROBBIE-RYAN, M. & BROWN, M.A. The role of mast cells in allergy and autoimmunity. **Current Opinion in Immunology**, v. 14, n. 6, p. 728-733, 2002.

ROGERS, K.S. Mast cell tumors: dilemmas of diagnosis and treatment. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 26, n. 1, p. 87-102, 1996.

SCHWARTZ, L.B.; KEPLEY C. Development of markers for human basophils and mast cells. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 94, n. 6, p. 1231-1240, 1994.

SCOTT, D.W.; MILLER, W.H.; GRIFFIN, C.E. **Dermatologia de pequenos animais**. 5ª ed. Rio de Janeiro : Interlivros, 1996a. 1130 p. cap. 8: Doenças imunológicas da pele: p. 448-580.

SCOTT, D.W.; MILLER, W.H.; GRIFFIN, C.E. **Dermatologia de pequenos animais**. 5ª ed. Rio de Janeiro : Interlivros, 1996b. 1130 p. cap. 19: Tumores Neoplásicos e Não neoplásicos: p. 926-1054.

SCOTT, M.A. & STOCKHMAN, S.L. Basophils and Mast Cells. In: FELDMAN, B.F.; ZINKL, J.G.; JAIN, N.C. **Schalm's: Veterinary hematology**. 5ª ed. Baltimore : Lippincott Williams & Wilkins, 2000. 1344 p, cap. 48. p. 308-317.

SÉGUIN, B.; LEIBMAN, N.F.; BREGAZZI, V.S.; OGILVIE, G.K.; POWERS, B.E.; DERNELL, W.S.; FETTMAN, M.J.; WITHROW, S.J. Clinical outcome of dogs with grade-II mast cell tumors treated with surgery alone: 55 cases (1996-1999). **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 218, n. 7, p-1120-1123, 2001.

SERAKIDES, R.; NUNES, V.A.; SANTOS, R.L.; CASSALI, G.D., COSTA NETO, P.P. Histomorphometry and quantification of nucleolar organizer regions in bovine thyroid containing methylthiouracil residues. **Veterinary Pathology**, v. 36, p. 574-582, 1999.

SHIMIZU, H.; NAGAKUI, Y.; TSUCHIYA, K.; HORII, Y. Demonstration of chymotryptic and tryptic activities in mast cells of rodents: comparison of 17 species of the family muridae. **Journal of Comparative Pathology**, v. 125, p. 76-79, 2001.

SIMOES, J.P.C. & SCHONING, P. Canine mast cell tumors: a comparison of staining techniques. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 6, p. 458-465, 1994.

SIMOES, J.C.P.; SCHONING, P.; BUTINE, M. Prognosis of canine mast cell tumors: a comparison of three methods. **Veterinary Pathology**, v. 31, p. 637-647, 1994.

STAUBER, E.; ROBINETTE, J.; BASARABA, R.; RIGGS, M.; BISHOP, C. Mast cell tumors in three ferrets. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 196, n. 5, p. 766-767, 1990.

STOLTE, M. & WELLE, M. Cutaneous mast cell tumors in a lion (*Panthera leo*): a light and transmission electron microscopical study. **Journal of Comparative Pathology**, v. 113, p. 291-294, 1995.

TAKAHASHI, T.; KADOSAWA, T.; NAGASE, M.; MATSUNAGA, S.; MOCHIZUKI, M.; NISHIMURA, R.; SASAKI, N. Visceral mast cell tumors in dogs: 10 cases (1982-1997). **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 216, n. 2, p. 222-226, 2000.

TIZARD, I.R. **Imunologia veterinária: uma introdução**. 5ª ed. São Paulo : Roca, 1998. 545 p. cap. 26: Hipersensibilidade do tipo I: p. 357-372.

TOMITA, Y.; AOZAVA, K.; MYOUI, A.; KURATSU, S.; UCHIDA, A.; ONO, K.; MATSUMOTO, K. Histologic grading in soft-tissue sarcomas. An analysis of 194 cases including AgNOR count and mast-cell count. **International Journal of Cancer**, v. 54, p. 194-199, 1993.

TURREL, J.M.; KITCHELL, B.E.; MILLER, L.M.; THÉON, A. Prognostic factors for radiation treatment of mast cell tumor in 85 dogs. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 193, n. 8, p. 936-940, 1988.

UTHAISANGSOOK, S.; DAY, N.K.; BAHNA, S.L.; GOOD, R.A.; HARAGUCHI, S. Innate immunity and its role against infections. **Annual Allergy Asthma Immunology**, v. 88, p. 253-265, 2002.

VAIL, D.M. Mast cell tumors. In: WITHROW, S.J. & MACEWEN, E.G. **Small Animal Clinical Oncology**. 2<sup>nd</sup> ed. Philadelphia : WB Saunders, 1996. 589 p. cap. 16. p 192-210.

WEDEMEYER, J. & GALLI, S.J. Mast cells and basophils in acquired immunity. **British Medical Bulletin**, v. 56, n. 4, p. 936-955, 2000.

WEISS, D.L. & BROWN, A. Regulation of IL-4 production in mast cells: a paradigm for cell-type-specific gene expression. **Immunological Reviews**, v. 179, p 35-47, 2001.

WEISSE, C.; SHOFER, F.C.; 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.

WELLE, M.M.; OLIVRY, T.; GRIMM, S.; SUTER, M. Mast cell density and subtypes in the skin of dogs with atopic dermatitis. **Journal of Comparative Pathology**, v. 120, p. 187-197, 1999.

WILKINSON, G.T. & HARVEY, R.G. **Color atlas of small animal dermatology: a guide to diagnosis**. 2<sup>th</sup> ed. London : Wolfe, 1994. 304 p. cap. 8: Hypersensitivities: p. 133-157.

WILLEMSE, T. **Dermatologia clínica de cães e gatos: guia para o diagnóstico e terapêutica**. São Paulo : Manole, 1995. 141 p. cap. 6: Doenças imunológicas: p. 44-74.



YAGER, J.A. & WILCOCK, B.P. **Color atlas and text of surgical pathology of the dog and cat: dermatopathology and skin tumors.** London : Mosby-Year Book, 1994. 302 p. cap. 18: Round Cell tumors: p. 273-286.

YAGER, J.A.; SCOTT, D.W.; WILCOCK, B.P. The skin and appendages. In: JUBB, K.V.; KENNEDY, P.C.; PALMER, N. **Pathology of domestic animals.** 4<sup>th</sup> ed. San Diego : Academic, 1993. 780 p. 3v. V.1, cap 5. p. 531-737.

YAMAMOTO, T.; HARTMANN, K.; ECKES, B.; KRIEG, T. Role of stem cell factor and monocyte chemoattractant protein-1 in the interaction between fibroblasts and mast cells in fibrosis. **Journal of Dermatological Science**, v. 26 p. 106-111, 2001.

YAMAMURA, H.; NABE, T.; KOHNO, S.; OHATA, K. Endothelin-1, one of the most potent histamine releasers in mouse peritoneal mast cells. **European Journal of Pharmacology**, v. 265, p. 9-15, 1994.

YONG, L.C.J. The mast cell: origin, morphology, distribution, and function. **Experimental Toxic Pathology**, v. 49, p. 409-424, 1997.

ZAPPULLA, J.P.; AROCK, M.; MARS, L.T.; LIBLAU, R.S. Mast cells: new targets for multiple sclerosis therapy? **Journal of Neuroimmunology**, v. 131, p. 5-20, 2002.

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, p. 341-345, 2001.

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

**ANEXO A** – Mastócitos em condições normais e patológicas com ênfase em mastocitomas de cães. Coloração de AgNOR.

- Demonstra os estágios de mastocitomas em esfregaços citológicos e biópsias

**Soluções:**

Nitrato de prata 50%

Nitrato de prata.....50 g  
Água deionizada.....100 ml

Solução de gelatina

Gelatina.....2 g  
Ácido fórmico.....1 ml  
Água deionizada.....100 ml

Solução de trabalho

Nitrato de prata.....8 ml (2 partes)  
Solução de gelatina.....4 ml (1 parte)

Misture a solução acima imediatamente antes do uso. O volume da solução de trabalho usada depende do número de lâminas a serem coradas. Este volume é adequado para corar aproximadamente 5 lâminas (em caixinha plástica\* para guardar lâminas).

**Procedimento**

**Tempo: 1 hora.**

1. Desparafine e hidrate as lâminas em água deionizada (somente para biópsias)
2. Neste ponto começa o procedimento para esfregaços
3. Coloque as lâminas na solução de trabalho em uma caixinha plástica\* por 45 minutos em temperatura ambiente.
4. Lave as lâminas em água deionizada por 1 minuto;
5. Opcional: contracorar com amarelo de metanila por 3 minutos;
6. Desidrate, clarifique e monte a lâmina usando resina sintética;

**Para esfregaços:**

1. Deixe as lâminas em temperatura ambiente
2. Secar ao ar
3. Fixar em acetona por 10 minutos
4. Secar novamente
5. Começar no passo 3 da técnica acima.

**Resultados**

Locais AgNOR – pontos pretos intranucleares

Fundo – amarelo pálido

**ANEXO B** - Mastócitos em condições normais e patológicas com ênfase em mastocitomas de cães. Antígenos CD relacionados aos mastócitos e basófilos.

<b>Antígeno CD</b>	<b>Expressão Celular</b>	<b>Funções</b>	<b>Outros Nomes</b>	<b>Famílias relacionadas</b>
<b>CD9</b>	Células pré-B, eosinófilos, basófilos, plaquetas	Medeia agregação de plaquetas e ativação via Fc $\gamma$ RIIa e pode ter função na migração celular	-	Proteína transmembrana 4 (TM4)
<b>CD11</b>	Células mielóides	Subunidade $\alpha$ X $\alpha$ integrina CR4 (associada com CD18); liga fibrinogênio	CR4, p150,95	Integrina $\alpha$
<b>CD15s</b>	Leucócito, endotélio	Ligante para CD62E, P	Sialil-Lewis	Poli-N-acetil-lactosamina
<b>CD18</b>	leucócitos	Subunidade de $\beta$ 2 integrina associa com CD11	-	Integrina $\beta$
<b>CD25</b>	Células T ativadas, células B, monócitos	Cadeia $\alpha$ do receptor de IL-2	Tac	Proteína de CCP
<b>CD29</b>	Leucócitos	Subunidade $\beta$ 1 integrina, associa-se com a integrina CD49a na integrina VLA-1	-	Integrina $\beta$
<b>CD33</b>	Células mielóides progenitoras	Liga-se aos sialoconjugados	-	Imunoglobulinas
<b>CD34</b>	Precusores hematopoéticos	Ligante para CD62L (selectina L)	-	Mucina
<b>CD38</b>	Células T e B precoces, células T ativadas, Células B, plasmócitos	Glicohidrolase NAD, aumenta a proliferação de células B	T10	-
<b>CD43</b>	leucócitos	-	Leucosialina, sialopori na	Mucina
<b>CD44</b>	Leucócitos, eritrócitos	Liga ácido hialurônico, medeia a adesão de leucócitos	Antígeno Hermes Pgp-1	Proteína de ligação
<b>CD49d</b>	Células B, timócitos, monócitos, granulócitos, células dendríticas	Integrina $\alpha$ 4, associa eutactina com CD29, liga fibronectina, MadCAM-1, VCAM-1	VLA-4	Integrina $\alpha$
<b>CD51</b>	Plaquetas, megacariócitos	Associa-se com CD61, liga vitronectina, fator de von Willebrand	Receptor vitronectina	Integrina $\alpha$
<b>CD54</b>	Célula hematopoética e não-hematopoética	Molécula de adesão, liga-se com CD11a/CD18 e integrina (LFA-1), CD11b/CD18 (Mac-1)	ICAM-1	Imunoglobulina
<b>CD59</b>	Célula hematopoética e não-hematopoética	Liga os componentes do complemento C8 e C9	Inibidor Mac	Ly-6

<b>CD61</b>	Plaquetas, megacariócitos, macrófagos	Subunidade $\beta$ 3 da integrina, associa com CD41 ou CD51	-	Integrina $\beta$
<b>CD63</b>	Plaquetas ativadas, monócitos, macrófagos	Proteína de membrana lisossômica	-	Transmembrana 4
<b>CD88</b>	Leucócitos, polimorfonuclear, macrófagos e mastócitos	Receptor do componente C5a do sistema complemento	C5aR	Receptor ligado à proteína G
<b>CD106</b>	Células endoteliais	Molécula de adesão, ligante para VLA-4	VCAM-1	Imunoglobulina
<b>CD117</b>	Progenitores hematopoéticos	Receptor do fator de célula tronco	c-kit	Imunoglobulina, tirosina-quinase
<b>CD123</b>	Células tronco da medula óssea	Cadeia $\alpha$ de receptor IL-3	IL-3R $\alpha$	Receptor de citocina, fibronectina tipo III
<b>CD124</b>	Células T e B maduras, céls. hematopoéticas	Receptor IL-4	IL-4R	Receptor de citocina, fibronectina tipo III
<b>CD125</b>	Eosinófilos, basófilos e céls. B ativadas	Receptor IL-5	IL-5R	Receptor de citocina, fibronectina tipo III
<b>CD128</b>	Neutrófilos, basófilos, subgrupo de céls. T	Receptor IL-8	IL-8R	Receptor ligado à proteína G
<b>CD162</b>	Neutrófilos, linfócitos, monócitos	Ligante para CD62P	PSGL-1	Mucina

**ANEXO C** - Mastócitos em condições normais e patológicas com ênfase em mastocitomas de cães. Citocinas e seus receptores relacionados com mastócitos e basófilos.

<b>Citocinas</b>	<b>Receptores</b>	<b>Células produtoras</b>	<b>Funções</b>
<b>IL-3</b>	CD123	Céls. T, céls. tímicas epiteliais	Ação sinérgica no início da hematopoese
<b>IL-4</b>	CD124, CD132	Células T, mastócitos	Ativação de céls. B, mudança para IgE
<b>IL-5</b>	CD125	Células T, mastócitos	Crescimento e diferenciação de eosinófilos
<b>IL-6</b>	CD126, CD130	Céls T, macrófagos e céls. endoteliais	Crescimento e diferenciação de céls. T e B
<b>IL-9</b>	CD132	Células T	Melhora a atividade dos mastócitos
<b>IL-10</b>	IL-10R	Células T, macrófagos e células B	Potente supressor das funções dos macrófagos
<b>IL-12</b>	IL-12R	Células B, macrófagos	Ativa céls. NK, induz diferenciação das células T CD4
<b>IL-13</b>	IL-13R	Células T, diferenciação de células	Crescimento de células B, inibe a produção de citocinas dos macrófagos
<b>IL-15</b>	IL-15R, CD122, CD132	Células T	Similar a IL-2 (proliferação de células T)
<b>IL-16</b>	CD4	Células T, mastócitos, eosinófilos	Quimioatraente para células T CD4
<b>GM-CSF</b>	CD116	Macrófagos, células T	Estimula o crescimento e diferenciação de células mielomonocíticas
<b>IFN-<math>\alpha</math> (interferon)</b>	Cd118	Leucócitos	Antiviral, aumenta a expressão de MHC da classe II
<b>IFN-<math>\beta</math></b>	CD118	fibroblastos	Antiviral, aumenta a expressão de MHC da classe I
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	CD119	Células T, NK	Ativação de macrófagos e expressão aumentada de moléculas MHC
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	P55, p75, CD120	Macrófagos, células NK e T	Inflamação local, ativação endotelial
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	TGF- $\beta$ R	Condrócitos, monócitos e células T	Inibe o crescimento celular, anti-inflamatório

**ANEXO D** – Mastócitos em condições normais e patológicas com ênfase em mastocitomas de cães. Principais quimiocinas e seus receptores relacionados com mastócitos e basófilos.

<b>Quimiocina</b>	<b>Receptor</b>	<b>Célula-alvo</b>
<b>IL-8</b>	CXCR1,2	Neutrófilo, basófilo, célula T
<b>MCP-3</b>	CCR2	Célula T, monócito, eosinófilo, basófilo, célula dendrítica
<b>MCP-4</b>	CCR2,3	Célula T, monócito, eosinófilo, basófilo, célula dendrítica
<b>MIP-1<math>\alpha</math> e <math>\beta</math></b>	CCR1,5	Monócito, macrófago, células NK, basófilo, célula dendrítica imatura, célula da medula óssea
<b>MCP-1</b>	CCR2	Célula T, monócito, basófilo
<b>RANTES</b>	CCR1,3,5	Monócito, macrófago, célula T, NK, basófilo, eosinófilo, célula dendrítica

**APÊNDICE A** – Mastócitos em condições normais e patológicas com ênfase em mastocitomas de cães. Número anual de cães com menos de 6 anos e 6 anos de idade ou mais (Ver seção Discussão).

Ano	Menos de 6 anos	%	6 anos ou mais	%	Não informado	%
1980	37	49,4	22	<b>29,3</b>	16	21,3
1981	37	45,1	18	<b>22,0</b>	27	32,9
1982	27	46,3	20	<b>34,5</b>	11	19,0
1983	50	53,1	27	<b>28,9</b>	17	18,0
1984	28	47,5	20	<b>33,9</b>	11	18,6
1985	28	43,8	32	<b>49,9</b>	4	6,3
1986	52	38,2	73	<b>53,7</b>	11	8,1
1987	37	42,6	48	<b>55,1</b>	2	2,3
1988	36	57,1	23	<b>36,1</b>	4	6,4
1989	60	36,1	47	<b>28,3</b>	59	35,6
1990	35	26,5	48	<b>36,4</b>	49	37,1
1991	39	37,1	61	<b>58,1</b>	5	4,8
1992	38	48,1	37	<b>46,8</b>	4	5,1
1993	34	41,9	40	<b>49,4</b>	7	8,7
1994	49	43,4	49	<b>43,3</b>	15	13,3
1995	50	41,3	65	<b>56,7</b>	6	5,0
1996	67	42,7	76	<b>48,4</b>	14	8,9
1997	56	29,6	78	<b>40,8</b>	55	29,1
1998	35	23,5	70	<b>47,0</b>	44	29,5
1999	55	32,0	92	<b>53,4</b>	25	14,5
2000	68	33,3	118	<b>57,9</b>	17	8,8
2001	86	37,5	131	<b>57,2</b>	12	5,3
2002	78	29,0	178	<b>66,2</b>	13	4,8
<b>Total</b>	<b>1082</b>	-	<b>1373</b>	-	<b>428</b>	-