

Lilian Barreto Elston

Concordância entre Observadores e Importância Prognóstica das Variáveis De Patnaik, Ehler & MacEwen e da Análise Sintática Estrutural De Mastocitoma Cutâneo Canino.

Campinas

2009

Lilian Barreto Elston

Concordância entre Observadores e Importância Prognóstica das Variáveis de Patnaik, Ehler & MacEwen e da Análise Sintática Estrutural de Mastocitoma Cutâneo Canino.

*Tese de Doutorado apresentada à
Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas
Universidade Estadual de Campinas,
Para obtenção do título de Doutor em Fisiopatologia Médica,
Área de concentração Biologia Estrutural, Celular, Molecular e do
Desenvolvimento.*

Orientador: Prof. Dr. Konradin Metze

Co-orientador: Dr. Randall Luiz Adam

CAMPINAS

Unicamp

2009

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

EL79c Elston, Lillian Barreto
Concordância entre observadores e importância prognostica das variáveis de Patnaik, Ehler & MacEwen e da análise sintática estrutural de mastocitoma cutâneo canino / Lillian Barreto Elston. Campinas, SP : [103], 2009.

Orientadores : Konradin Metze, Randall Luiz Adam
Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Estadiamento de neoplasias. 2. Diagnóstico por computador.
3. Prognóstico. 4. Mastocitoma cutâneo. I. Metze, Konradin. II. Adam, Randall Luiz. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Título em inglês : “Agreement between observers and Prognostic relevance of variables from Patnaik, Ehler & MacEwen and Syntactic Structure Analysis of Cutaneous Canine Mast Cell Tumor”

Keywords: • Neoplasm staging
• Diagnosis, computer-assisted
• Prognostic
• Mastocytoma, skin

Titulação: Doutor em Fisiopatologia Médica
Área de concentração: Biologia Estrutural, Celular, Molecular e do Desenvolvimento

Banca examinadora:

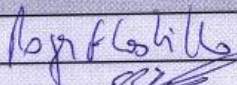
Prof. Dr. Roger Frigério Castilho
Prof. Dr. Marcelo Emílio Beletti
Prof. Dr. Luiz Henrique de Araújo Machado
Profa. Dra. Maria Letícia Cintra
Profa. Dra. Rita de Cássia Ferreira
Data da defesa: 16-12-2009

Banca examinadora da tese de Doutorado
Lilian Barreto Elston

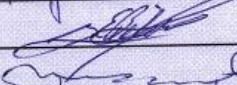
Orientador(a) : Prof(a). Dr(a). Konradin Metze

Membros:

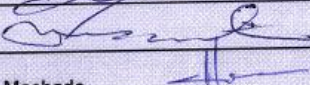
1. Prof(a). Dr(a). Roger Frigerio Castilho



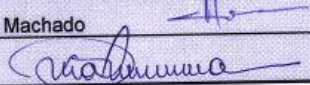
2. Prof(a). Dr(a). Marcelo Emilio Beletti



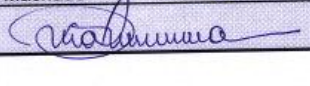
3. Prof(a). Dr(a). Maria Letícia Cintra



4. Prof(a). Dr(a). Luiz Henrique de Araújo Machado



5. Prof(a). Dr(a). Rita de Cássia Ferreira



Curso de pós-graduação em Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas.

Data: 16/12/2009

Dedico este trabalho:

***A minha mãe Nilda Barreto da Silva cuja força e retidão foram modelos para
minha conduta.***

***A meu marido Flavio Elston por seu amor, companheirismo e ajuda
inestimáveis na elaboração de minhas teses.***

***A minha família pelas horas de dedicação que lhes tomei para esta
realização.***

***A meus filhos Mariana, Daniel e Sérgio
por terem compreendido melhor que muitos adultos a importância e as
dificuldades inerentes a esta realização e por me apoiarem a continuar
quando muitos me estimulavam a desistir.***

Ao Prof. Dr. Konradin Metze por sua competente orientação e amizade.

Ao Dr. Randall Luiz Adam por sua co-orientação e por ceder o software.

Aos Drs. Josemara Neves Cavalcanti e Felipe Ruiz Sueiro pelo empenho na realização deste trabalho e por cederem parte do material.

Aos componentes da banca de qualificação e defesa pela participação:

Prof. Dr. Fernando Cendes;

Prof. Dr. Tiago Pereira;

Prof. Dr. Roger Castilho;

Prof. Dr. Marcelo Emílio Beletti;

Prof. Dr. Luiz Henrique de Araújo Machado;

Profa. Dra. Maria Letícia Cintra;

Profa. Dra. Rita de Cássia Ferreira;

A Profa. Dra. Irene Lorent-Metze pelo apoio técnico-logístico e por me ter recebido tão bem em sua casa em seus dias de descanso.

Ao Coordenador do Curso de Medicina Veterinária da PUCMINAS- Campus Poços de Caldas, Prof. Dr. Moacir Leomil Neto pelo apoio amigo ao longo destes anos.

À Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais pelo suporte financeiro.

À secretaria Maria do Carmo pelo incentivo e apoio desde 2000.

À secretaria Salete pela presteza e solicitude.

Aos funcionários do Núcleo de Pesquisa e laboratório de hematologia da Unicamp.

A Médica Veterinária M.Sc. Maria Luiza de Castro Valadão por me indicar ao doutorado.

Aos meus sogros Linneo Elston e Suzy May Elston pelo apoio e carinho.

Aos amigos Bió, Fê, LH, Moa por seu incentivo a continuar esta jornada.

Ao prof. Dr. Roberto Manzan (*in memorian*) por ceder o material de forma tão despreendida.

A Fran (*in memorian*) minha eterna mãe do coração.

A Nina (*in memorian*), cuja incondicional fidelidade me levou a desejar entender melhor os mastocitomas.

*“O começo de todas as ciências
é o espanto de as coisas serem o que são”*

Aristóteles

O sistema de graduação histológica desenvolvido por Patnaik *et al.* (1984), provou ser de relevância prognóstica nos Mastocitomas Cutâneos Caninos (MCC). Os parâmetros subjetivos utilizados em sua graduação têm levado patologistas veterinários a conferir diferentes graus a uma mesma amostra. Este fato pode refletir negativamente no estabelecimento do protocolo terapêutico baseado em tal método. A ampliação das possibilidades de ferramentas prognósticas objetivas pode auxiliar a diminuir o problema da concordância da graduação. Este estudo tem por objetivo calcular a concordância entre observadores no processo de graduação, estabelecer quais os parâmetros são de relevância prognóstica, desenvolver nova técnica simplificada de graduação baseada em parâmetros histológicos de concordância adequada, e estabelecer a relevância prognóstica das variáveis de sociologia celular como ferramenta prognóstica objetiva e confiável. Grau de Patnaik, parâmetros histológicos e o coeficiente kappa livre de margens foram calculados para cada uma das amostras dos 81 cães de diferentes raças, sexo, e idade. De 56 destas amostras foram obtidos dados quanto à sobrevida e, de suas lâminas histológicas, foram adquiridas imagens digitalizadas para fins de análise sintática estrutural (ASE). ASE das amostras, mediante construção de grafos como Mosaico Voronoi (MV), Triangulação Delaunay (TD) e Árvore Geradora Mínima (AGM), foi automaticamente realizada pelo programa “Sociology” desenvolvido pelo Dr. Randall Luiz Adam. Nossos resultados confirmaram a fraca concordância do método de Patnaik para graduação dos MCCs por três experimentados patologistas veterinários ($K_{free}=0,28$). A avaliação mitótica (quanto maior o seu número pior o prognóstico) e a granulação intracitoplasmática (quanto mais granulação melhor o prognóstico) revelaram-se como variáveis independentes de relevância prognóstica ($B=0.760$ e $-0,989$; $p=0,045$ e $0,014$ respectivamente) e com razoável concordância ($K_{free}\geq 0,35$), quando todas as variáveis relevantes ($p\leq 0,05$) quanto à sobrevida e de razoável concordância foram submetidas à análise multivariada pela Regressão de Cox. Deste modo, desenvolveu-se um método simples, sob a forma de escore o qual

variava de -2 a +2 (porquanto a granulação tem caráter protetor sendo $B = - 0,989$) e se mostrava estatisticamente significativo para sobrevida ($p \leq 0,004$). Por outro lado, o estudo da sociologia celular revelou que, os coeficientes de variação (CV) do perímetro, da esfericidade e da área dos polígonos do MV ($p=0.029$, $p=0,028$ e $p= 0,031$ respectivamente), o CV dos ângulos máximos dos triângulos da TD ($p=0,026$), provaram ser variáveis objetivas significativas, indicando a relação entre desordem arquitetural e malignidade. Desta forma o estudo matemático da arquitetura tissular de MCCs revelou-se como uma nova e promissora ferramenta na avaliação prognóstica de MCCs.

ABSTRACT

Histological based grading system developed by Patnaik *et al.* (1984) has proved to be of prognostic relevance in Cutaneous Mast cell tumors (CMC). The subjective histological parameters used in grading may lead different veterinary pathologists to access different grade for the same MCC, this fact may negatively reflect in the treatment protocol based on this grading system. Disclosing new objective prognostic tools may help to minimize the problem of grading. The aim of this study is to calculate interobserver agreement in the grading process, to establish which histological parameters are of prognostic relevance, to reveal a novel simplified prognostic technique based on these parameters and to establish the prognostic relevance of cellular sociology parameters as an objective prognostic tool. Patnaik's grade, histological parameters and the Kappa free coefficient were calculate for each one of eighty-one dogs from different breeds, sex, and ages. From 56 with defined survival time we achieved digitalized images with cellular sociology purposes. The "Sociology" software then performed syntactic Structural Analysis (SSA) with Voronoi Tessellation (VT), Delaunay Triangulation (DT) and Minimum Spanning Tree (MST). Our results statistically confirmed the poor interobserver agreement in the MCC grading ($K_{free} = 0,28$). When all agreement and prognostic relevant parameters were submitted to multivariate analyses with Cox regression, mitotic evaluation and intracitoplasmatic granulation showed to be independents parameters with prognostic relevance ($B = 0,760$ e $-0,989$; $p = 0,045$ and $p = 0,014$) and with reasonable agreement ($K_{free} < 0,35$). We performed a score that varies from -2 to +2 (since granulation is a protective one) with these two relevant parameters. This new simple score system significantly correlated to survival ($p \leq 0,004$). In the other hand, the prognostic relevance of cellular sociology, reveals that coefficient of variation (CV) of perimeter, area and roundness from Voronoi polygons ($p = 0,029$; $0,031$; $0,028$ respectively) and CV of maximum angle of DTs ($p = 0,026$) are significant objective parameters. These findings indicated the relationship between structural disorder and malignancy of MCTs and pointed out SSA as a new reliable tool to prognosticate MCTs.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Mastocitoma cutâneo canino classificado como grau I	24
Figura 2 - Mastocitoma cutâneo canino classificado como grau II	24
Figura 3 - Mastocitoma cutâneo canino classificado como grau III	25
Quadro 1 - Relação entre índice Kappa e grau de concordância	28
Figura 4 - Construção do Mosaico Voronoi	32
Figura 5 - Influência da arquitetura tissular no formato do Polígono Voronoi	32
Figura 6 – Fotomicrografia de MCC com Mosaico Voronoi e Triangulação Delaunay correspondentes marcadas na imagem original (HE, 400X)	33
Figura 7 - Aspectos das distribuições dos PV no Mosaico Voronoi	34
Figura 8 - Formação da Triangulação Delaunay	35
Figura 9 - Formação da Árvore Geradora Mínima	35
Tabela 1 - Aspectos clínicos dos casos avaliados	51
Tabela 2 - Presença de nódulos cutâneos	52
Tabela 3 - Comparação da idade dos animais de acordo com a raça	52
Tabela 4 - Número de MCCs por grau dos três observadores	53
Tabela 5 - Sobrevida média dos animais em cada grau de Patnaik	53
Tabela 6 - Valores de κ_{free} para dados categorizados	53
Tabela 7 - Variáveis de Patnaik relevantes sobrevida e respectivos κ_{free}	55
Figura 10 - Ilustração de granulação Grau - 3	56
Figura 11 - Ilustração de granulação Grau - 2	57
Figura 12 - Ilustração de granulação Grau - 1	58
Tabela 8 - Resultados da análise de sobrevida do escore proposto	59
Gráfico 1 - Curva de sobrevida do grau de consenso	60
Gráfico 2 - Escore do grau de consenso	60
Gráfico 3 - Curva de sobrevida do grau conferido pelo observador	61
Gráfico 4 - Curva de sobrevida do escore do observador 1	61
Gráfico 5 - Curva de sobrevida do grau conferido pelo observador 2	62
Gráfico 6 - Curva de sobrevida do escore do observador 2	62
Gráfico 7 - Curva de sobrevida do grau conferido pelo observador 3	63

Gráfico 8 - Curva de sobrevida do escore do observador 3_____	63
Tabela 9 – Variáveis de ASE de relevância prognóstica_____	64
Gráfico 9 - Curva de sobrevida do CV do perímetro dos PV_____	65
Gráfico 10 - Curva de sobrevida do CV do ângulo máximo dos TD_____	65
Gráfico 11 - Curva de sobrevida do CV da esfericidade dos PV_____	66
Gráfico 12 - Curva de sobrevida do CV da área dos PV_____	66
Figura 13 – Ilustração animal G I – Triangulação Delaunay_____	67
Figura 14 – Ilustração animal G I – Mosaico Voronoi_____	68
Figura 15 – Ilustração animal G II – Triangulação Delaunay_____	69
Figura 16 – Ilustração animal G II – Mosaico Voronoi_____	69
Figura 17 – Ilustração animal G III – Triangulação Delaunay_____	70
Figura 18 – Ilustração animal G III – Mosaico Voronoi_____	71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGM = Árvore Geradora Mínima.

ASE = Análise Sintática Estrutural.

CMC= cutaneous mast cell tumor

CS= Cellular Sociology

CV= Coeficiente de variação

CVAreaT = Coeficiente de variação das áreas

CVAreaVor = Coeficiente de variação da área Voronoi

CVMaxAngle = Coeficiente de variação dos ângulos máximos

CVMinAngle = Coeficiente de variação dos ângulos mínimos

CVMSTVerti = Coeficiente de variação do comprimentos dos ramos

CVPerimT = Coeficiente de variação do perímetro

CVPerimVor = Coeficiente de variação do perímetro das áreas Voronoi

CVVorRound = Coeficiente de variação do valor de esfericidade das áreas Voronoi

Densmm2 = Densidade dos pontos marcados por milímetro quadrado = número de pontos marcados a cada mm².

DT = Delaunay Triangulation.

HPF = Campos de grande aumento

MCT= Mast cell tumor

MEAreat = Área média dos triângulos.

MEAreaVor = Média da área Voronoi

MEMaxAngle = Média dos ângulos máximos

MEMinAngle = Média dos ângulos mínimos

MEMSTVert = Média do comprimento dos ramos

MEPerimT = Média do perímetro

MEPerimVor = Média do perímetro da área Voronoi

MEVorRound = Média do valor de esfericidade da áreas Voronoi

MI = Índice Mitótico.

MV= Mosaico Voronoi

NMSTVertic = Número de ramos

OBS 1 – Observador 1

OBS 2 – Observador 2

OBS 3 – Observador 3

p = Probabilidade.

PV = polígonos Voronoi.

SAGM = Somatório dos ramos da árvore geradora mínima

SDAreaT = Desvio padrão da área dos triângulos

SDAreaVor = Desvio padrão da área Voronoi

SDMaxAngle = Desvio padrão do ângulo máximo

SDMinAngle = Desvio padrão do ângulo mínimo

SDMSTVert = Desvio padrão do comprimento dos ramos

SDPerimT = Desvio padrão do perímetro

SDPerimVor = Desvio padrão do perímetro das áreas Voronoi

SDVorRound = Desvio padrão do valor de esfericidade das áreas Voronoi

SRD = Sem raça definida.

SSA – Syntatic Structural Analysis

ST = Tempo de sobrevivência.

SumMST = Somatória de todos os ramos do MST

TD= Triângulo Delaunay/Triangulação Delaunay

TVTC = Tumor Venéreo Transmissível do Cão

VC = variation coefficient

VT= Voronoi tessellation.

K_{free} = Kappa Livre de Margens.

\leq - menor ou igual a

\geq - maior ou igual a

= - igual a

% - por cento

Resumo	ix
Abstract	xi
Lista de Ilustrações	xii
Lista de Abreviaturas	xiv
Lista de Notações	xvi
<i>1 – Introdução</i>	20
<i>2 – Revisão de Literatura</i>	23
2.1 – Mastocitoma Cutâneo Canino	23
2.1.1 – Graduação de MCCs	24
2.2 – Concordância entre Observadores	25
2.3 – Análise Sintática Estrutural (ASE)	28
<i>3 – Objetivos</i>	37
<i>4 - Material e Métodos</i>	38
4.1 – Comitê de Ética	38
4.2 – Critérios de Inclusão e Obtenção das Amostras	38
4.3 – Processamento das Amostras	39
4.4 – Fichas de Avaliação das Amostras	39
4.4.1 – Obtenção de Variáveis Numéricas a partir das Fichas de Avaliação	40
4.4.2 – Variáveis Avaliadas Histopatologicamente	40
4.5 – Leitura e Avaliação das Lâminas	42

4.6 – Aquisição e Identificação das Imagens	43
4.7 – Obtenção dos Dados Clínicos	44
4.8 – Processamento das Imagens	45
4.8.1 - Variáveis Gerais	45
4.8.2 - Variáveis Analisadas na Formação do Mosaico Voronoi	45
4.8.3 – Variáveis Analisadas na Formação da Triangulação Delaunay	46
4.8.4 – Variáveis Analisadas na Formação da Árvore Geradora Mínima	46
4.9 – Análise dos Dados Obtidos	47
4.9.1 – Análise de Concordância entre Observadores	47
4.9.2 – Análise Estatística das Variáveis de Patnaik <i>et al.</i> (1984) e Estabelecimento de Nova Metodologia de Graduação de MCC.	48
4.9.3 – Análise Estatística das Variáveis da ASE	48
 5 – Resultados	 50
5.1 – Concordância entre Observadores	52
5.2 – Análise de Sobrevida	55
 6 – Discussão	 74
6.1 – Amostras	74
6.2 – Dados Clínicos	74

6.3 – Concordância entre Observadores e Análise de Sobrevida_____	76
6.4 – Análise Sintática Estrutural _____	81
7 – <i>Conclusões</i> _____	86
8 – <i>Referências Bibliográficas</i> _____	87
9 – <i>Apêndices</i> _____	97
9.1 – Apêndice 1 – Formulário de avaliação de MCCs_____	98
9.2 – Apêndice 2 – Artigo publicado em revista periódica internacional com dados de mitose das amostras_____	101

Na maioria das espécies os processos neoplásicos envolvendo mastócitos são relativamente incomuns, no entanto, mastocitomas cutâneos (MC) ocorrem, frequentemente, em cães (Walder & Gross, 1992), representando de 7 a 21% das neoplasias cutâneas nesta espécie (Hendrick *et al.*, 1998; London & Séguin, 2003; Rogers, 1996; Scott, Miller & Griffin, 1996). A razão pela qual sua freqüência é tão grande nesta população representa ainda um mistério (London & Séguin, 2003).

Evidências suportam as causas hereditárias (Rogers, 1996); entretanto mutações no proto-oncogene c-Kit (a ligação SCF-Kit é necessária para a diferenciação, funcionalidade e sobrevivência dos mastócitos) tem sido relatada (London & Séguin, 2003).

Macy (1985), O'Keefe (1990), Scott *et al.*(1996), Walder e Gross (1992) apontaram os animais com idade média de 8 anos e de raças descendentes do Buldogue Inglês como pré-dispostas a desenvolver esta neoplasia, sendo que dentre elas destacam-se os cães da raça Boxer. Porém estes fatores, bem como sexo, localização e número de nódulos, não parecem estar relacionados com melhor ou pior prognóstico.

Os Mastocitomas Cutâneos Caninos (MCCs) podem ser facilmente diagnosticados mediante biópsia aspirativa por agulha fina (Lavalle *et al.*, 2003), porém a biópsia excisional se faz necessária para sua graduação e mesmo para que seja diferenciado de linfoma, plasmocitoma, histiocitoma, melanoma amelanogênico e tumor venéreo transmissível (TVT) do cão (London & Seguin, 2003).

Seu comportamento biológico varia de benigno a extremamente agressivo levando o animal rapidamente à morte por recorrência, metástases, afecções paraneoplásicas e mesmo devido à eutanásia a pedido de seus proprietários devido à perda da qualidade de vida de seus portadores (Frimberger *et al.*, 1997; London & Séguin, 2003; Powers & Fettman, 2001; Preziosi *et al.*, 2007; Rogers, 1996; Séguin *et al.*, 2001).

Em 1984, Patnaik, Ehler e MacEwen estabeleceram uma classificação em três graus baseada no aspecto histológico desta neoplasia. Tal graduação se correlacionava muito bem com seu comportamento biológico (London & Séguin, 2003; Patnaik, Ehler & MacEwen, 1984; Rech *et al.*, 2004; Sfiligoi *et al.*, 2005), e estabelecia que o grau I se referia àqueles MCCs bem diferenciados, o grau II àqueles moderadamente diferenciados e o grau III representava seu aspecto mal diferenciado e, portanto, mais agressivo (Gieger *et al.*, 2003; Patnaik, Ehler & MacEwen, 1984; Rogers, 1996; Simões & Schoning, 1994; Simões *et al.*, 1994; Walder & Gross, 1992).

A classificação proposta por Patnaik, Ehler & MacEwen (1984), tem utilidade inequívoca e é a mais amplamente aceita por patologistas veterinários, assim o processo de tomada de decisão clínica baseia-se nesta em todo o mundo (Frimberger *et al.*, 1997; Gieger *et al.*, 2003; London & Séguin, 2003; Rogers, 1996; Sfiligoi *et al.*, 2005; Simões & Schoning, 1994; Simões *et al.*, 1994; Walder & Gross, 1992).

Apesar de sua estreita correlação com prognóstico, vem sendo seguidamente relatada à insatisfação quanto à imprevisibilidade de muitos dos MCCs. De maneira geral, os questionamentos quanto à confiabilidade da graduação proposta inferem à subjetividade da maioria dos parâmetros utilizados à responsabilidade pelo fracasso em prever o comportamento de muitas destas neoplasias (Kravis *et al.*, 1996; Northrup *et al.*, 2005; Preziosi, Sarli & Paltrinieri, 2007; Rech *et al.*, 2004; Simões *et al.*, 1994; Susaneck, 2001). Susaneck em 2001 verificou que a maioria dos casos de MCC é classificada como grau II (intermediário), o qual é considerado extremamente imprevisível (Frimberger *et al.*, 1997; Rogers, 1996; Romansik *et al.*, 2007; Séguin *et al.*, 2001; Susaneck, 2001). Tais ponderações pontuam o questionamento quanto à reprodutibilidade do método.

Sabe-se que o diagnóstico histológico convencional conta com a interpretação visual, sofrendo com a subjetividade e a limitação da reprodutibilidade (Keenan *et al.*, 2000). Grande índices de variabilidade intra e

interobservadores na graduação tumoral têm sido descritos em toda medicina e métodos quantitativos têm sido utilizados para reduzi-los (Kravis *et al.*, 1996; Northrup *et al.*, 2005; Preziosi, Sarli & Paltrinieri, 2007; Rech *et al.*, 2004; Simões *et al.*, 1994; Sudbø, Marcelpoil & Reith, 2000; Susaneck, 2001; Sowter & Bertolino, 1995;)

Devido à sua objetividade, a análise de imagens tem-se revelado importante ferramenta na avaliação histopatológica (Waldemarin *et al.*, 2004) e, em medicina humana, a análise sintática estrutural (ASE), através de métodos matemáticos baseados na teoria dos grafos, é apontada como promissora ferramenta fornecendo variáveis reproduzíveis e objetivas (Bigras *et al.*, 1996; Brinkhuis *et al.*, 1996; Coleman *et al.*, 1994; Sowter & Bertolino, 1995; Sudbø *et al.*, 2000; Zaitoun *et al.*, 1998). A ASE tem sido utilizada como auxiliar no diagnóstico de malignidades (Palmer *et al.*, 2008); no prognóstico de neoplasias, doenças pulmonares crônicas, e diferentes processos patológicos (Bigras *et al.*, 1996; Guillaud *et al.*, 2005; Kayser *et al.*, 1999; Sudbø *et al.*, 2000; Weyn *et al.*, 2004).

Apesar de objetiva e promissora, poucos trabalhos utilizando-se da análise de imagens em medicina veterinária são encontrados na literatura e, objetivam relacionar seus aspectos à sobrevida dos animais (Maiolino *et al.*, 2005; Marconato *et al.*, 2008; Strefezzi *et al.*, 2003), à diferenciação de MCCs de outras neoplasias (Waldemarin *et al.*, 2004) ou prever a resposta de TVT ao tratamento quimioterápico (Scarpelli, 2008). Assim, encontramos nesta área campo fértil e pronto a se desenvolver, sendo necessários mais estudos para seu perfeito estabelecimento nas diversas aplicações possíveis e inexploradas em Medicina Veterinária.

2.1 – Mastocitoma Cutâneo Canino

Muito comum nos cães, os MCCs surgem na derme e subcutâneo (Rogers, 1996), e costumam afetar a cães de todos os sexos e raças, com predileção por Buldogues e seus descendentes, Retrievers do Labrador, Golden Retrievers, Daschunds e Terriers entre outras. Localizam-se, preferencialmente, no tronco e membros (Al-Sarraf *et al.*, 1996; Cahalane *et al.*, 2004; Gieger *et al.*, 2003; Grabarević *et al.*, 2000; Hahn *et al.*, 2004; Ishiguro *et al.*, 2003; London & Séguin, 2003; Macy, 1985; Michels *et al.*, 2002; Misdorp, 2004; Murphy *et al.*, 2004; Patnaik *et al.*, 1984; Rogers, 1996; Romansik *et al.*, 2007; Scott *et al.*, 1996; Séguin *et al.*, 2001; Séguin *et al.*, 2006; Sfiligoi *et al.*, 2005; Simpson *et al.*, 2004; Turrel *et al.*, 1988; Walder & Gross, 1992), porém apenas Gieger *et al.* (2003); Rogers (1996) e Turrel *et al.*, (1988) estabeleceram uma correlação significativa entre localização e sobrevida.

A idade de surgimento desta neoplasia varia desde animais tão jovens quanto 04 meses a cães de 18 anos, porém a idade média encontra-se ao redor dos 8 anos (Al-Sarraf *et al.*, 1996; Cahalane *et al.*, 2004; Grabarević *et al.*, 2000; Hahn *et al.*, 2004; Ishiguro *et al.*, 2003; London & Séguin, 2003; Macy, 1985; Michels *et al.*, 2002; Misdorp, 2004; Murphy *et al.*, 2004; Patnaik *et al.*, 1984; Romansik *et al.*, 2007; Scott *et al.*, 1996; Séguin *et al.*, 2001; Séguin *et al.*, 2006; Sfiligoi *et al.*, 2005; Simpson *et al.*, 2004; Walder & Gross, 1992). Apesar destes achados os autores não lograram êxito ao tentar estabelecer a relação entre idade, raça e sexo com sobrevida, entretanto, Gerritsen *et al.* (1998), verificaram em seus estudos que o sexo (menor sobrevida em machos) mostrava-se bastante significativo ($p=0,009$) na descrição de sobrevida dos animais estudados.

Macy (1985), O'Keefe (1990), Preziosi *et al.* (2007), Scott *et al.* (1996), Sfiligoi *et al.* (2005), observaram uma maior frequência de nódulos solitários, no entanto apenas Preziosi *et al.* (2007), observaram que a apresentação múltipla relacionava-se significativamente de forma negativa com a sobrevida.

2.1.1 – Graduação de MCCs

MCCs possuem ampla gama de comportamentos biológicos variando de benignos a extremamente agressivos (Frimberger *et al.*, 1997; London & Séguin, 2003; Preziosi *et al.*, 2007; Rogers, 1996; Séguin *et al.*, 2001). Em 1984, Patnaik *et al.*, estabeleceram uma classificação em três graus baseada no aspecto histológico desta neoplasia que se correlacionava muito bem com seu comportamento biológico (London & Séguin, 2003; Patnaik *et al.*, 1984; Rech *et al.*, 2004; Sfiligoi *et al.*, 2005). A classificação proposta estabelecia que o grau I se referia àqueles MCCs bem diferenciados (Figura 1), o grau II àqueles moderadamente diferenciados (Figura 2) e o grau III era o mais agressivo representando seu aspecto pouco diferenciado (Figura 3). (Gieger *et al.*, 2003; Patnaik, *et al.*, 1984; Rogers, 1996; Simões e Schoning, 1994; Simões *et al.*, 1994; Walder & Gross, 1992).

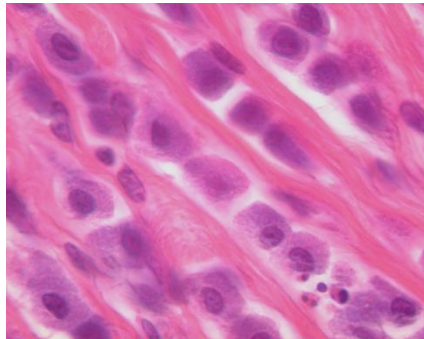


Figura 1 – Mastocitoma cutâneo canino classificado como grau I (HE, 100X)

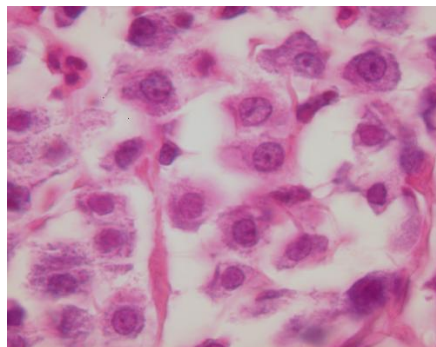


Figura 2 – Mastocitoma cutâneo canino classificado como grau II (HE, 100X)

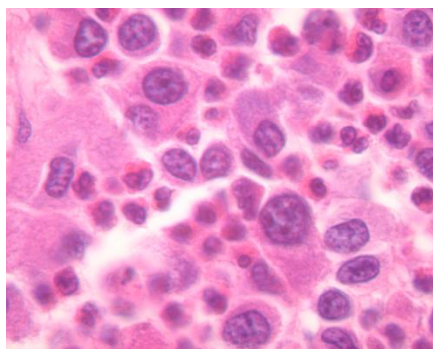


Figura 3 – Mastocitoma cutâneo canino classificado como grau III (HE, 100X)

Desta forma Patnaik e colaboradores descreveram em 1984 as alterações celulares, nucleares e teciduais encontradas em cada uma das formas citadas. Os critérios utilizados incluíam tamanho, forma e granulação celulares; presença de estroma, hialinização, necrose, edema e hemorragia; número de mitoses, formato do núcleo e número de nucléolos, entre outros.

Aparentemente a graduação Patnaik tem utilidade e relevância prognóstica e, é a mais amplamente aceita, para a tomada de decisão clínica baseia-se nela em todo o mundo (Frimberger *et al.*, 1997; Gieger *et al.*, 2003; London & Séguin, 2003; Rogers, 1996; Sfiligoi *et al.*, 2005; Simões e Schoning, 1994; Simões *et al.*, 1994; Walder & Gross, 1992).

Devido aos questionamentos quanto à relevância de alguns dos critérios propostos por Patnaik, Preziosi *et al.* (2007), promoveram análise multivariada dos critérios de Patnaik e de critérios clínicos, concluindo que o número de mitoses, invasividade e presença de múltiplas lesões ao diagnóstico, são indicadores de pior prognóstico, permitindo uma avaliação simplificada dos MCCs.

2.2 – Concordância Entre Observadores

Para que os diagnósticos possam ser confiáveis um fator de importância é a reprodutibilidade do mesmo diagnóstico por vários profissionais de níveis de conhecimento e experiência diferentes, o que indicaria que os parâmetros utilizados são objetivos e todos podem acessá-los da mesma forma. Parâmetros

aparentemente indiscutíveis, como por exemplo, a habilidade em interpretar cor, pode influir no diagnóstico porquanto nem todos observadores têm a mesma eficiência em defini-las (Seki *et al.*, 2005).

Sabe-se que o diagnóstico histológico convencional conta com a interpretação visual, sofrendo com a subjetividade e a limitação da reprodutibilidade (Keenan *et al.*, 2000). Grande índices de variabilidade intra e interobservadores na graduação tumoral têm sido descritos em toda medicina e métodos quantitativos têm sido utilizados para tentar reduzi-los (Kravis *et al.*, 1996; Northrup *et al.*, 2005; Preziosi *et al.*, 2007; Rech *et al.*, 2004; Simões *et al.*, 1994; Sudbø *et al.*, 2000; Susaneck, 2001; Sowter & Bertolino, 1995).

Quando a questão envolve graduação histológica o problema se torna mais grave devido ao fato do grau histológico ser critério para determinar o estadiamento da doença e sua terapia adjuvante (Hollensead *et al.*, 2004; Northrup *et al.*, 2005). No que tange especificamente ao diagnóstico e à graduação dos MCC o problema vem sendo consistentemente levantado. Strefezzi *et al.* (2003), apontaram em seus estudos uma variação entre observadores de 50%, quando da graduação dos MCC estudados por três anatomopatologistas experientes. Northrup *et al.* (2005), observaram menos de 7% de concordância na graduação de MCC examinados por 12 patologistas (sendo 10 de uma mesma instituição). Ambos os grupos de pesquisadores sugerem que estratégias devam ser montadas para se aumentar o consenso na graduação dos MCC. Estes autores indicam ainda que tal graduação só deva ser utilizada em conjunto com outros indicadores prognósticos conhecidos e só depois que se estabeleçam as recomendações aos pacientes.

Susaneck em 2001 afirmou que a maioria dos casos de MCCs vem sendo classificada como grau II (intermediário) os quais são justamente aqueles considerados extremamente imprevisíveis (Frimberger *et al.*, 1997; Rogers, 1996; Romansik *et al.*, 2007; Séguin *et al.*, 2001; Susaneck, 2001). É bem conhecido que, dentro de um sistema de classificação em três graus, há a tentação em

escolher o grau II porque, na pior das hipóteses, este grau provê a menor possibilidade de erro a partir da verdade (Bigras *et al.*, 1996).

De maneira geral, os questionamentos inferem à subjetividade da maioria dos parâmetros utilizados na graduação proposta por Patnaik, a responsabilidade pela causa do fracasso em prever o comportamento de muitos dos MCCs (Kravis *et al.*, 1996; Northrup *et al.*, 2005; Preziosi *et al.*, 2007; Rech *et al.*, 2004; Simões *et al.*, 1994; Susaneck, 2001). Além disto, Sakai *et al.* (2002), observaram que mesmo a contagem de mitoses pode sofrer variação, especialmente quanto aos campos selecionados para observação.

Segundo Northrup *et al.* (2005), definir um grau numérico à classificação dos MCCs pode dar aos clínicos a impressão de que este processo é completamente objetivo e absoluto mas este não é o caso. Apesar do sistema de graduação seguir critérios pré-determinados a classificação é muitas vezes subjetiva, pois conforme visto, diferentes patologistas podem determinar diferentes graus a um mesmo tumor (Kravis *et al.*, 1996; Northrup *et al.*, 2005; Preziosi *et al.*, 2007; Rech *et al.*, 2004). Assim, de modo a tratar aqueles que envolverão maior possibilidade de recorrência e metástase, faz-se necessária sua melhor identificação (Susaneck, 2001) bem como que os veterinários conheçam a variabilidade real deste sistema (Northrup *et al.*, 2005).

Pelo acima exposto, a avaliação do uso de um sistema de graduação para uma determinada lesão (com finalidade prognóstica) deve ser testada quanto a sua reprodutibilidade frente a diferentes observadores e mesmo frente a um mesmo observador utilizando métodos matemáticos (Glaessgen *et al.*, 2004). Com esta finalidade, o índice Kappa tem sido utilizado para estabelecer o nível de concordância por análise comparativa, entre diversos observadores e, o resultado obtido por seu cálculo tem sido interpretado pela Tabela abaixo:

Quadro 1 – Relação entre índice Kappa e grau de concordância (DAMRON *et al.*, 2003)

<i>Índice Kappa</i>	<i>Grau de concordância</i>
0,00 a 0,20	Baixíssimo
0,21 a 0,40	Baixo
0,41 a 0,60	Moderado
0,61 a 0,75	Alto
0,76 a 1,00	Muito alto

A utilização do índice Kappa na versão livre de margem (κ_{free}) tem sido recomendada quando os observadores não estão obrigados a incluir um determinado número de casos em cada categoria avaliada (Randolph, 2005). Este é frequentemente o caso dos estudos típicos sobre concordância. Nenhum trabalho aplicando o índice κ_{free} para testar a graduação proposta por Patnaik *et al.* (1984), rotineira na graduação de MCC, pode ser encontrado na literatura levando-nos a supor que o método, embora amplamente utilizado, ainda não teve sua reprodutibilidade assim comprovada.

As tentativas de se utilizar de ferramentas matemáticas aplicadas à microscopia objetivam oferecer maior confiabilidade ao processo diagnóstico diminuindo a possibilidade de erro (Metze & Adam, 2005). Guillaud *et al.* (1997), enfatizam a importância do desenvolvimento de novas técnicas, as quais permitam ao patologista realizar facilmente e com reprodutibilidade suas avaliações. Com os recentes avanços na tecnologia de imagem é agora possível obter informação quantitativa, numa base célula a célula, a partir de fragmentos de tecido formolizados incluídos em parafina.

2.3 – Análise Sintática Estrutural (ASE)

Em se abordando novas técnicas, Sowter & Bertolino (1995), esclarecem que a histometria é a análise e medida das alterações na estrutura de um tecido, a

qual objetiva prover informações que não podem ser obtidas por técnicas morfométricas gerais. Estes autores afirmam ainda que os patologistas poderiam proceder a histometria no momento do diagnóstico como um método adicional à avaliação subjetiva, especialmente nos casos limítrofes

Mensurações histológicas vêm sendo apontadas como promissora ferramenta prognóstica, fornecendo variáveis reproduzíveis e objetivas sendo referidas como “Análise Sintática Estrutural” (ASE). Através de métodos matemáticos baseados na teoria dos grafos, (Bigras *et al.*, 1996; Brinkhuis *et al.*, 1996; Coleman *et al.*, 1994; Sowter & Bertolino, 1995; Sudbø *et al.*, 2000; Zaitoun *et al.*, 1998), a histometria vem sendo utilizada como auxiliar no diagnóstico de malignidades (Palmer *et al.*, 2008), para prognosticar evolução de tumores, doenças pulmonares crônicas, e diferentes processos patológicos (Bigras *et al.*, 1996; Guillaud *et al.*, 2005; Sudbø *et al.*, 2000; Weyn *et al.*, 2004).

Os conceitos de ASE estão relacionados ao conceito de “Sociologia celular” a qual baseia suas análises em um modelo de arquitetura tissular relacionado à teoria dos grafos (Bigras *et al.*, 1996), definido em 1977 por Rosine Chandebois, mediante observações da influência das células em seu meio (Scarpelli, 2008).

Sabemos que a localização da célula em um tecido resulta de ajustes mecânicos contínuos subseqüentes à apoptose, renovação celular, vários fatores tróficos e de crescimento (Bigras *et al.*, 1996). Cada célula sabe a natureza exata de seu ambiente mediante um conjunto de proteínas de membrana (receptores de crescimento e diferenciação, caderinas e integrinas) presentes em sua superfície, e pode interagir com ele tanto quanto seu ambiente pode interagir com a célula. Assim, ela se comporta diferentemente dependendo de seu estado interno (e.g., concentração de proteína), de sua posição e de eventos casuais que acontecem na população (e.g., estresse físico) (Morel *et al.*, 2001). A partir de observações de ocorrência natural, matemáticos puderam abstrair inter-relações formais chamadas “vizinhos naturais” cujo conceito foi estabelecido há séculos. Em 1644 Descartes já se utilizava do conceito para ilustrar sua visão da matéria no espaço (Watson, 1999). A disposição dos chamados “vizinhos naturais” pode ser

representada matematicamente revelando a arquitetura tecidual em termos numéricos pelo Mosaico Voronoi (MV) e seus subgrafos, os quais derivam do conceito de vizinhança (Bigras *et al.*, 1996; Morel *et al.*, 2001; Watson, 1999).

Bigras *et al.* (1996), afirmaram que a avaliação quantitativa da arquitetura tissular aumenta a precisão e reprodutibilidade do processo de graduação na patologia cirúrgica. Neste mesmo ano, Brinkhuis *et al.* (1996), verificaram que variáveis morfométricas derivadas de um dos grafos utilizados para a ASE (no caso, a árvore geradora mínima) têm importante valor adicional na previsão do prognóstico para pacientes com câncer ovariano avançado. Estes autores enfatizaram que a grande vantagem do método é fornecer variáveis objetivas e reproduzíveis e, Camby *et al.* (1996), observaram que o comportamento coletivo celular pode ser caracterizado matematicamente mediante a utilização de grafos.

A ASE, portanto revelou-se eficaz na graduação (Bigras *et al.*, 1996; Brinkhuis *et al.*, 1996; Coleman *et al.*, 1994; Sowter & Bertolino, 1995; Sudbø *et al.*, 2000; Zaitoun *et al.*, 1998) e na diferenciação de neoplasias (Guillaud *et al.*, 1997), na diferenciação de linhagens de células tumorais *in vitro* (Camby *et al.*, 1996) destacou-se na avaliação da distribuição de neurônios e/ou qualquer outro tipo de célula em doença específicas (e.g., Doença de Alzheimer) (Duyckaerts e Godefroy, 2000; Numahara *et al.*, 2001; Palanza *et al.*, 2005); distinguiu tecido normal e neoplásico (Sudbø *et al.*, 2000), ou entre diferentes tipos de neoplasia (Weyn *et al.*, 1999), além de ter possibilitado a identificação de formas subclínicas de atrofia gástrica (Zaitoun *et al.*, 1998)

Para que se obtenham os grafos com vistas à análise sintática estrutural é necessária a digitalização de imagens do tecido a ser estudado. O valor intrínseco da análise da imagem digital reside no fato de que, ao contrário de outros métodos, ela permite a representação de seus achados em números. Números são fatos objetivos e são um pré-requisito para a avaliação e classificação de achados por métodos estatísticos (Oberholzer *et al.*, 1996)

Nas imagens adquiridas é realizada a marcação automática e/ou interativa dos pontos de interesse e os grafos automaticamente produzidos por um

programa específico, existente no computador acoplado ao sistema, construindo o Mosaico Voronoi (MV) e seus subgrafos, como por exemplo, a Triangulação Delaunay (TD) e a Árvore Geradora Mínima (AGM). Estes grafos são os mais utilizados em medicina com finalidade de diferenciar ou mesmo prognosticar neoplasias (Bigras *et al.*, 1996; Guillaud *et al.*, 1997; Morel *et al.*, 2001; Numahara *et al.*, 2001; Palanza *et al.*, 2005; Watson, 1999).

Morel *et al.* (2001), consideram o MV um grafo “tudo em um” por conter outros grafos (e.g., MST) e por ser o *Dual* da TD, sendo assim o mais indicado para quantificar desordem em uma população.

A construção do MV é tipicamente realizada pela aplicação de um algoritmo o qual se utiliza da sucessiva adição de pontos combinados com modificações apenas locais do diagrama (Guillaud *et al.*, 1997)(Figura 4). Podemos supor que a linha que separa dois vizinhos é exatamente metade do caminho entre cada par de vizinhos, a cada novo vizinho marcado é adicionada outra “linha de separação”, resultando em um polígono em 2 dimensões que representa a área de influencia daquele ponto inicial. Cada um destes polígonos formados após a marcação de todos os pontos pode ser chamado de polígono de Voronoi (PV) e de diagrama Voronoi ou Mosaico Voronoi (MV) a união de todos os polígonos contíguos (Bigras *et al.*, 1996; Guillaud *et al.*, 1997; Morel *et al.*, 2001; Numahara *et al.*, 2001; Palanza *et al.*, 2005; Watson, 1999).

O MV pode ajudar a determinar qual é o arranjo espacial mais plausível (Duyckaerts e Godefroy, 2000); assim um nódulo de células gera polígonos regulares, enquanto células em faixas geram polígonos alongados (Bigras *et al.*, 1996) (Figura 5).

Carreta *et al.*(2001), esclarecem que se a população de áreas poligonais em um MV tem um desvio padrão alto comparado com a sua média, as áreas livres ao redor das células são de tamanhos diferentes, assim sendo, as células não são regularmente distribuídas através do espaço naquele tecido. Duyckaerts e Godefroy (2000), além de concordarem com estas definições acrescentam a esta

informação a de que estruturas periódicas podem levar a um valor de cv alto embora exibindo de alguma forma regularidade (Figuras 6 e 7).

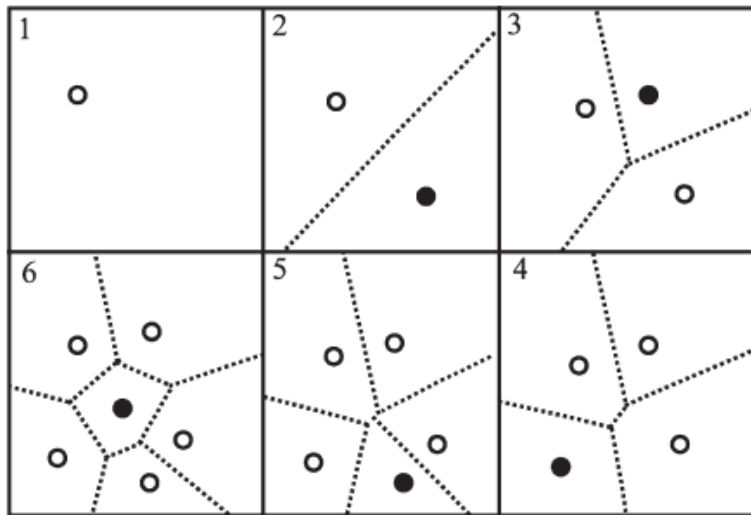


Figura 4 – Nas imagens de 1 a 6 revela-se a construção do Mosaico Voronoi a partir da sucessiva adição de pontos. Em cada uma das imagens o ponto sólido corresponde ao novo ponto adicionado. Novas bissetrizes são traçadas entre locais vizinhos existentes (círculos abertos) e as linhas existentes são redesenhadas de acordo com sua posição relativa. (Fonte: Guillaud *et al.*, 1997).

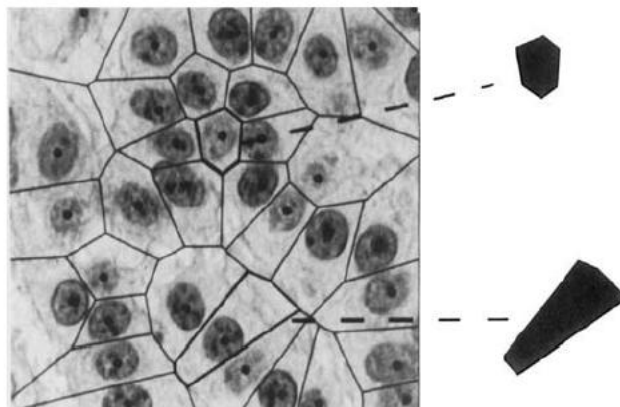


Figura 5 – Fotomicrografia de carcinóide pulmonar humano revelando como a arquitetura pode influenciar no formato dos polígonos Voronoi. (Fonte: Bigras *et al.*, 1996).

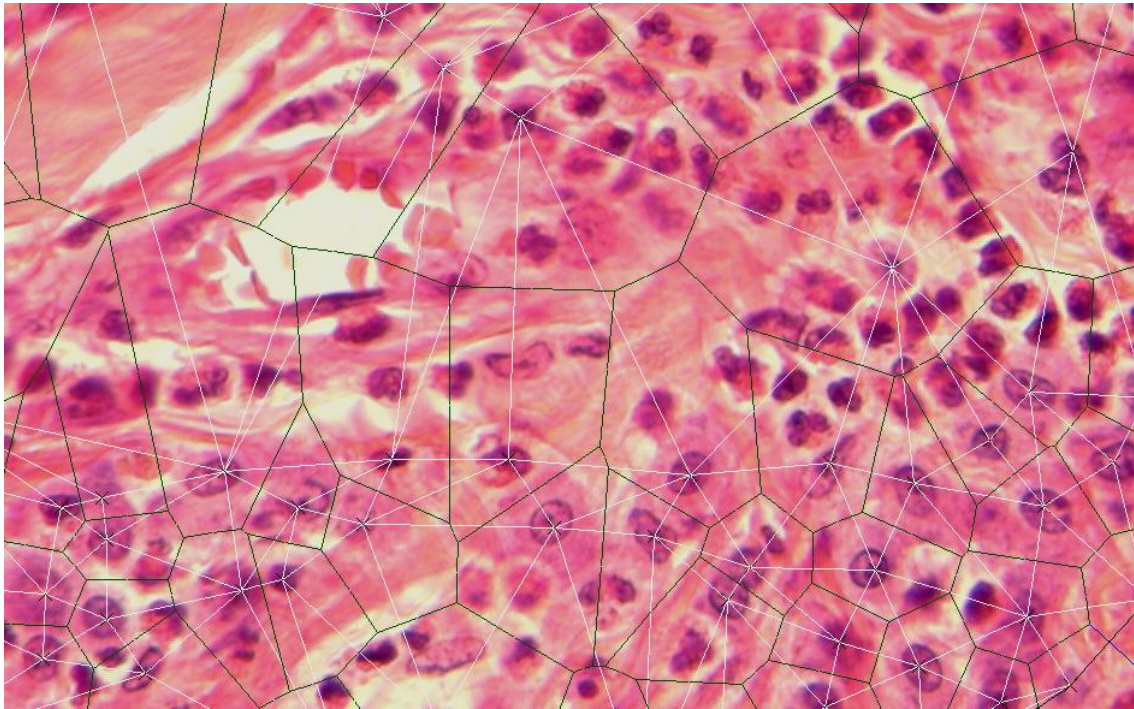


Figura 6 – Fotomicrografia de MCC com Mosaico Voronoi e Triangulação Delaunay correspondentes marcadas na imagem original. (HE, 40X)

Na TD cada ponto é conectado a dois vizinhos mais próximos de modo a formar um triângulo dentro do qual não pode haver nenhum ponto (Figura 8).

Já na AGM os pontos são conectados por retas de modo a formar com estas uma linha que conecte todos os pontos da janela e possua o menor comprimento possível, sem que haja sobreposição das linhas que os unem (Bigras *et al.*, 1996; Brinkhuis *et al.*, 1996; Morel *et al.*, 2001; Raby *et al.*, 2001; Sudbø *et al.*, 2000; Watson, 1999) (Figura 9).

Segundo Bigras *et al.* (1996), AGM é provavelmente o mais utilizado entre os grafos e discrimina com sucesso diferentes graus de processos patológicos. Palmer *et al.* (2008), observaram excelente reprodutibilidade ao verificarem sua eficiência em prognosticar carcinoma de ovário em humanos.

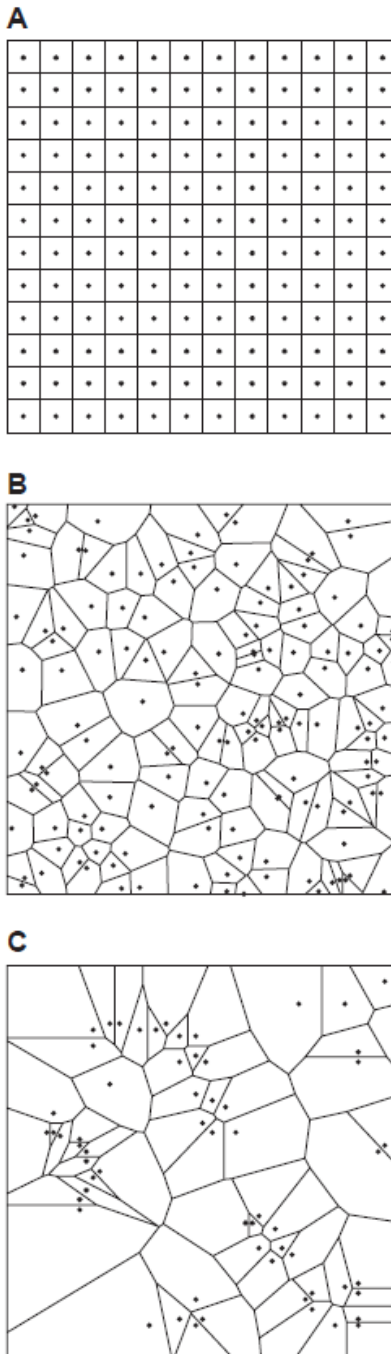


Figura 7 – A) Mosaico Voronoi de um grupo de pontos de distribuição regular. **B)** Apresentação da distribuição aleatória (Poisson). **C)** Exemplo de distribuição agrupada com coeficiente de variação alto. (Fonte: Karch *et al.*, 2005)

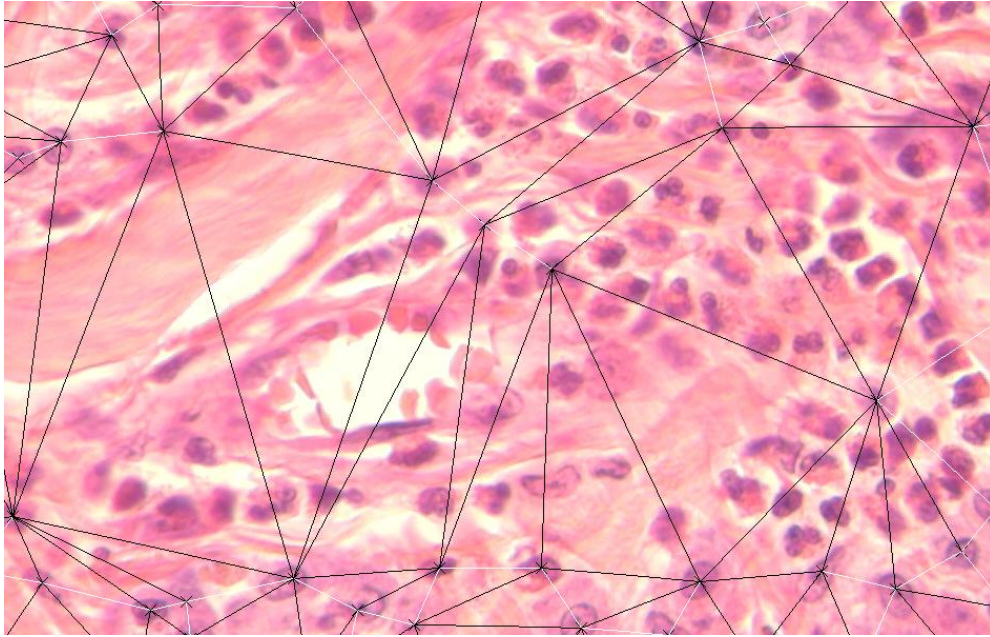


Figura 8 – Fotomicrografia de MCC com triangulação Delaunay correspondente marcadas na imagem original. (HE, X400)

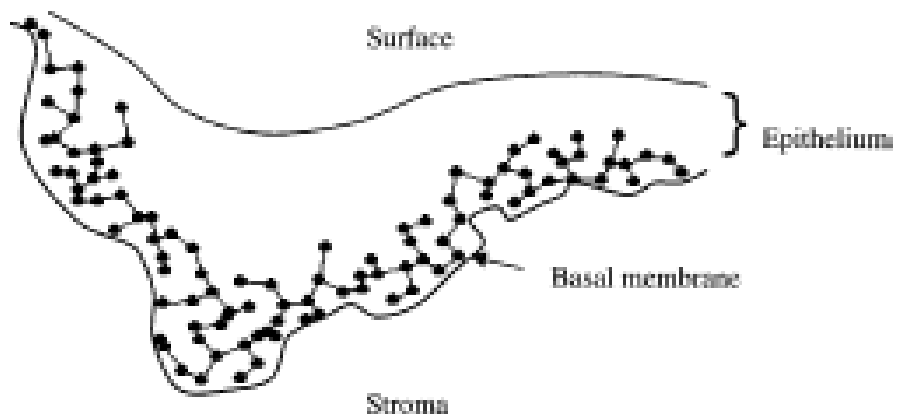


Figura 9 – Representação gráfica de Árvore Geradora Mínima para as camadas de células basais em mucosa oral normal. A AGM representa o menor caminho através de cada ponto marcado de modo a uni-los (Fonte: Sudbø *et al.*, 2000).

Os dados matemáticos obtidos devem ser corretamente interpretados à luz da matemática. Assim, por exemplo, o tamanho da área do PV revela matematicamente a distribuição dos pontos em uma área proporcionando uma visão objetiva da arquitetura tecidual. Da mesma forma a TD proporciona uma ampla visão da distribuição das células mediante a mensuração dos ângulos formados durante a triangulação (Bigras *et al.*, 1996; Brinkhuis *et al.*, 1996; Carreta *et al.*, 2001; Duyckaerts e Godefroy, 2000; Palanza *et al.*, 2005; Raby *et al.*, 2001; Scarpelli, 2008; Sowter & Bertolino, 1995).

Pelo acima exposto, podemos supor que a avaliação histomorfométrica, realizada através dos grafos MV, TD e AGM em amostras histológicas de MCCs, poderia ampliar a capacidade prognóstica da graduação proposta por Patnaik em 1984.

Devido à frequência extremamente alta dos MCCs, sua potencial malignidade, seu comportamento biológico imprevisível, às divergências nos resultados da classificação corrente, à necessidade de ferramentas prognósticas mais objetivas para auxiliar o clínico em sua missão de definir a conduta a ser tomada, este trabalho teve por objetivo:

1. Esclarecer a concordância entre observadores quanto ao grau e os parâmetros da classificação de Patnaik *et al.* (1984).
2. Avaliar a relação do grau e de parâmetros de Patnaik *et al.* (1984) com a sobrevida.
3. Propor uma graduação simplificada composta por variáveis reproduzíveis e de relevância diagnóstica.
4. Proceder a Análise Sintática Estrutural (ASE) desta neoplasia mediante o estudo de modelos matemáticos representados pelos grafos: Mosaico Voronoi (MV), Triangulação de Delaunay (TD) e Árvore Geradora Mínima (MST).
5. Avaliar resultados da ASE com vistas à sobrevida dos animais estudados.
6. Comparar os resultados da ASE com o grau segundo Patnaik, Ehler & MacEwen (1984) atribuído por cada um dos observadores e, com a graduação simplificada proposta a ser investigada neste trabalho.

4.1 – Comitê de Ética

Por se tratar de estudo retrospectivo, o qual não submeteu a nenhum dos animais ou a seus donos a qualquer possível sofrimento e/ou constrangimento, a Comissão de Ética de Pesquisa em Animais do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas acreditou ser desnecessário seu parecer conforme anexo 1.

4.2 – Critérios de Inclusão e Obtenção das Amostras

Os critérios de inclusão das amostras neste estudo foram:

- ✓ Ser da espécie canina
- ✓ Possuir diagnóstico prévio de MCC.
- ✓ Ser o primeiro diagnóstico de MCC.
- ✓ Possuir material incluído em parafina.
- ✓ Não haver conhecimento prévio da evolução posterior ao *primo* diagnóstico.
- ✓ Terem sido diagnosticados durante o período compreendido entre os anos 2000 e 2005.
- ✓ Terem o diagnóstico original de MCC confirmado pelos três patologistas veterinários envolvidos (100% de concordância).

As amostras de MCC foram obtidas sob a forma de blocos de parafina já rotineiramente preparados para fins de obtenção de cortes histológicos. Tal material foi fornecido por laboratórios diagnósticos particulares de Campinas e Espírito Santos do Pinhal, ambos os municípios localizados no estado de São Paulo, e que atendiam a uma vasta gama de clínicas veterinárias desta ampla região.

4.3 – Processamento das Amostras

Os blocos de parafina foram microtomizados entre quatro a cinco micrometros (4-5 μm). Os cortes assim obtidos foram fixados em lâminas de vidro padrão para histologia e desparafinados. Foram corados pela técnica de hematoxilina-eosina padronizada de modo a que todos os cortes permanecessem o mesmo tempo em contato com cada um dos reagentes e corantes (60 segundos em hematoxilina seguida de rápida passagem em hidróxido de amônia a 1% e coradas com eosina por 30 segundos). Após coloração as lâminas com os cortes foram montadas com resina sintética sob lamínulas de vidro.

As lâminas foram cortadas e coradas por um único técnico, no Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental do Laboratório de Anatomia Patológica Experimental da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, de modo a minimizar variações de padrão de coloração.

4.4 – Fichas de Avaliação das Amostras

Foram elaboradas fichas de avaliação (apêndice 1), baseadas nas observações de Patnaik *et al.* (1984) que deveriam ser preenchidas por cada um dos observadores referindo-se a cada uma das lâminas observadas à microscopia óptica comum.

A folha 1 contava com listagem detalhada de itens a serem observados nos graus I, II e III dos MCC com vistas à padronização, bem como possuía local para:

- Identificação do observador,
- Identificação da amostra,
- Grau de Patnaik conferido àquele caso ao final da observação,

Às folhas 2 e 3 constavam os nome de cada item a ser avaliado seguidos de barras de 10 cm de comprimento onde os observadores poderiam marcar o grau de intensidade que conferiam àquele quesito.

4.4.1 – Obtenção de Variáveis Numéricas a Partir das Fichas de Avaliação

Cada uma das barras avaliativas das folhas 2 e 3 da ficha de avaliação foram medidas em milímetros de seu início até o ponto marcado pelo observador. Estes números foram utilizados como referência àquele parâmetro de cada caso de forma integral (dados contínuos) variando, portanto de 0 a 100. Em seguida, para que se procedessem aos cálculos do índice Kappa, os dados contínuos foram categorizados conforme abaixo:

- 00 a 33 – Categoria 1
- 34 a 66 – Categoria 2
- 67 a 100 – Categoria 3

Elaborou-se tabela única contendo identificação da amostra, o grau conferido por cada observador de acordo com Patnaik *et al.* (1984), e o grau médio final. Constava ainda nome de cada variável avaliada, seus resultados contínuos e categorizados em 3 categorias para cada observador além do seu valor médio final categorizado.

4.4.2 – Variáveis Avaliadas Histopatologicamente

Celularidade – relativa a quantidade percebida de células no fragmento examinado. Classificada como pouca a muita celularidade,

Diferenciação – relativa ao grau de diferenciação dos mastócitos no fragmento examinado. Classificada como bem diferenciado a indiferenciado.

Pleomorfismo – relativo ao grau de pleomorfismo celular observado no fragmento examinado. Classificado como monomórfico a pleomórfico.

Infiltração – Relativo a presença de infiltração de tecidos no fragmento examinado. Classificada como presente na derme interfolicular a infiltrado na derme profunda e/ou tecido subcutâneo.

Tamanho celular – Relativo ao tamanho celular subjetivo no fragmento examinado. Classificadas como pequenas a grandes

Formato celular – Relativo ao formato celular no fragmento examinado. Classificado como arredondadas, ovais e irregulares com as nuances entre as três possibilidades.

Arranjo celular – Relativo à forma como as células neoplásicas se dispunham no fragmento examinado. Classificado como arranjado em cordões, ninhos ou maciços.

Estroma – Relativo à presença de estroma fibrocolagenoso no fragmento examinado. Classificado como ausente a abundante.

Hialinização – Relativo à presença de hialinização colagênica no fragmento examinado. Classificado como ausente a abundante.

Quantidade de citoplasma – relativo à quantidade de citoplasma nas células neoplásicas do fragmento examinado. Classificada como escasso a abundante.

Contorno nuclear – Relativo à definição do contorno celular das células neoplásicas do fragmento examinado. Classificado como indefinido, mal definido e bem definido com suas nuances.

Granulação – Relativo à visualização dos grânulos intracitoplasmáticos das células neoplásicas do fragmento examinado. Classificadas como pouco evidente, fina a óbvia com suas nuances.

Formato do núcleo – Relativo ao formato e aspecto do núcleo das células neoplásicas do fragmento examinado. Classificado como arredondado a vesicular.

Endentações – Relativo à presença de endentações nucleares nas células neoplásicas do fragmento examinado. Classificado como ausentes a endentados.

Cromatina – Relativa ao aspecto da cromatina dos núcleos das células neoplásicas do fragmento examinado. Classificada como condensada a frouxa.

Nucléolo – Relativa a presença de um ou mais nucléolos evidentes nas células neoplásicas do fragmento examinado. Classificado como nucléolos ausentes, evidentes ou com dois ou mais nucléolos evidentes.

Binucleação – Relativo à presença de células neoplásicas binucleadas no fragmento examinado. Classificadas como ausentes ou algumas ou várias.

Multinucleação – Relativo à presença de células neoplásicas multinucleadas no fragmento examinado. Classificadas como ausentes, algumas a várias.

Gigantócitos – Relativa à presença de células gigantes no fragmento examinado. Classificadas como ausentes ou de algumas ou de várias.

Mitoses – Relativa a presença de mitoses no fragmento examinado. Classificadas como ausentes ou de algumas a várias.

Edema – Relativo à presença de edema no local da neoplasia. Classificado como ausente a extenso.

Hemorragia – Relativo à presença de hemorragia na área neoplásica. Classificada como ausente a extensa.

Necrose – Relativo a presença de necrose na área neoplásica. Classificada como ausente, moderada a extensa com suas nuances.

4.5 – Leitura e Avaliação das Lâminas

As 92 amostras foram histologicamente avaliadas às cegas (quanto à origem e informações de dados clínicos dos animais), por três observadores independentes. Todos eram formados por diferentes Instituições Públicas de Ensino de Medicina Veterinária. Dois deles haviam passado por pós-graduações em nível de especialização em Instituições públicas na área de Patologia veterinária e patologia experimental respectivamente; os três haviam completado o mestrado, dois possuíam doutorado completo e um em andamento, todos em universidades públicas. Todos são docentes em diferentes Instituições Privadas de Ensino de medicina veterinária ministrando disciplinas afins à área de Anatomia Patológica Veterinária. Respectivamente os observadores 1, 2 e 3 possuíam 10, 18 e 23 anos de experiência diagnóstica.

Cada um deles recebeu o mesmo conjunto de lâminas para análise e 92 conjuntos de fichas de avaliação (apêndice 01) as quais deveriam ser preenchidas de acordo com suas observações ao microscópio de luz comum.

O índice mitótico foi estabelecido pela contagem de mitoses em 10 campos de grande aumento (HPF) aleatoriamente escolhidos mediante observação de um campo a cada dez campos sucessivamente focalizados até perfazer o total desejado.

Os observadores foram livres para utilizar-se de aumentos e campos microscópicos à sua vontade para fins de observação das alterações histológicas. Não foi feita restrição quanto ao tempo que cada um dos observadores permaneceria com o conjunto de lâminas.

A graduação final deveria seguir as instruções constantes nas fichas (apêndice 1) as quais se referiam àquelas propostas por Patnaik *et al.* (1984).

4.6 – Aquisição e Identificação das Imagens

Das 92 amostras obtidas, 81 tiveram o diagnóstico inicial de MCC confirmado pelos três patologistas e, de suas lâminas, obteve-se interativamente imagens digitais de alta resolução sob aumento de 400 X (objetiva de 40 X e ocular de 10 X) utilizando-se câmara digital de alta resolução (12 megapixels), intensidade de luz 5,5 e tempo de exposição de 200,5 ms no sistema Leica ®DC 500 e software IrfanView, Microsoft®. As imagens, sem compactação, em formato bitmap colorido de 24 bits (extensão BMP), com tamanho 1300 x 1030 pixels foram salvas em mídia do tipo compact disk (CD) e pendrive e distribuídas em dois outros computadores para fins de segurança de sua manutenção.

De cada lâmina obtida e, de cada caso foram adquiridas no mínimo 15 imagens compostas de campos microscópicos subseqüentes e que permitissem, no mínimo, a marcação final de ao menos 500 células por amostra. Desta forma procurou-se representar plenamente o tecido neoplásico.

Durante as aquisições anotavam-se dia, hora de início e fim dos trabalhos de aquisição bem como as intercorrências diárias.

As imagens foram identificadas pelo código de origem somado ao número que representava sua ordem de obtenção no dia. A primeira imagem de cada amostra era precedida desta numeração adicionada de 00. Todas as demais imagens do mesmo caso recebiam mais dois dígitos em seu final a partir do 00, conforme exemplificado abaixo:

lab 035 03 04 05

Neste caso, trata-se da amostra laboratório registrada sob o número 035 no ano de 2003, 4ª amostra adquirida no dia e é a 5ª imagem desta mesma amostra (a primeira seria de terminação 00).

4.7 – Obtenção dos Dados Clínicos

Após todos os observadores terem feito suas leituras das lâminas e entregue seus resultados, a partir das fichas de registro da entrada das amostras utilizadas em seu centro diagnóstico de origem, obteve-se o nome, telefone e endereço do médico veterinário o qual havia encaminhado o material para fins diagnósticos. Desta forma pode-se entrar em contato com estes profissionais e resgatar informações quanto à *causa mortis*, sobrevida, recorrência e tratamento realizado em alguns dos animais estudados. Em alguns casos fomos reencaminhados para os proprietários a fim de obter tais informações.

Informações confiáveis, ao menos quanto ao tempo de sobrevida e *causa mortis*, foram obtidas de 56 dos 92 casos estudados e analisados histopatologicamente.

Informações clínicas também puderam ser obtidas de algumas das fichas de origem, tais como: raça, porte, sexo, idade e o número de nódulos.

4.8 – Processamento das Imagens

Das imagens obtidas de 81 dos casos originais, foram analisados os 56 casos que possuíam dados de sobrevida, pelo programa "Sociology" (a ser registrado no Instituto Nacional de Propriedade Industrial, desenvolvido pelo Dr. Randall Luis Adam, pesquisador colaborador da UNICAMP).

O centro de cada um dos núcleos dos mastócitos neoplásicos constantes na imagem foi marcado interativamente e a partir do posicionamento destes pontos o programa foi capaz de:

1 – elaborar as imagens geométricas do Mosaico de Voronoi (MV), da Triangulação de Delaunay (TD) e da Árvore Geradora Mínima (MST) e,

2 – permitir a obtenção das variáveis abaixo descritas.

4.8.1 - Variáveis Gerais

1. **Densmm2** - Densidade dos pontos marcados por milímetro quadrado = número de pontos marcados a cada mm^2 .

4.8.2 - Variáveis Analisadas na Formação do Mosaico Voronoi

1. **MEPerimVor** – Média do perímetro da área Voronoi
2. **MEAreaVor** – Média da área Voronoi
3. **MEVorRound** – Média do valor de esfericidade da áreas Voronoi
4. **SDPerimVor** – Desvio padrão do perímetro das áreas Voronoi
5. **SDAreaVor** – Desvio padrão da área Voronoi
6. **SDVorRound** – Desvio padrão do valor de esfericidade das áreas Voronoi
7. **CVPerimVor** – Coeficiente de variação do perímetro das áreas Voronoi
8. **CVAreaVor** – Coeficiente de variação da área Voronoi

9. **CVVorRound** – Coeficiente de variação do valor de esfericidade das áreas Voronoi

4.8.3 – Variáveis Analisadas na Formação da Triangulação Delaunay

1. **MEAreat** – Área média dos triângulos.
2. **MEMaxAngle** – Média dos ângulos máximos
3. **MEMinAngle** – Média dos ângulos mínimos
4. **MEPerimT** – Média do perímetro
5. **SDAreaT** – Desvio padrão da área dos triângulos
6. **SDMaxAngle** – Desvio padrão do ângulo máximo
7. **SDMinAngle** – Desvio padrão do ângulo mínimo
8. **SDPerimT** – Desvio padrão do perímetro
9. **CVAreaT** – Coeficiente de variação das áreas
10. **CVMaxAngle** – Coeficiente de variação dos ângulos máximos
11. **CVMinAngle** – Coeficiente de variação dos ângulos mínimos
12. **CVPerimT** – Coeficiente de variação do perímetro

Obs.: Para todas as variáveis da triangulação Delaunay os Triângulos indesejáveis foram ignorados (Triângulos indesejáveis têm seu circuncentro fora da imagem).

4.8.4 – Variáveis Analisadas na Formação da Árvore Geradora Mínima

1. **SumMST** – Somatória de todos os ramos da AGM
2. **NMSTVertic** – Número de ramos
3. **MEMSTVert** – Média do comprimento dos ramos
4. **SDMSTVert** – Desvio padrão do comprimento dos ramos
5. **CVMSTVerti** – Coeficiente de variação do comprimento dos ramos

4.9 – Análise dos Dados Obtidos

4.9.1 – Análise de Concordância entre observadores

Índice Kappa

As variáveis obtidas mediante mensuração descrita no item 4.4, tiveram o índice kappa calculado segundo Randolph (2008) mediante programa *on line* disponível em <http://www.justusrandolph.net/kappa/> o qual possibilitava a obtenção do kappa para avaliações sem número de valores elegíveis pré-determinados (Free-marginal multirater Kappa - κ_{free}) conforme preconizado por Randolph (2005).

Os resultados foram comparados à tabela proposta por Cohen (1960) onde *Kappa 1* é a concordância total entre os observadores, *Kappa 0* é a concordância somente ao acaso e os valores intermediários podem ser interpretados conforme se segue:

- κ_{free} menor que 0,40 = fraco;
- κ_{free} de 0,40 a 0,59 é considerado razoável,
- κ_{free} de 0,60 a 0,74 é considerado bom e,
- κ_{free} acima de 0,75 é considerado muito bom.

Foram submetidos ao cálculo de κ_{free} os valores das variáveis constantes do item 3.4.1 para cada um dos observadores, após os valores serem distribuídos em 3 categorias.

4.9.2 – Análise Estatística das Variáveis de Patnaik *et al.* (1984) e estabelecimento de nova metodologia de graduação de MCCs.

a) Análise univariada

Cada uma das variáveis categorizadas foi avaliada quanto à sua relevância prognóstica em relação à sobrevida dos pacientes mediante Regressão de Cox, estratificada por tratamento, utilizando-se o programa SPSS 10.0 para Windows.

b) Análise Multivariada

Utilizou-se dos seguintes critérios para selecionar as variáveis que seriam incluídas na análise multivariada:

- Ser variável categorizada relevante quanto ao prognóstico ($p \leq 0,05$) à análise univariada;
- Ter concordância definida por $\kappa_{\text{free}} \geq 0,35$.

Os métodos utilizados foram a Regressão de Cox e Kaplan-Meier, utilizando-se os programas Winstat 10.0 e, SPSS 10.0 para Windows pelo método retroativo condicional (“Backward conditional”).

c) Estabelecimento de novos parâmetros para categorização de MCCs

As variáveis de concordância $\kappa_{\text{free}} \geq 0,35$ consideradas independentes à análise multivariada serão aquelas indicadas para comporem um novo método simplificado de prognóstico quanto à sobrevida. Caso a(s) variável(is) se revele(m) protetora(s) será(ão) computada(s) como negativa(s) e as agravantes como positivas. O novo escore será aquele oriundo do somatório das categorias de cada variável considerada válida pelos critérios especificados em **(b)**.

4.9.3 – Análise Estatística das Variáveis da ASE

As variáveis oriundas dos estudos quantitativos da análise estrutural das imagens serão avaliadas quanto ao impacto na sobrevida mediante Regressão Univariada de Cox. As variáveis com relevância prognóstica ($p \leq 0,05$) serão

submetidas à análise multivariada Retroativa condicional para que se revelem as variáveis independentes.

As variáveis independentes serão reavaliadas, juntamente com o escore proposto em análise multivariada pelo mesmo método ou com o grau médio conferido.

Dos 56 casos inicialmente considerados aptos aos estudos de sobrevida verificou-se que 38 (67,86%) eram fêmeas; 25 (56,82%) possuíam porte médio e idade média de 8,27 anos ($SD=\pm 3,6$ anos; amplitude de 1 a 16 anos). Do total de animais com raça identificada ($n=55$), cães sem raça definida (SRD) perfaziam um total de 23,21% ($n=13$). Dentre os cães de raça pura ($n=42$), os da raça Boxer representavam a grande maioria dos casos (45,24%). Do total de casos, 69,09% ($n=38$) possuíam apenas um nódulo neoplásico e 80,36% (45) receberam a cirurgia como tratamento único. Dos 11 (19,64%) animais que receberam terapia adjuvante ao tratamento cirúrgico, 100% receberam prednisolona e apenas 01 animal recebeu Sulfato de Vincristina juntamente com a prednisolona.

Os óbitos atribuídos à doença (complicações paraneoplásicas e/ou, disseminação de metástases e/ou, eutanásia a pedido dos proprietários devido à péssima qualidade de vida de seus animais de companhia) corresponderam a 31 (55,36%) dos animais (MCC). Os demais 41,07% animais ($n=25$) vieram a óbito por outras causas ou sobreviveram até o fim do período de seu acompanhamento clínico.

Dos 11 animais que receberam tratamento quimioterápico, nenhum deles foi classificado como grau III. Sete (07) não morreram devido ao MCC (eutanásia ou morte natural), dos quais três (03) apresentavam $MI=0$ e $ST=22,67$ meses (média esperada de 33,40 meses); um (01) apresentava $MI=1$ com $ST=21$ meses (média esperada de 21 meses); um (01) com $MI=3$ e $ST=21$ (média esperada de 20,20 meses); um (01) com $MI=5$ (média esperada de 9,5 meses) o qual foi censurado devido a seu óbito por outras causas dois (02) meses após o diagnóstico e, um (01) com $MI=10$ (FEL39804) com $ST=24$ meses (média esperada de 12,25).

Nenhuma das variáveis clínicas foi considerada significativa ($p\leq 0,05$) com vista à sobrevida dos animais.

Os diversos aspectos clínicos dos animais estudados e respectivas frequências válidas podem ser observadas na Tabela 1. Enquanto a Tabela 2 apresenta o número de nódulos tumorais observados nos animais e comparativamente naqueles cães de raça Boxer e de outras raças.

Tabela 1 – Dados clínicos dos casos avaliados.

Dados clínicos	Característica	Frequência	Válidos (%)
Porte	Pequeno	10	22,73
	Médio	25	56,82
	Grande	04	9,10
	Gigante	05	11,36
Raça	Boxer	19	33,93
	SRD	13	23,21
	Terrier Brasileiro	05	8,93
	Fila Brasileiro	03	5,36
	Daschund	03	5,36
	Labrador	02	2,99
	Yorkshire	02	2,99
	Sharpei, Dogue Alemão, Pastor Alemão, Golden Retriever, Cane Corso, Doberman, Schnauzer, Bernese Mountain Dog,	01 cada	1,79
	Sexo	Machos	18
Fêmeas		38	67,86
Tratamento	Cirúrgico somente	45	80,36
	Cirurgia e quimioterapia	11	19,64
Região afetada	Membro	11	34,38
	Caudal (quadril, cauda, genitália, região inguinal)	8	25,00
	Tórax	7	21,88
	Cervical e cabeça	6	18,75
Status da doença	Óbito pela doença	31	55,36
	Sobrevivente ou morto outras causas	25	44,64

A Tabela 3 apresenta a idade média dos pacientes ao primeiro diagnóstico evidenciando o fato de a idade dos cães da raça Boxer ser em média dois anos menor do que as demais raças estudadas.

Tabela 2 – Presença de nódulos cutâneos.

Nº de nódulos	Animais estudados		Boxers		Outras Raças	
	Total	Óbitos	Total	Óbitos	Total	Óbitos
1 (n-%)	38 – 69,1%	17 – 44,74%	12 – 60%	06 – 50%	26 – 74,29%	11 – 42,31%
2 (n-%)	10 – 18,2%	04 – 40,00%	04 – 20%	01 – 25%	06 – 17,14%	03 – 50%
3 (n-%)	04 – 7,5%	00 – 00,00	03 – 15%	00 – 00,00	01 – 2,86%	00 – 00,00
4 (n-%)	03 – 5,5%	02 – 66,67%	01 – 5%	01 – 100%	02 – 5,71%	01 – 50%

Tabela 3 – Comparação da idade dos animais de acordo com a raça.

		Animais estudados	Boxers	Outras Raças
Idade	Média	≈ 8 anos	≈ 6	≈ 9
	SD	± 3,59 anos	± 2,6	± 3,68
	Mínima	1 ano	2 anos	1 ano
	Máxima	16 anos	12 anos	16 anos
	Amplitude	15 anos	10 anos	15
	< 8 anos	19 (33,93%)	9 (47,37%)	10 (52,63%)

5.1 – CONCORDÂNCIA ENTRE OBSERVADORES

Em vinte e oito (28 – 34,57%) dos casos estudados (n=81), a concordância entre os patologistas foi total, com todos conferindo o mesmo grau aos mesmos casos. Destes, a dois (2 – 7,14%) foi conferido o grau I, a dezenove (19 – 67,86%) o grau II e, a sete (7 – 25%) o grau III, conforme Tabela 4. Verificou-se que havia discordância total entre os observadores, conferindo um grau diferente para o mesmo caso em três (3 – 3,70%) do total de casos estudados. Assim sendo, é

importante ressaltar que o índice Kappa ($\kappa_{\text{free}} = 0,28$) da concordância quanto ao grau atribuído foi considerado baixo.

O número de casos classificados em cada um dos três graus do sistema de Patnaik, bem como a sobrevida média atribuída a cada um dos graus por observador isolado é apresentado nas Tabelas 4 e 5.

Tabela 4 – Número de MCCs classificados como I, II e III, por cada um dos três observadores.

Grau Patnaik	G I	G II	G III
Observador			
1	7	57	17
2	9	54	18
3	33	31	16

Tabela 5 – Sobrevida média (em meses) observada em cada um dos graus de Patnaik atribuídos por cada observador e para o grau médio (média simples).

Observador	G I	G II	G III
1	30,33	22,63	13,43
2	28,75	22,87	11,88
3	29,87	19,19	10,27
Grau de consenso	31,25	22,87	8,95

Os resultados dos cálculos do índice κ_{free} para as variáveis de Patnaik categorizadas em três categorias estão disponíveis na Tabela 6.

Os resultados apontam que foram consideradas de muito boa concordância apenas as variáveis: presença de multinucleação ($\kappa_{\text{free}} = 0,83$) e presença de gigantócitos ($\kappa_{\text{free}} = 0,814$). Foram consideradas com boa concordância ($0,75 > \kappa_{\text{free}} \geq 0,60$) binucleação ($\kappa_{\text{free}} = 0,62$), mitose ($\kappa_{\text{free}} = 0,65$), necrose ($\kappa_{\text{free}} = 0,66$) e

hemorragia ($k=0,62$). Foi considerada razoável a concordância para: celularidade ($\kappa_{free} = 0,47$), arranjo celular ($\kappa_{free} = 0,43$), presença de endentações nucleares e presença de um ou mais nucléolos evidentes ($\kappa_{free} = 0,42$). Para variáveis limítrofes do fraco ($\kappa_{free} \geq 0,35$) encontram-se granulação citoplasmática ($\kappa_{free} = 0,35$) e edema ($\kappa_{free} = 0,36$). Todas as demais variáveis foram consideradas de concordância fraca a “ao acaso” ($\kappa_{free} < 0,35$). A Tabela 6 ilustra os valores de κ_{free} para todas as variáveis derivadas da graduação proposta por Patnaik divididas em 3 categorias.

Tabela 6 – Valores de κ_{free} para dados categorizados.

Variável	κ_{free} 3 categ
Presença de Estroma	0
Presença de hialinização	0,061728
Tamanho celular	0,080247
Pleomorfismo celular	0,098765
Formato do núcleo	0,141975
Aspecto da Cromatina	0,154320
Formato celular	0,160494
Contorno do celular	0,209875
Grau de Patnaik	0,277777
Infiltração de tecidos	0,296295
Quantidade de Citoplasma	0,296295
Diferenciação celular	0,302469
Granulação citoplasmática	0,351850
Presença de Edema	0,364197
Presença de 1 ou + nucléolos evidentes	0,413580
Arranjo celular	0,425925
Celularidade	0,46789
Presença de endentações nucleares	0,580246
Presença de binucleação	0,617283
Presença de Hemorragia	0,623455
Presença de Mitoses	0,654319
Presença de Necrose	0,660492
Presença de Gigantócitos	0,814813
Presença de multinucleação	0,833332

5.2 – ANÁLISE DE SOBREVIDA

A análise univariada (regressão de Cox) da sobrevida dos animais em relação às variáveis de Patnaik *et al.* (1984) revelou como relevantes ($p \leq 0,05$) as variáveis apresentadas na Tabela 7.

Tabela 7 – Variáveis de Patnaik categorizadas consideradas relevantes quanto à sobrevida e respectivos κ_{free} .

Variáveis	B	Sig.	κ_{free}
Celularidade	0,028	0,006	0,468
Quantidade de citoplasma	-0,022	0,019	0,296
Contorno celular	-0,029	0,004	0,210
Arranjo celular	0,016	0,031	0,426
Diferenciação celular	0,024	0,026	0,302
Pleomorfismo	0,026	0,024	0,099
Presença de infiltração dos tecidos adjacentes	0,024	0,043	0,296
Evidência da granulação citoplasmática	-0,025	0,007	0,352
Formato do núcleo	0,034	0,006	0,142
Aspecto da Cromatina	0,032	0,001	0,154
Presença de um ou mais nucléolos	0,039	0,001	0,414
Presença de Binucleação	0,018	0,028	0,617
Presença de gigantócitos	0,019	0,017	0,815
Mitose	0,031	0,000	0,654

Das variáveis apresentadas na Tabela 7, as que se apresentam dentro dos critérios de inclusão para análise multivariada foram: celularidade, arranjo celular, evidência da granulação intracitoplasmática, presença de um ou mais nucléolos, presença de binucleação, de gigantócitos e de mitoses. A análise multivariada revelou serem independentes as variáveis mitose ($B=0,749$ $p=0,042$) e evidencição da granulação citoplasmática ($B= - 1,011$ e $p= 0,012$), possuindo esta última caráter protetor.

Considerando-se que:

(a) Na avaliação das mitoses 1 é a ausência de mitoses, 2 é a presença de algumas mitoses na amostra e, 3 é a presença de várias mitoses na amostra).

(b) Na avaliação da granularidade -3 é presença de granulação evidente (Figura 10), -2 é a presença de granulação de aspecto variado e/ou, fina

granulação (Figura 11) e, -1 é a ausência de granulação ou granulação pouco óbvia (Figura-12);

Podemos inferir que o somatório do grau de 1 a 3 da categoria mitose, com o grau de -1 a -3 da categoria granulação, resultou em um escore passível de variação entre dois negativo (-2) e dois positivo (+2). O escore foi significativamente correlacionado com a sobrevida à análise univariada de Cox. O extremo negativo indicando excelente sobrevida, o extremo positivo o pior prognóstico e, os intermediários - 1 a +1 o grau intermediário. Estes resultados estão apresentados na Tabela 8.

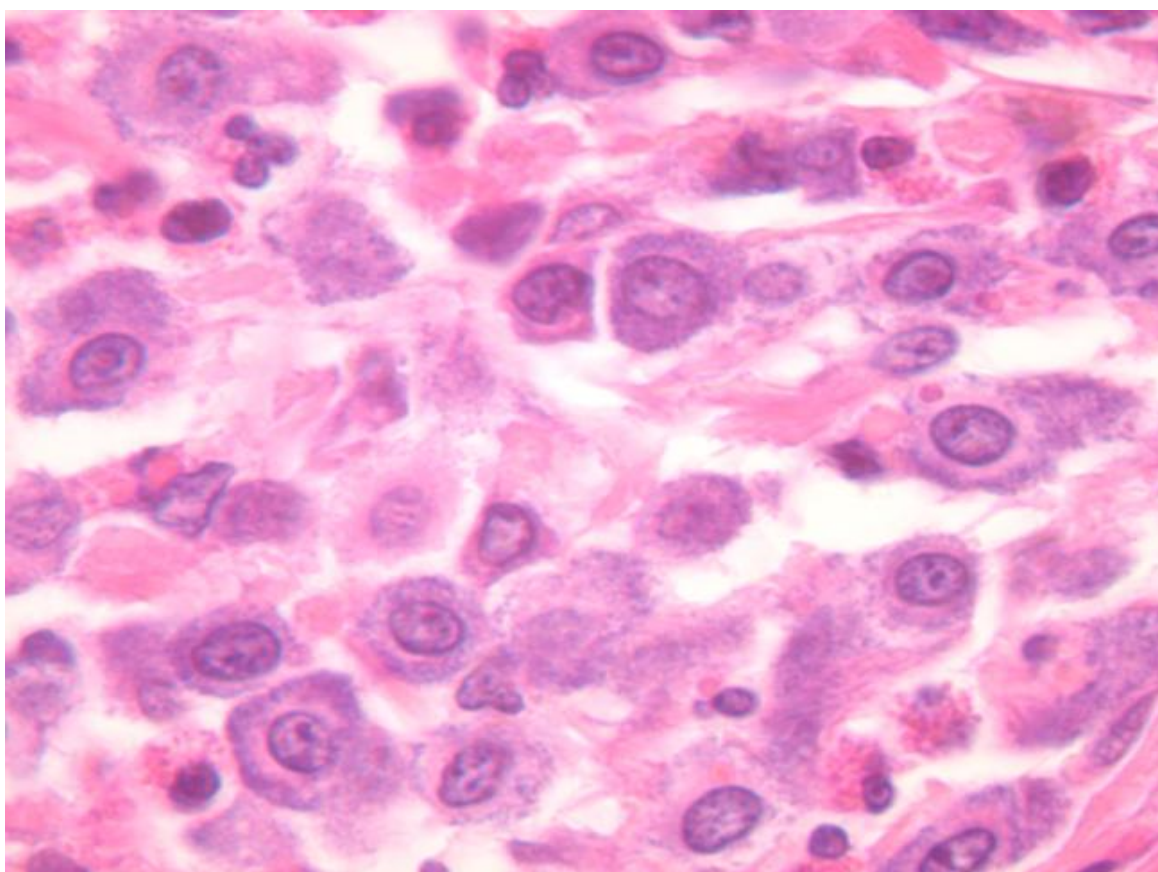


Figura 10 - Granulação citoplasmática evidente, em mastócitos neoplásicos, classificada como grau - 3 em fotomicrografia digital de amostra do animal 44 acompanhado por 40 meses até sua morte não relacionada à presença de MCC. HE, Objetiva 100X, ocular 10X. Dimensão: 650X514 pixels.

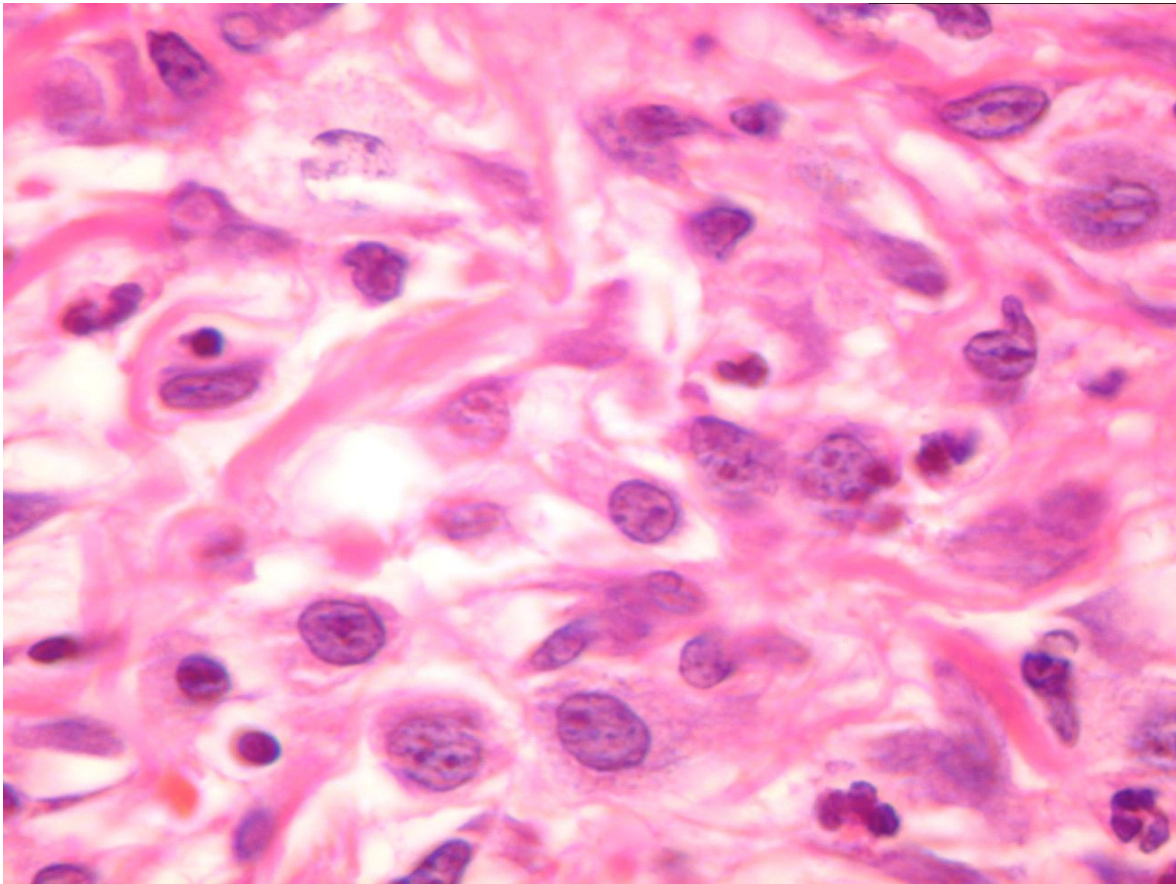


Figura 11 - Granulação citoplasmática fina, em mastócitos neoplásicos, classificada como grau - 2 em fotomicrografia digital de amostra do animal 64 acompanhado por 15 meses até sua morte relacionada à presença de MCC. HE, Objetiva 100X, ocular 10X. Dimensão: 650X514 pixels.

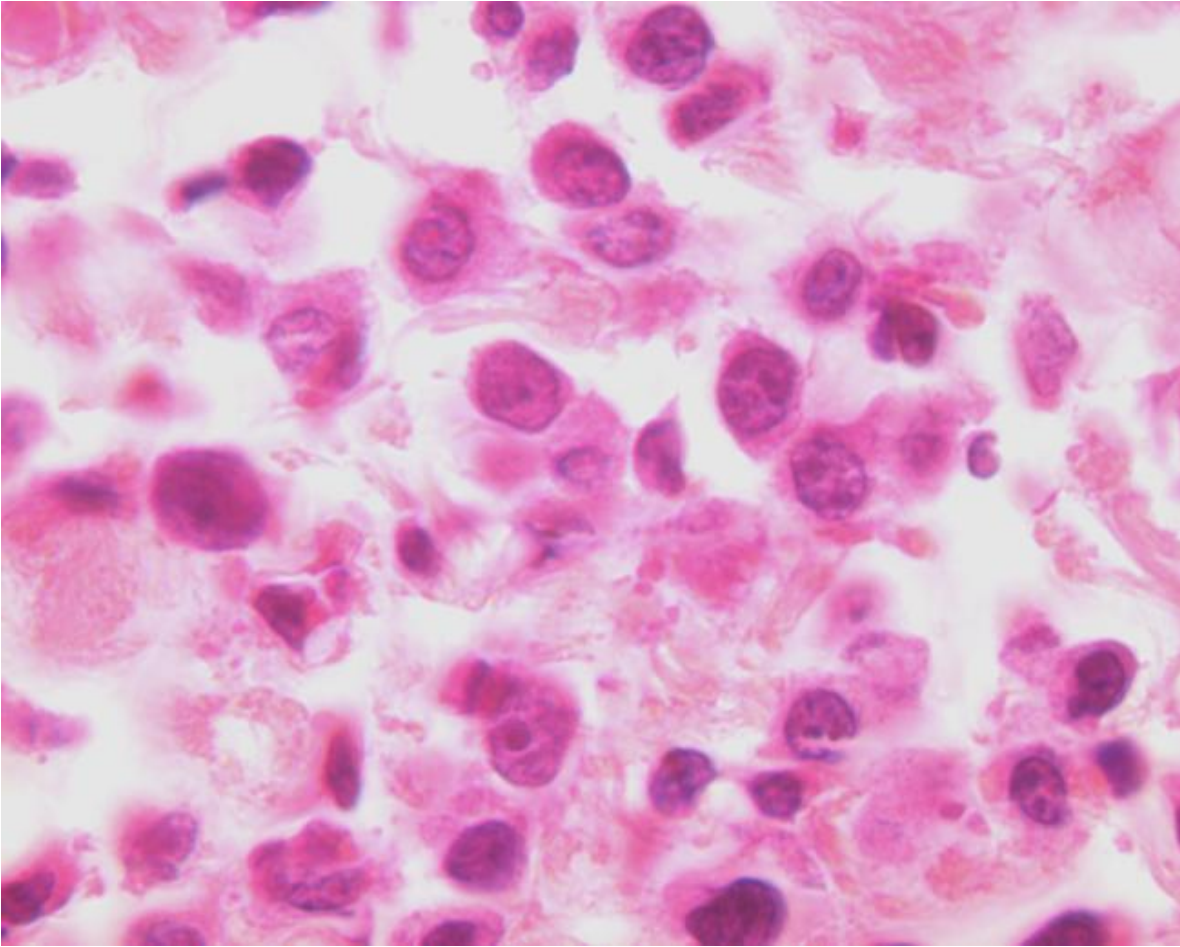


Figura 12 - Ausência de granulação citoplasmática, em mastócitos neoplásicos, classificada como grau - 1 em fotomicrografia digital de amostra do animal 33 acompanhado por 0,5 mês até sua morte relacionada à presença de MCC. HE, Objetiva 100X, ocular 10X. Dimensão: 650X514 pixels.

Tabela 8 – Resultados da análise univariada de sobrevida do escore proposto.

Observador	B para escore	Significância (p) do escore	B do grau	Significância (p) do grau
Obs 1	0,654	0,002	0,865	0,032
Obs 2	0,556	0,002	0,862	0,030
Obs 3	0,531	0,004	0,952	0,001
Consenso	0,872	0,000	1,210	0,001

À análise multivariada do escore sugerido e grau de Patnaik verificou-se que são variáveis independentes: grau de consenso, grau do observador 1, grau do observador 2 e escore proposto (B=0,872; 0,654; 0,556 e p=0,000; 0,002; 0,002 respectivamente). Apenas para o grau conferido pelo observador 3 a variável independente revelou-se como o próprio grau de Patnaik.

As curvas de sobrevida (Kaplan-Meier) do grau individual e de consenso e, do escore individual e de consenso evidenciam bem a melhora do perfil individual e geral da estimativa prognóstica resultante conforme pode ser observado nos gráficos 1 a 8.

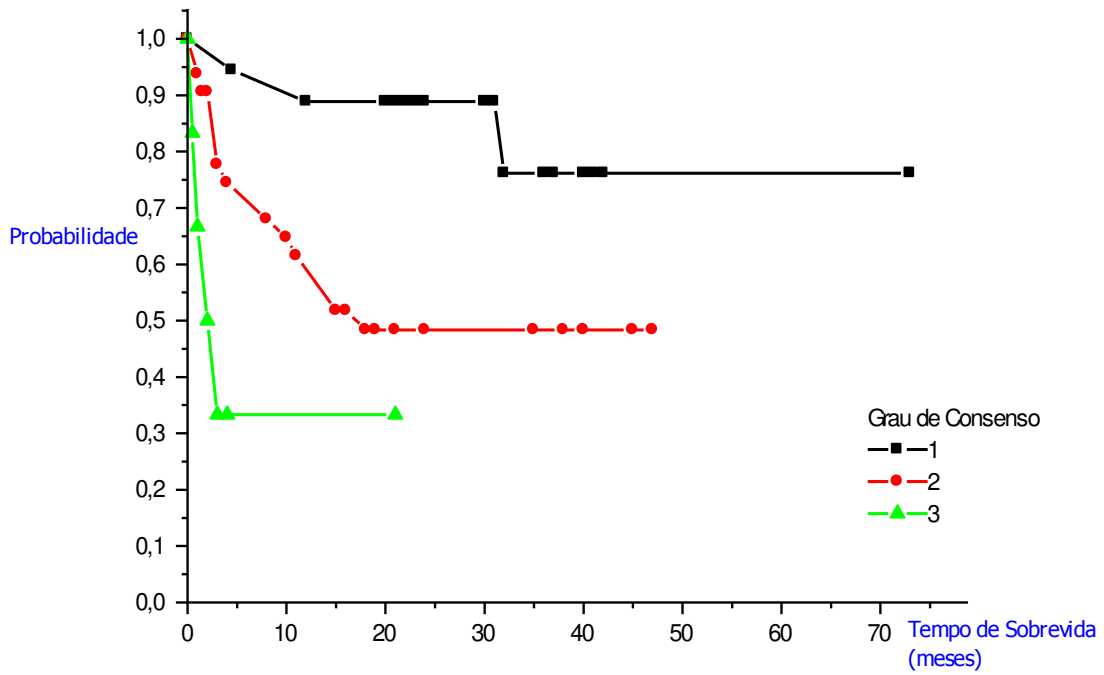


Gráfico 1 - Curva de sobrevivência do grau de consenso.

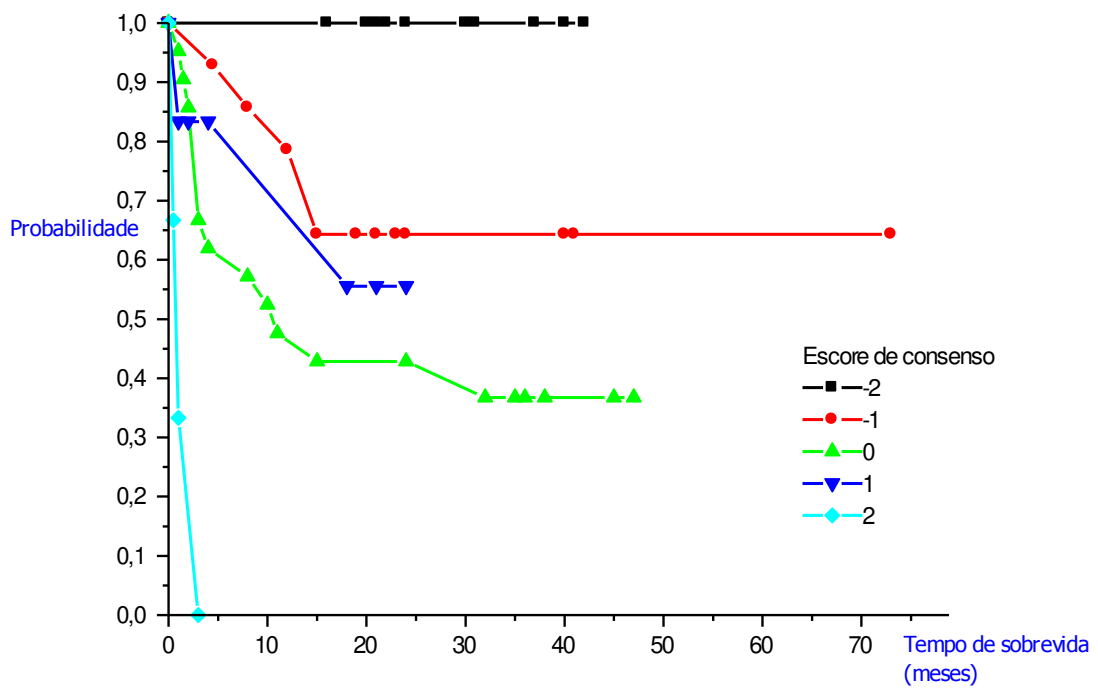


Gráfico 2 - Curva de sobrevivência do escore de consenso

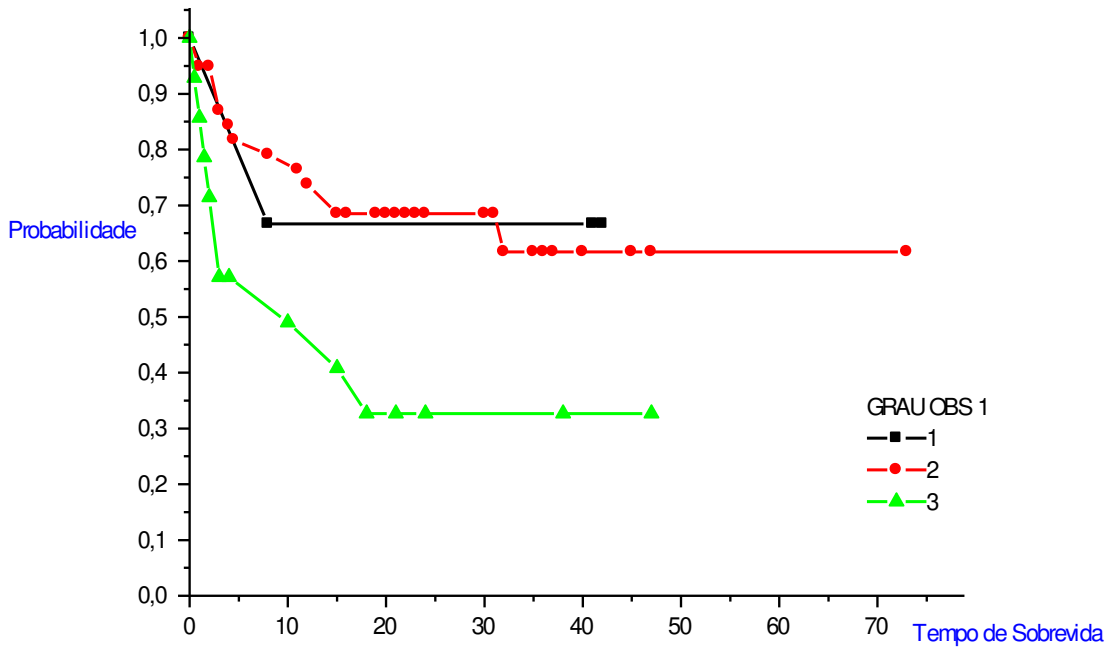


Gráfico 3 - Curva de sobrevivência do grau conferido pelo observador 1.

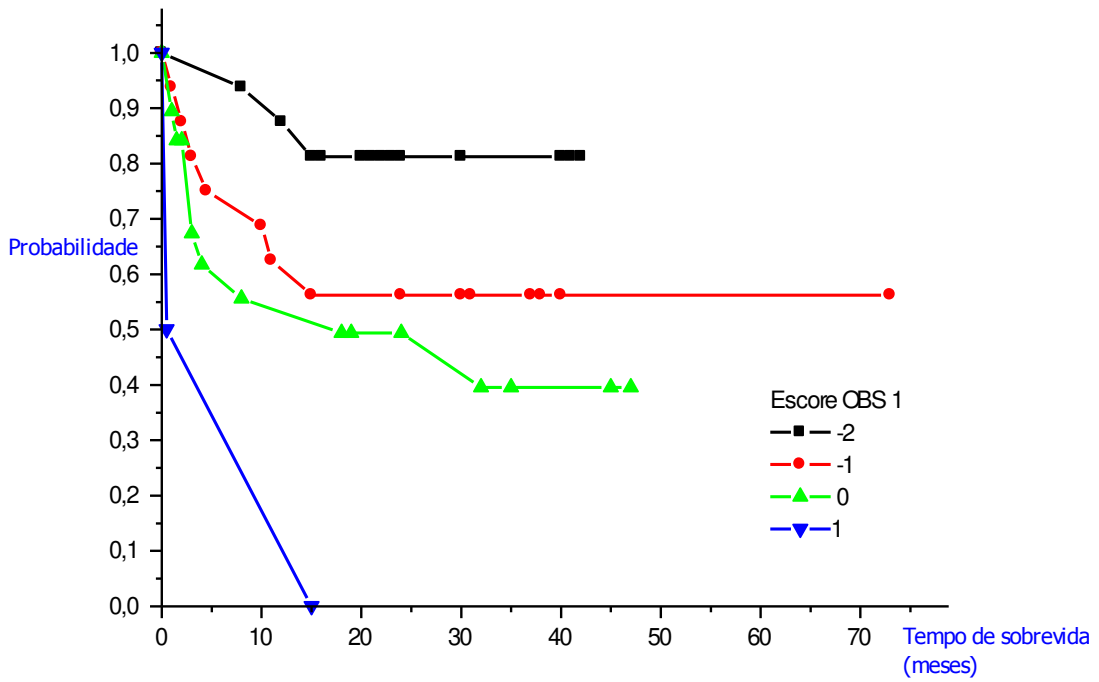


Gráfico 4 - Curva de sobrevivência do escore do observador 1.

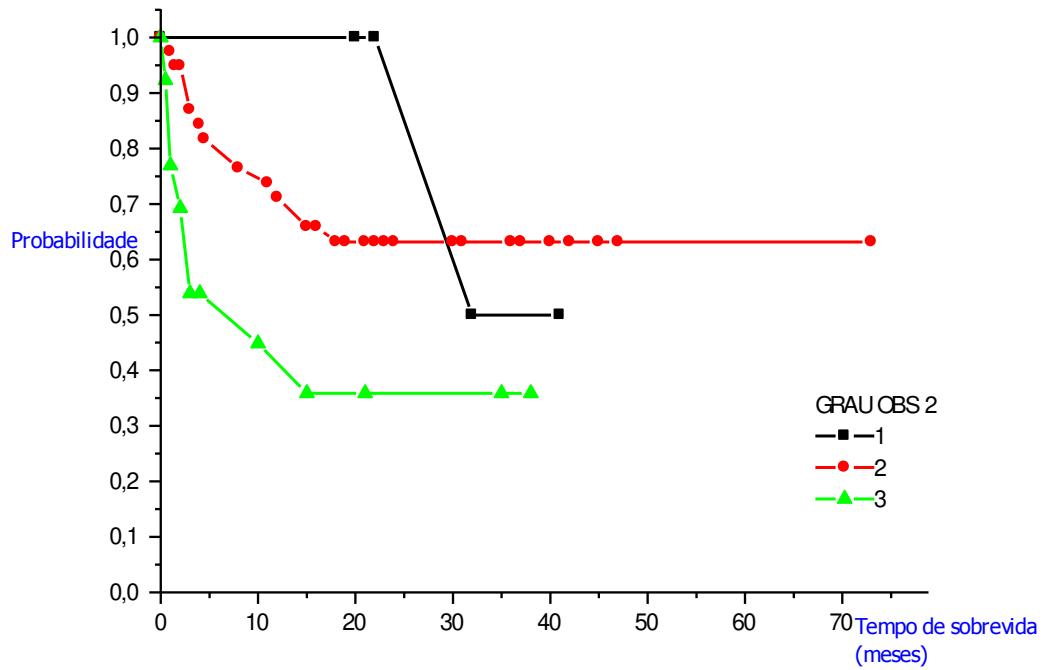


Gráfico 5 - Curva de sobrevivência do grau conferido pelo observador 2.

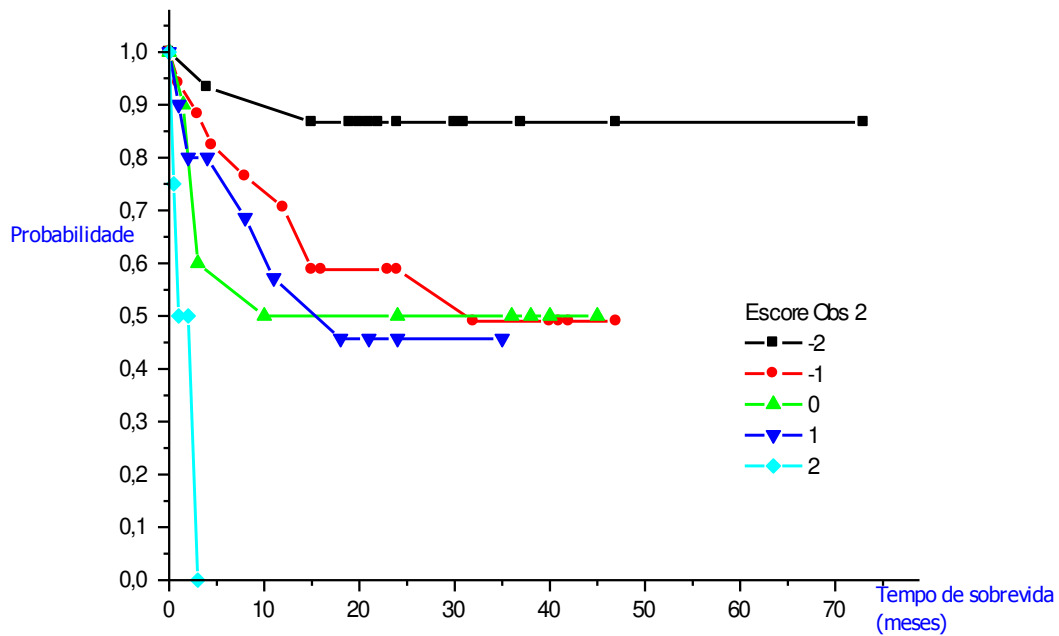


Gráfico 6 - Curva de sobrevivência do escore do observador 2.

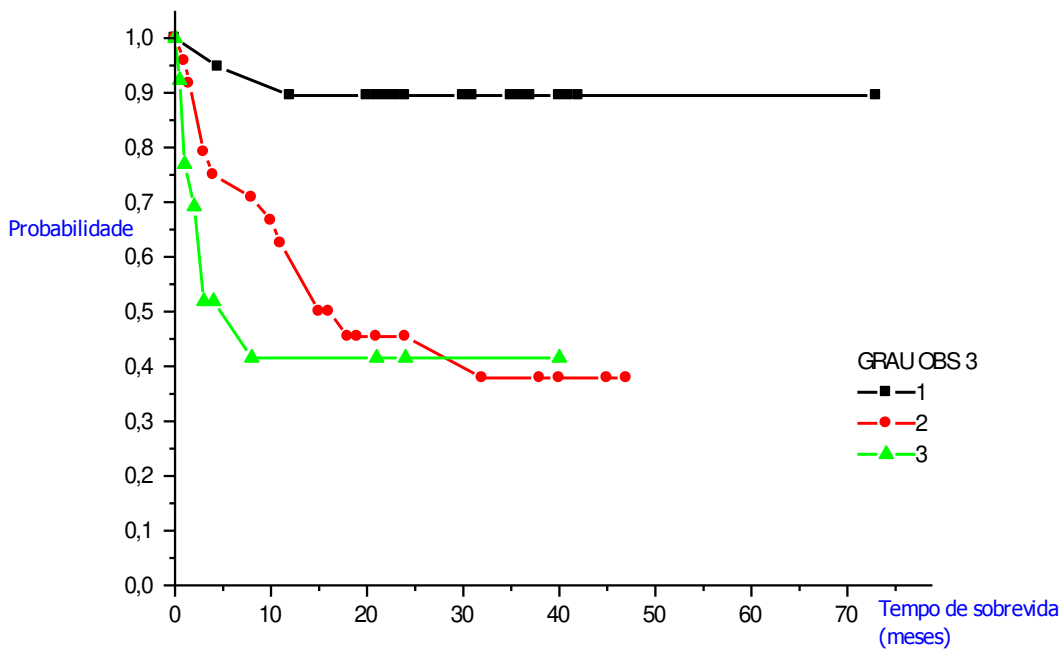


Gráfico 7 - Curva de sobrevivência do grau conferido pelo observador 3.

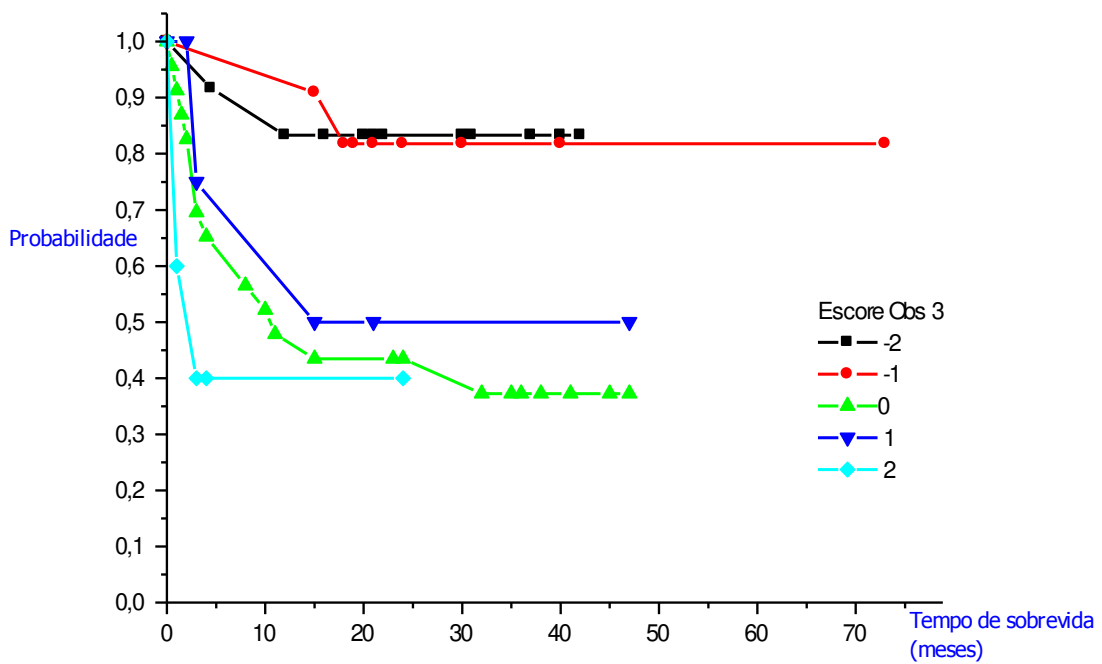


Gráfico 8 - Curva de sobrevivência do escore do observador 3.

A análise univariada das variáveis resultantes da análise da estrutura sintática dos MCCs revelou que os coeficientes de variação da esfericidade, da área e do perímetro dos PV do MV e, dos ângulos máximos dos TD, eram relevantes para o prognóstico (Tabela 9).

Tabela 9 – Variáveis de ASE consideradas de relevância prognóstica à análise univariada

VARIÁVEIS	B	p
CV dos ângulos máximos dos TD	29,671	0,026
CV da esfericidade dos PV	0,322	0,028
CV dos perímetros dos PV	0,212	0,029
CV da área dos PV	0,173	0,031

As curvas de sobrevida relativas a cada uma das variáveis apresentadas na Tabela 9 encontram-se expostas nos gráficos 9 a 12, assim como imagens ilustrativas da triangulação Delaunay e Voronoi podem ser observadas nas Figuras de 10 a 15.

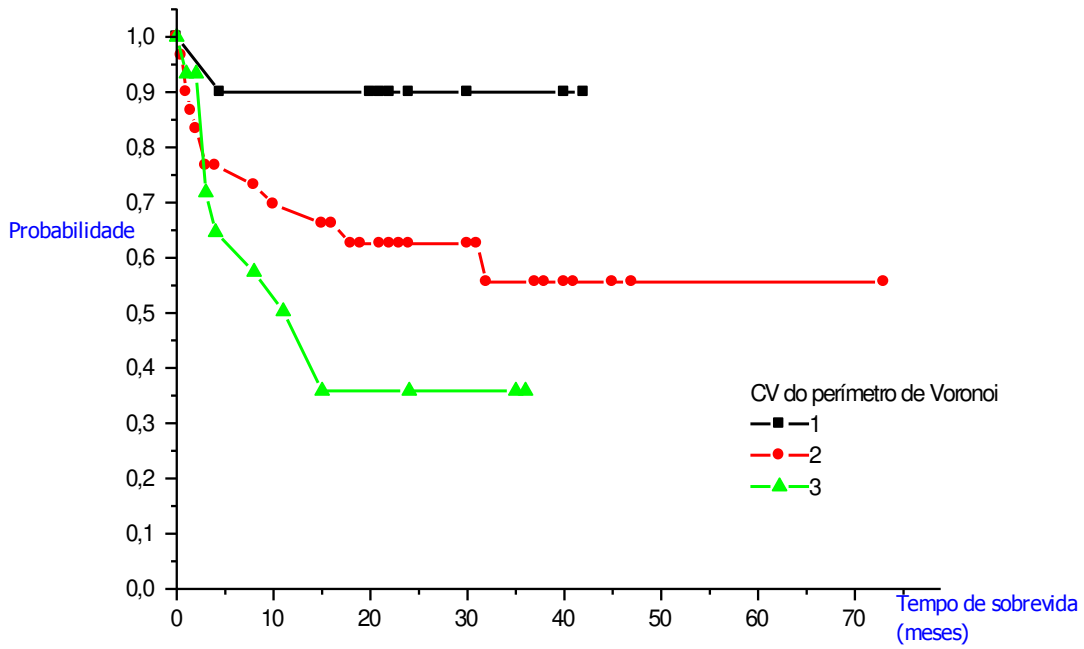


Gráfico 9 - Curva de sobrevivência do coeficiente de variação do perímetro de Voronoi.

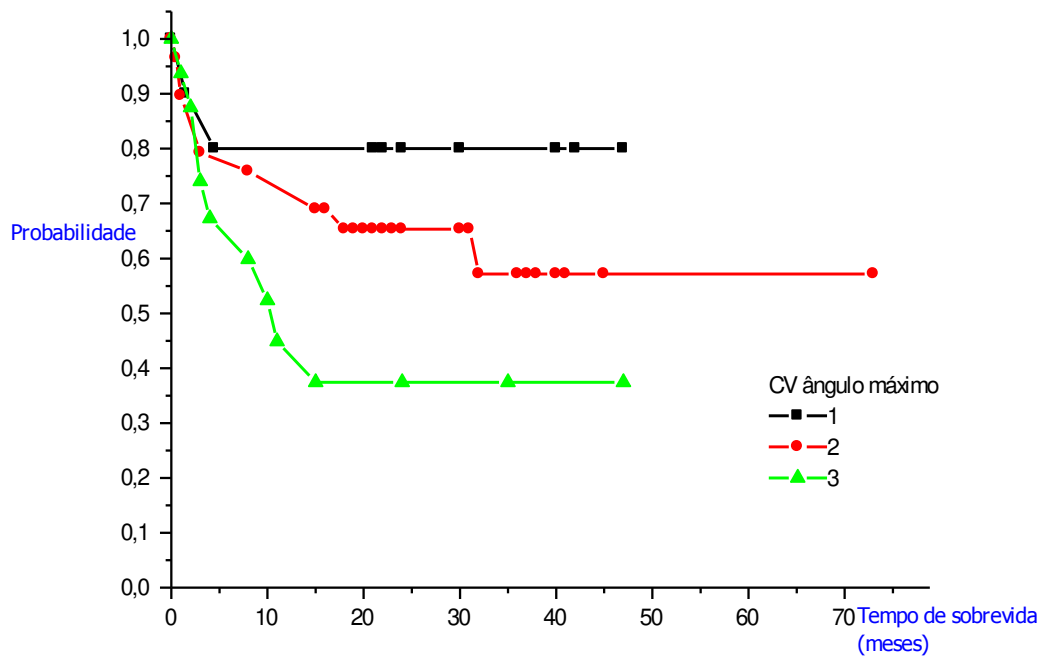


Gráfico 10 - Curva de sobrevivência do coeficiente de variação do ângulo máximo na triangulação Delaunay.

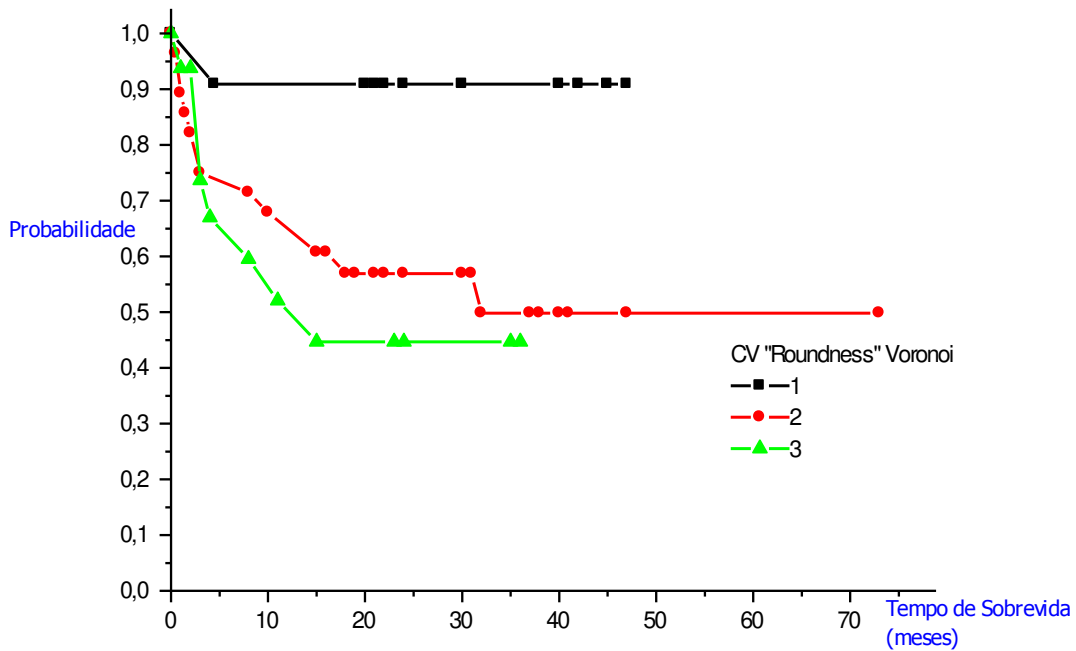


Gráfico 11 - Curva de sobrevivência do coeficiente de variação do "roundness" dos polígonos de Voronoi.

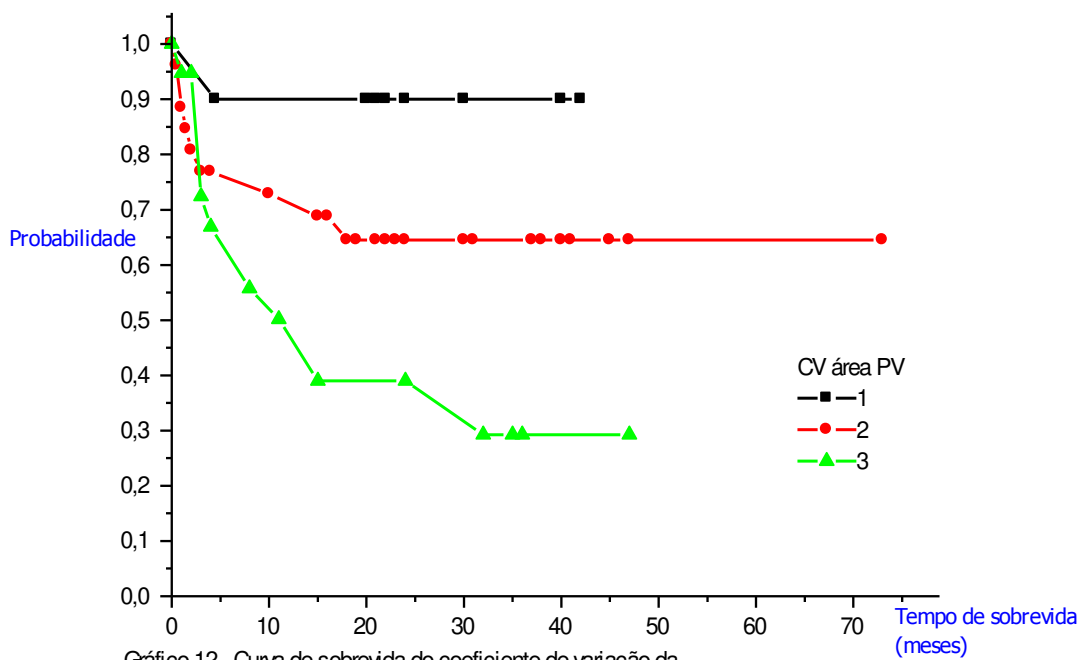


Gráfico 12 - Curva de sobrevivência do coeficiente de variação da área dos polígonos Voronoi.

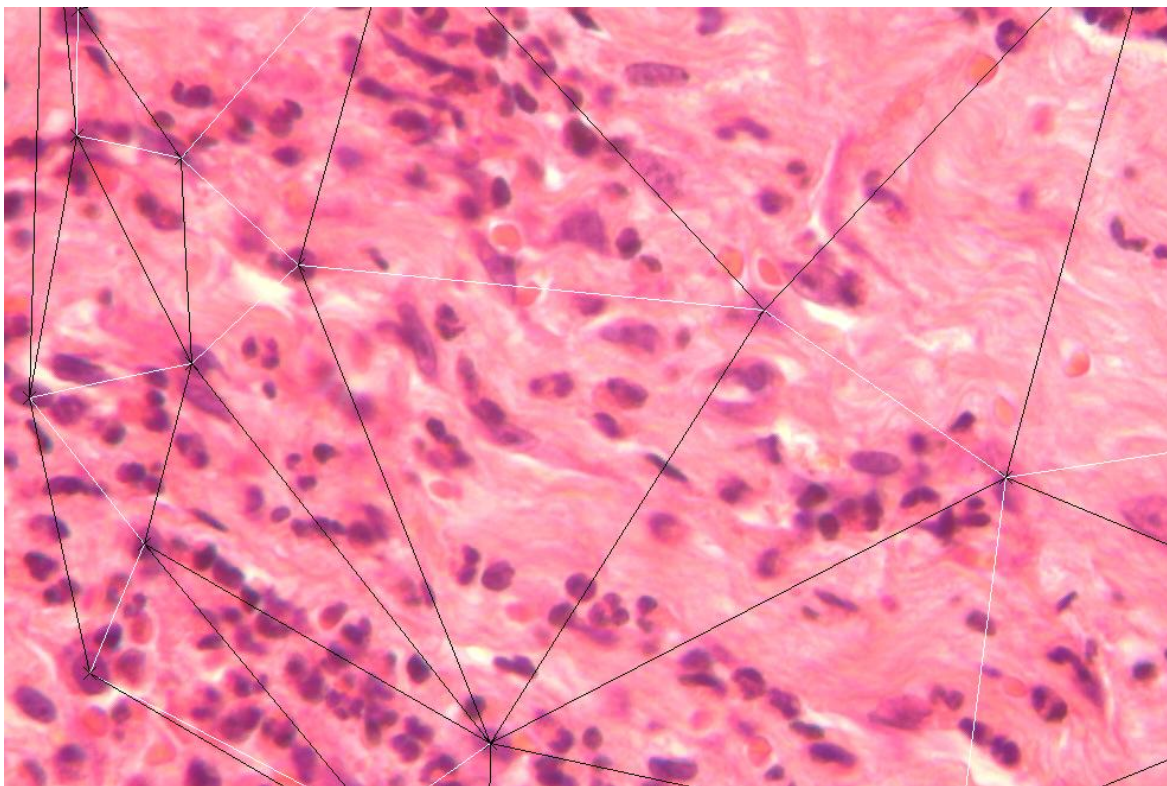


Figura 13 - Triangulação Delaunay (em preto) e Árvore Geradora Mínima (em branco) em fotomicrografia digital de amostra do animal 37 classificado por consenso como grau I de Patnaik, acompanhado por 42 meses até sua morte não relacionada à presença de MCC. HE, Objetiva 40X, ocular 10X. Dimensão: 1300X1030 pixels.

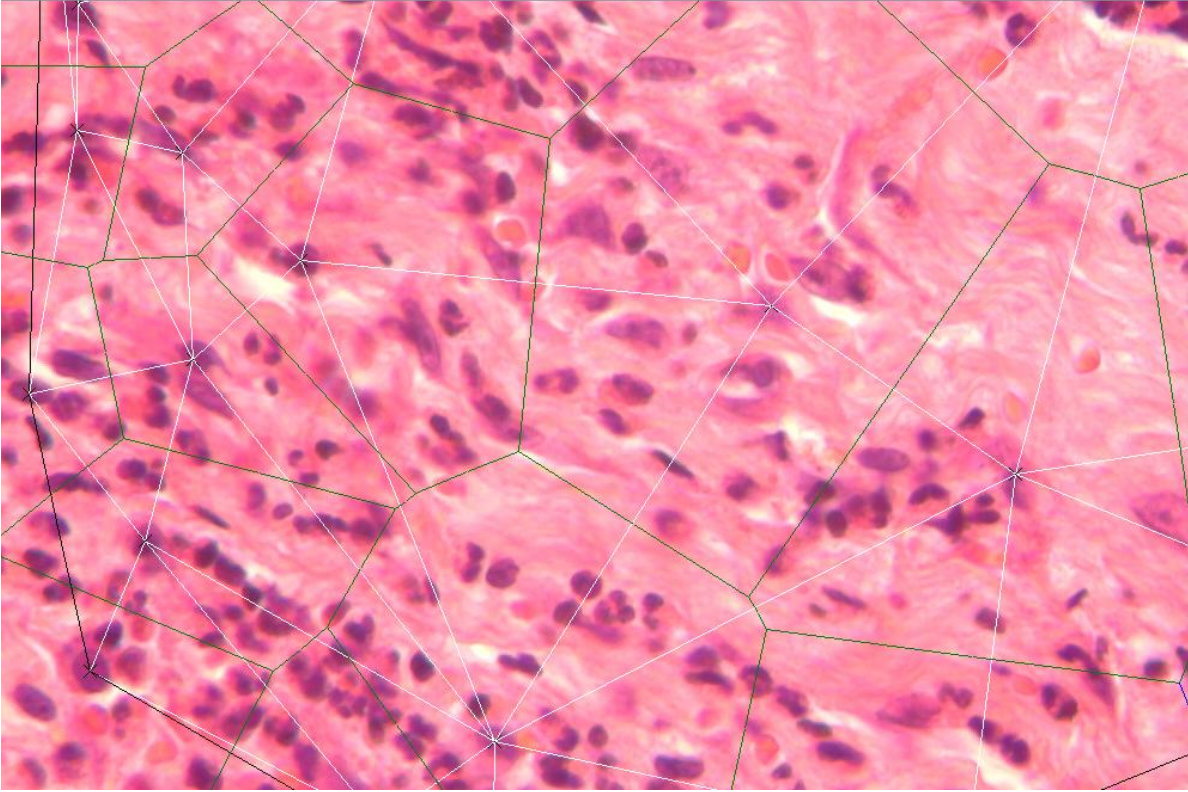


Figura 14 - Triangulação Delaunay (em branco) e Mosaico Voronoi (em preto) em fotomicrografia digital (animal 37), grau de consenso I de Patnaik, acompanhado por 42 meses até sua morte não relacionada à presença de MCC. HE, Objetiva 40X, ocular 10X. Dimensão: 1300X1030 pixels.

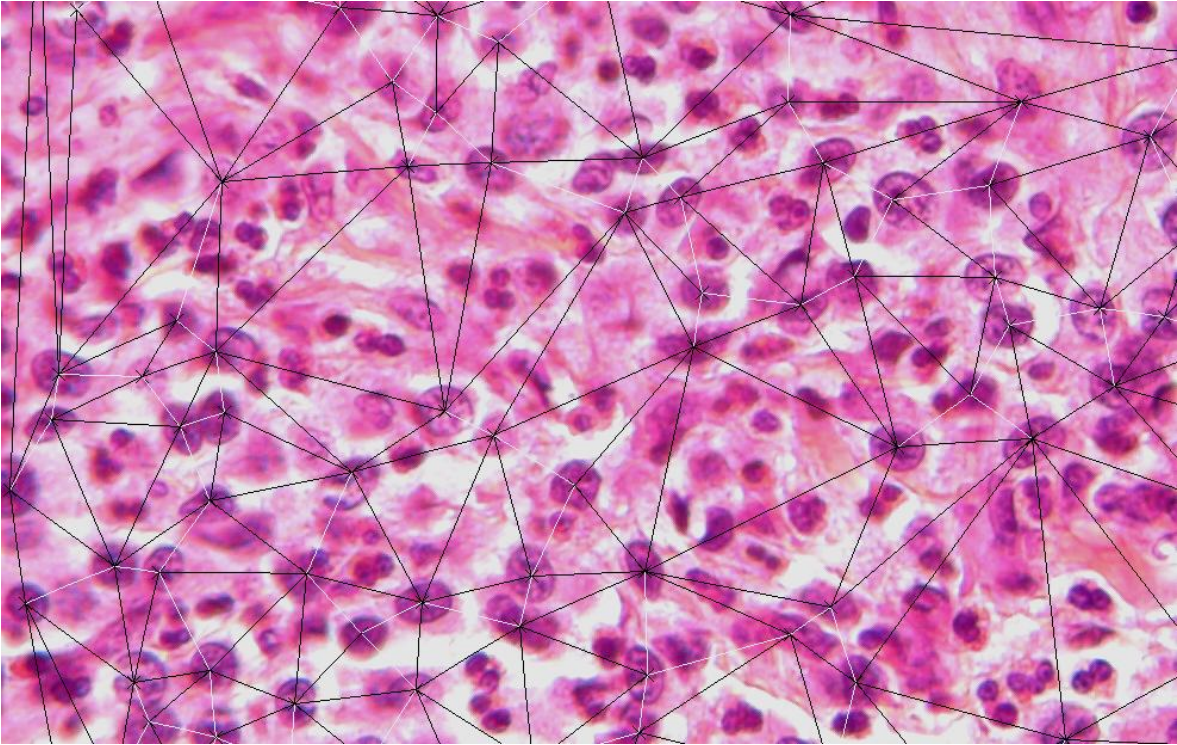


Figura 15 - Triangulação Delaunay (em preto) e Árvore Geradora Mínima (em branco) em fotomicrografia digital (animal 84), grau de consenso II de Patnaik, órbita associado à presença de MCC 18 meses após o diagnóstico. HE, Objetiva 40X, ocular 10X. Dimensão: 1300X1030 pixels.

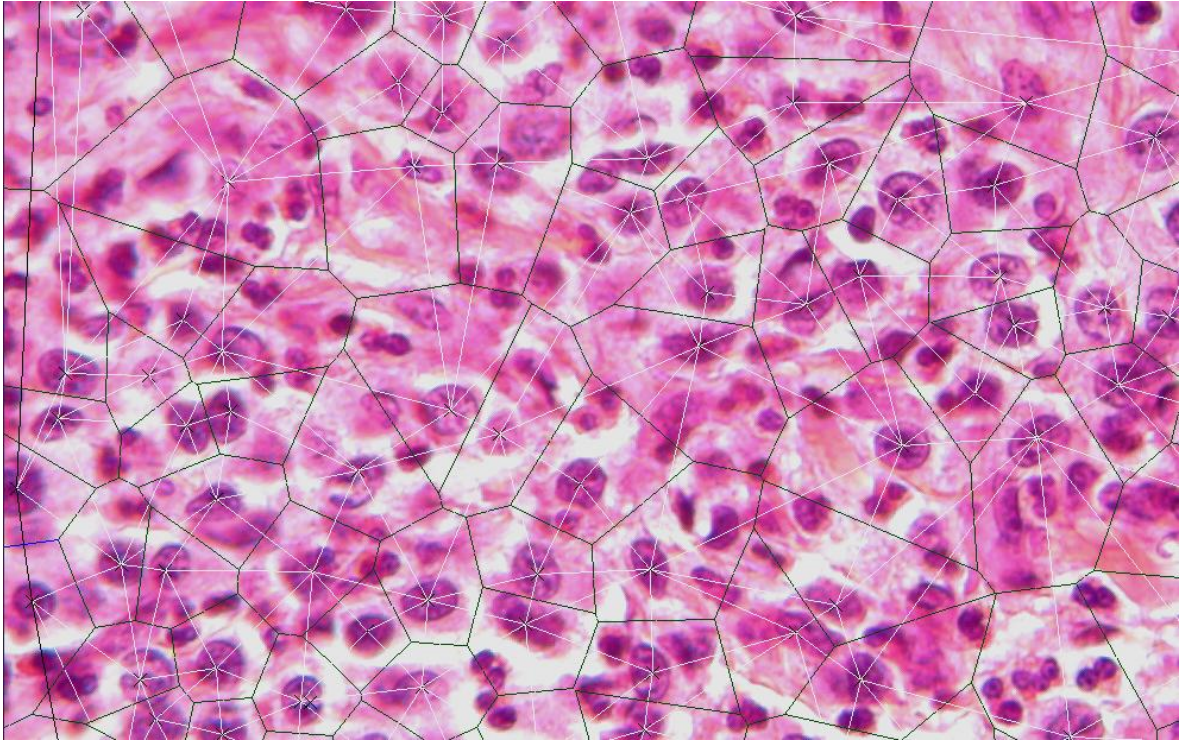


Figura 16 - Triangulação Delaunay (em branco) e Mosaico Voronoi (em preto) em fotomicrografia digital de amostra do animal 84 classificado por consenso como grau II de Patnaik, óbito associado à presença de MCC 18 meses após o diagnóstico. HE, Objetiva 40X, ocular 10X. Dimensão: 1300X1030 pixels.

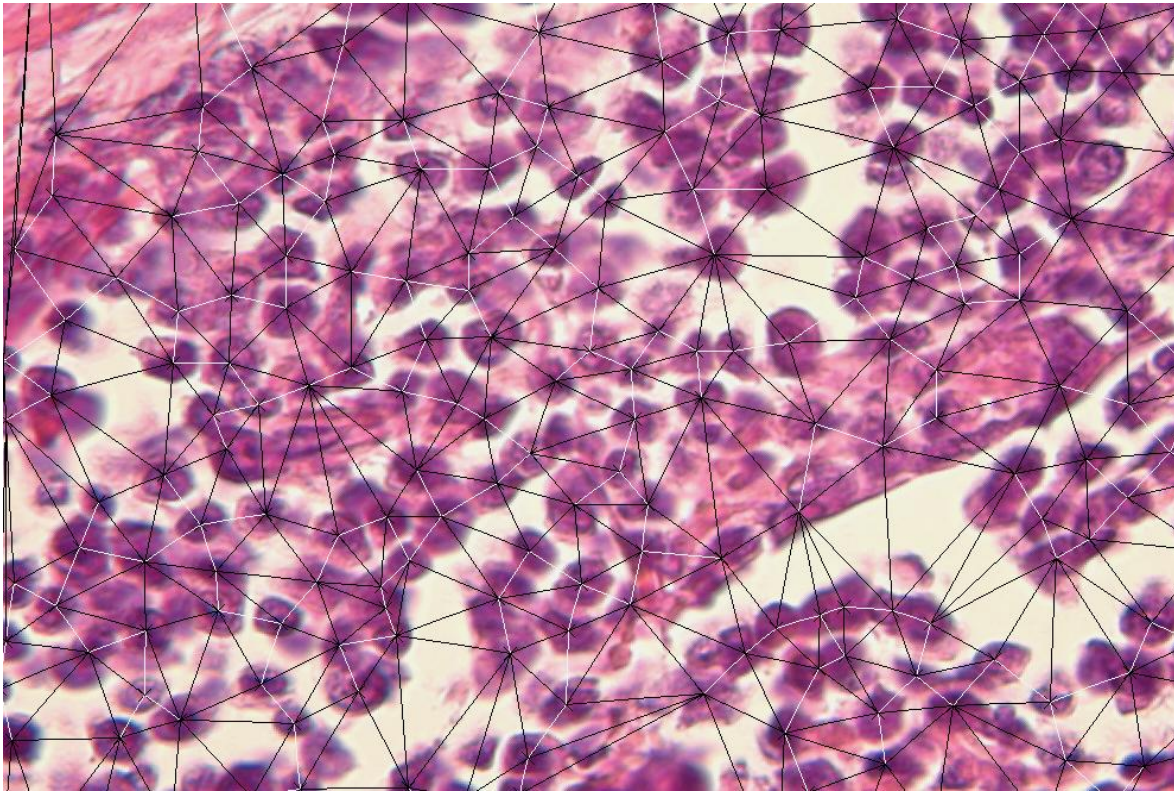


Figura 17 - Triangulação Delaunay (em preto) e Árvore Geradora Mínima (em branco) em fotomicrografia digital de amostra do animal 52 classificado por consenso como grau III de Patnaik, óbito associado à presença de MCC 01 mês após o diagnóstico. HE, Objetiva 40X, ocular 10X. Dimensão: 1300X1030 pixels.

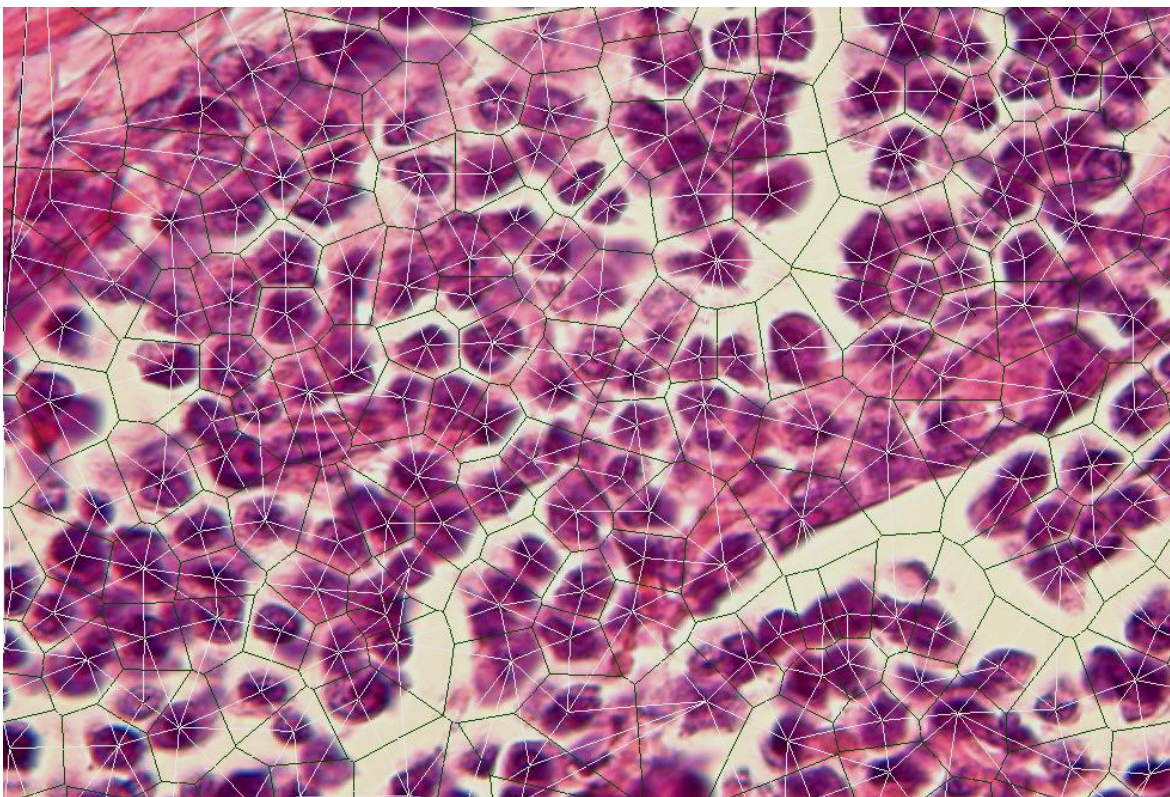


Figura 18 - Triangulação Delaunay (em branco) e Mosaico Voronoi (em preto) em fotomicrografia digital de amostra do animal 52 classificado por consenso como grau III de Patnaik, óbito associado à presença de MCC 01 mês após o diagnóstico. HE, Objetiva 40X, ocular 10X. Dimensão: 1300X1030 pixels.

A análise multivariada de todas as variáveis de ASE significativas à análise univariada o CV do ângulo máximo dos triângulos da TD revelou-se como variável independente ($p=0,021$).

Ao procedermos à análise multivariada das variáveis significativas de ASE juntamente com o grau conferido por cada um dos observadores e com o grau de consenso e, posteriormente, com o escore proposto observamos que:

- a) No caso do grau conferido pelo OBS 1 as variáveis independentes eram Grau de OBS 1 e o CV da área dos PV ($p=0,37$ e $p=0,34$, respectivamente).
- b) No caso do grau conferido pelos OBS 2 e 3, as variáveis independentes eram os seus Graus e o CV do Ângulo Máximo do TD

(para OBS 2 $p= 0,058$ e $0,040$ respectivamente e, para OBS 3 $p= 0,002$ e $0,096$, respectivamente).

- c) No caso do grau de consenso as variáveis independentes eram Grau de consenso e CV da esfericidade dos polígonos Voronoi ($p= 0,001$ e $0,059$).
- d) Nos casos do escore dos OBS 1, 2, 3 e de consenso, a única variável independente foi o próprio escore ($p=0,001$; $p=0,002$; $p=0,002$ e $p=0,000$, respectivamente).

6.1 – Amostras

O fato das amostras analisadas serem originárias de vários clínicos/cirurgiões sugere que diferentes técnicas de excisão com margens questionáveis tenham sido aplicadas. Poderia assim, implicar em distorções no resultado final da análise das diversas amostras, no entanto, Calahane *et al.* (2004); Michels *et al.* (2002); Murphy *et al.* (2004) e Simoes *et al.* (1994); são unânimes em afirmar que as diferenças nas técnicas cirúrgicas não são marcantes o suficiente para afetar o prognóstico e que o fato das margens cirúrgicas não se encontrarem livres de células neoplásicas não levam necessariamente a um pior prognóstico.

Ainda no que tange às amostras, a variedade de origens e, conseqüentemente, de tratamentos definidos para cada um dos pacientes, poderia afetar negativamente a confiabilidade da amostra. No entanto, verificou-se que o tratamento de escolha (cirúrgico) havia sido aquele preconizado por Cahalane *et al.* (2004) e por London & Séguin (2003). A utilização de quimioterapia adjuvante com prednisolona e/ou vincristina não revelou afetar significativamente a sobrevida conforme Calahane *et al.* (2004); McCaw *et al.* (1997); Séguin *et al.* (2006) e Turrel *et al.* (1988) observaram em seus estudos.

A graduação do MCC baseou-se no método de Patnaik *et al.* (1984) por ser este um método reconhecidamente de grande correlação com o prognóstico e devido ao fato de ser o mais amplamente aceito (Gierger *et al.*, 2003; Patnaik *et al.*, 1984; Rogers, 1996; Sfiligoi *et al.*, 2005; Simoes *et al.*, 1994; Simoes & Buttine, 1994; Walder & Gross, 1992).

6.2 – Dados Clínicos

O perfil dos animais estudados não diferiu daquele presente na literatura internacional no que diz respeito aos MCCs. A idade média de surgimento da

doença foi a mesma citada por Al-Sarraf *et al.* (1996), Cahalane *et al.* (2004), Gieger *et al.* (2003), Hahn *et al.* (2004), London & Séguin (2003), Michels *et al.* (2002), Murphy *et al.* (2004), Romansik *et al.* (2007), Scott *et al.* (1996), Séguin *et al.* (2001), Séguin *et al.* (2006), Sfiligoi *et al.* (2005), Simpson *et al.* (2004), Strefezzi *et al.* (2003), Walder & Gross (1992), sendo este em torno de oito anos. Estes autores relatam MCCs em animais com idade entre de 4 meses a 18 anos.

É interessante notar que, há maior ocorrência em cães da raça Boxer (n=19) na região de nosso estudo, da mesma forma que evidenciado em dados nacionais (Strefezzi *et al.*, 2003) e em literatura estrangeira (Cahalane *et al.*, 2004; Grabarević *et al.*, 2009; Hahn *et al.*, 2004; London & Séguin, 2003; Michels *et al.*, 2002; Romansik *et al.*, 2007; Scott *et al.*, 1996; Walder & Gross, 1992), porém diferentemente do que os mesmos pesquisadores sugeriram, a frequência de Retrievers afetados não foi maior do que a frequência nas demais raças na população por nós enfocada. Acreditamos que tal achado pode ser atribuído a uma menor popularidade destas raças no Brasil.

Embora o número de animais tenha sido limitado, podemos sugerir que a popularidade de uma raça pode inferir importância à ocorrência de MCCs na mesma. Este seria o caso dos cães da raça Fox Terrier Brasileiro (“Fox Paulistinha”) a qual, segundo a Confederação Brasileira de Cinofilia, originou-se de Terriers trazidos no século XIX e início do século XX por brasileiros que iam a Europa para fins de estudo e, voltavam trazendo exemplares de Terriers. Tal origem explicaria a presença desta raça em nosso estudo, porquanto os Terriers também são tidos como raças predispostas ao MCC (Romansik *et al.*, 2007; Walder & Gross, 1992).

A predominância em fêmeas, embora não significativamente diferente da frequência em machos foi a mesma encontrada na maior parte da literatura consultada (Al-Sarraf *et al.*, 1996; Hahn *et al.*, 2004; Murphy *et al.*, 2004; Simões *et al.*, 1994; Simpson *et al.*, 2004). Embora Cahalane *et al.* (2004) e Grabarević *et al.* (2009) observassem predominância em cães machos, também não puderam estabelecer qualquer correlação entre sexo e sobrevida, o que foi relatado apenas

por Gerritsen *et al.* (1998), os quais estabeleceram uma relação sobrevida-sexo significativa ($p=0,009$) em seu estudo.

Embora Turrel *et al.* (1988) e Gieger *et al.* (2003) tenham estabelecido uma relação significativa entre a localização do nódulo e a sobrevida, sendo que este último atribuiu à localização no focinho um pior prognóstico, nossos dados não deram suporte a esta teoria tanto no que tange à localização, quanto ao que diz respeito ao número de nódulos. Da mesma forma Al-Sarraf *et al.* (1996), Grabarević *et al.* (2009), Ishiguro *et al.* (2003), Murphy *et al.* (2004), Rogers (1996), Seguin *et al.* (2001), Seguin *et al.* (2006), Sfiligoi *et al.* (2005), Simpson *et al.* (2004) e Tham *et al.* (1999) afirmaram não haver encontrado relação entre localização e número de nódulos com a sobrevida.

Strefezzi *et al.* (2003), observaram uma maior frequência de nódulos múltiplas nos MCCs, no entanto, verificamos que a maioria de nossos animais apresentavam nódulos solitárias o que parece estar de acordo com a literatura internacional (Macy, 1985; O'Keefe, 1990, Simões *et al.*, 1994).

6.3 – Concordância Entre Observadores e Análise de Sobrevida

Em relação ao exame histológico de mastocitomas, muitos autores referem-se à difícil concordância entre observadores (Northrup *et al.*, 2005; Susaneck *et al.*, 2001).

A escolha do método de Kappa para estabelecer a concordância efetivou-se decorrente de ampla literatura atribuindo a este índice a capacidade de avaliar a concordância entre observadores na avaliação de conhecidos métodos de graduação de tumores e avaliações radiográficas (Coar e Freeman, 2004; Glaessgen *et al.*, 2004; Hasnain *et al.*, 2004; O'Flaherty *et al.*, 2002; Pretty & Maupomé, 2004). Devido ao nosso estudo ser baseado em lâminas cujos resultados eram desconhecidos e sem número pré-determinado de frequência de ocorrência, fizemos a opção pelo método proposto por Randolph (2005). A maior característica deste método é justamente a de se aplicar a diversos observadores,

com várias possibilidades de opções de escolha sem fixação de número de ocorrência para cada opção, ou seja, o Kappa Livre de margens (K_{free}).

Para fins de verificação da concordância, atendendo ao sugerido por Northrup *et al.* (2005), padronizamos a graduação das amostras de modo a que todos os patologistas acessassem o grau a partir de um único método. O método Kappa é o de escolha para avaliar concordância entre observadores, pois a porcentagem de diagnósticos concordantes depende do número de observadores envolvidos no estudo. É óbvio que enquanto três observadores em nosso estudo concordaram em 34,57% do total de diagnósticos, no estudo de Northrup *et al.* (2005) com 12 patologistas este número atingiu somente 6,67% de concordância total porquanto envolvia muito mais observadores. Entretanto, ao estabelecermos o índice Kappa ($K_{free} = 0,28$) para avaliar a concordância, verificamos que a mesma ainda se encontrava aquém do desejado sendo considerada fraca ($K_{free} \leq 0,40$).

O fato de estabelecermos a fraca concordância entre observadores reforça o sugerido por diversos autores quanto à necessidade de métodos que, somados às gradações existentes, possam prever melhor o comportamento biológico desta neoplasia (Kravis *et al.*, 1996; Northrup *et al.*, 2005; Preziosi *et al.*, 2007; Rech *et al.*, 2004; Simoes *et al.*, 1994; Susaneck *et al.*, 2001), uma vez que mesmo com a padronização do método não obtivemos uma boa concordância.

Há de se levar em conta que nenhum dos patologistas trabalha na mesma instituição e, que nenhum deles obteve seu aprendizado em anatomia patológica nas mesmas Instituições de ensino superior até o mestrado (inclusive). Estes fatores podem e devem ter peso sobre o resultado final da concordância, bem como o número de anos em experiência diagnóstica, no entanto, Northrup *et al.* (2005), não obtiveram melhores resultados apesar da formação e ambiente de trabalho serem os mesmos ou similares em seus estudos. O fato de não existir “padrão ouro” para o diagnóstico de MCCs impede que possamos avaliar qual o grau “correto” para cada um deles (Northrup *et al.*, 2005).

Vários autores inferem à subjetividade dos parâmetros utilizados à falta de sucesso em prever o comportamento de um grande número de MCCs,

principalmente aqueles classificados com grau II (Frimberger *et al.*, 1997; Kravis *et al.*, 1996; Northrup *et al.*, 2005; Preziosi *et al.*, 2007; Rech *et al.*, 2004; Rogers, 1996; Romansik *et al.*, 2007; Séguin *et al.*, 2001; Simoes *et al.*, 1994; Susaneck *et al.*, 2001). Quando em uma classificação diagnóstica há baixa concordância entre pessoas formadas no mesmo lugar precisamos suspeitar que ao menos alguns critérios desta classificação não são bem definidos e, portanto, seu diagnóstico não pode ser feito com uma concordância satisfatória. Assim, analisamos separadamente a reprodutibilidade dos critérios individuais que compõem a graduação Patnaik.

Nossos resultados encontram-se alinhados com o sugerido pela literatura, pois as variáveis de maior concordância entre os observadores eram justamente aquelas mais objetivas tais como a presença de binucleação (K_{free} 0,62), mitose (K_{free} 0,65), necrose (K_{free} 0,66), hemorragia (K_{free} =0,62), multinucleação (K_{free} =0,83) e de gigantócitos (K_{free} =0,814). Assim sendo, variáveis subjetivas como formato celular e tamanho celular obtiveram um índice kappa muito baixo (respectivamente K_{free} =0,09 e 0,08) aproximando-se do que é considerado ao acaso (K_{free} =0) e acabaram por não refletir a sobrevida dos pacientes.

Apesar da baixa concordância o grau refletiu de forma inequívoca a sobrevida dos pacientes quando utilizado sob a forma de média do grau conferido pelos três observadores ($p=0,001$), tal resultado foi semelhante àquele indicado por Gerritsen *et al.*, 1998; Hahn *et al.*, 2004; Patnaik *et al.*, 1984 e Turrel *et al.*, 1988. Corroboram este achado as afirmações de Frimberger *et al.*, (1997), London e Séguin, (2003), Romansik *et al.*, (2007); e Sfiligoi *et al.*, (2005), os quais afirmam que o grau histológico é ainda hoje um dos melhores fatores prognósticos.

Em nosso estudo, a obtenção da média permitiu melhor evidenciação do grau II desta neoplasia, o que não era observado com o resultado da graduação por nenhum dos três observadores isoladamente quando os MCCs, assim classificados, tendiam a se comportar como grau I ou III. Da mesma forma, vários autores afirmam que o processo de decisão torna-se mais complicado para os

MCCs de grau II, os quais muitas vezes se comportam como grau I ou III (Frimberger *et al.*, 1997; Rogers, 1996; Romansik *et al.*, 2007; Séguin *et al.*, 2001; Susaneck, 2001). Esta tendência pode ser explicada pela observação de Bigras *et al.* (1996), ao esclarecerem que “é bem conhecido que dentro de um sistema de classificação em três graus há a tendência de se escolher o grau II devido a que, na pior hipótese, este grau provê a menor possibilidade de distorção a partir da verdade”.

Ao observarmos as variáveis significativas ($p \leq 0,05$) podemos inferir que as de maior impacto são aquelas referentes à análise indireta de proliferação e diferenciação celular conforme o relatado por Romansik *et al.* (2007) em relação às mitoses, à contagem de AgNORs e Ki-67. A presença de nucléolos e o aspecto da cromatina, ambos os fatores prognósticos em nosso estudo, refletem os estudos sobre as AgNORs, as quais sabidamente são marcadores importantes para sobrevida de cães portadores MCCs (Bostock *et al.*, 1989; Kravis *et al.*, 1996; London & Séguin, 2003; Rech *et al.*, 2004; Romansik *et al.*, 2007; Simões *et al.*, 1994).

Sueiro *et al.* (2002), afirmaram que uma das melhores estruturas a serem avaliadas ultraestruturalmente é o núcleo. Tal achado corrobora nossos resultados no que tange a esta estrutura porquanto o aspecto do núcleo revelou-se de muito boa significância quanto a sobrevida ($p = 0,007$). Estes resultados ainda podem ser confirmados com os estudos morfométricos realizados por Maiolino *et al.* (2005), Strefezzi *et al.* (2003) e de Waldemarin *et al.* (2004), sendo que estes últimos pesquisadores caracterizaram a distribuição da heterocromatina e a morfologia dos nucléolos diferenciando, de forma objetiva, MCCs de histiocitomas e de tumor venéreo transmissível do cão (TVTC). No entanto, embora expresse tão bem a sobrevida, seu índice kappa foi considerado muito baixo ($K_{free} = 0,15$) e para elaborar o índice prognóstico é necessário que os critérios tenham, além de relevância prognóstica, uma reprodutibilidade aceitável entre os observadores.

As variáveis de Patnaik *et al.* (1984), sob análise pelo índice K_{free} , expressam o que a literatura vem exaustivamente apontando quanto à

subjetividade a que estão sujeitas as análises visuais humanas (Maiolino *et al.*, 2005; Northrup *et al.*, 2005; Strefezzi *et al.*, 2003; Waldemarin *et al.*, 2004). Pudemos observar que das sete variáveis que se apresentaram com concordância aceitável entre os três observadores, três não foram significativas para sobrevida, e as remanescentes eram mitose ($p=0,000$), presença de binucleação ($p=0,028$), aspecto da granulação citoplasmática ($p=0,007$) e presença de gigantócitos ($p=0,017$).

A avaliação da presença de mitoses (determinada em 3 categorias), assim como o estabelecimento do índice mitótico (número de mitoses por 10 campos de grande aumento) mostrou excelente relação com sobrevida (ambas com $p=0,000$). Estes resultados estão de acordo com aqueles obtidos por Elston *et al.*, 2009; Preziosi *et al.*, 2004; Romansik *et al.*, 2007 e Sakai *et al.*, 2002, embora estes últimos não tenham logrado êxito em obter valores médios significativamente diferentes entre o grau II e III dos MCC estudados.

Da mesma forma Romansik *et al.* (2007), estavam certos quando aventaram a possibilidade de haver variabilidade na identificação de mitoses, pois embora a concordância em nosso estudo tenha sido considerada boa ($K_{free} = 0,65$), foi próxima ao limite mínimo para ser considerado nesta categoria ($0,74 \geq K_{free} \geq 0,60$). Ainda segundo estes autores, fatores que podem influir nesta concordância estão relacionados à escolha dos campos para avaliação, mas acreditamos que também a habilidade individual em reconhecê-las possa estar envolvida, embora não tenhamos objetivamente avaliado esta possibilidade neste estudo.

A identificação das variáveis de concordância aceitável com relevância prognóstica permitiu reduzir o número de variáveis utilizadas para graduação. O estabelecimento de um novo escore, baseado na observação da granulação citoplasmática (pouco evidente=1, fina=2, e óbvia=3) e presença de mitoses (ausentes=1, até 2=2 e mais que duas=3), revelou-se significativamente relacionado à sobrevida.

A granulação intracitoplasmática já era apontada por Sueiro *et al.* (2002), como uma das melhores indicações de anaplasia em mastócitos neoplásicos ($p=0,006$). Patnaik *et al.* (1984), Walder & Gross (1992), Simoes & Schonning (1994), Rogers (1996), Hendrick *et al.* (1998), London & Seguin (2003), Strefezzi *et al.* (2003), referem os mesmos aspectos dos grânulos, correlacionando-os com a sobrevida do cães portadores de MCCs.

Naqueles MCCs bem diferenciados a evidente granulação preenche o citoplasma, naqueles moderadamente diferenciados os grânulos têm aspecto fino assemelhando-se a poeira e, naqueles mal diferenciados, apenas ocasionalmente, podem ser observados grânulos os quais, em sua maioria, apresentam-se finos e pouco evidenciáveis. Segundo Rech *et al.* (2004), pode-se ainda observar uma menor propriedade metacromática dos grânulos naqueles MCCs pouco diferenciados.

Marconato *et al.* (2008), ao alertar para o fato de que os grânulos citoplasmáticos poderiam interferir na visualização dos núcleos e que, este fato poderia forçar uma escolha de núcleos menos diferenciados para fins de morfometria nuclear, revela sua crença na capacidade prognóstica dos grânulos. No entanto, apesar de tantos elementos a favor, havemos de levar em conta o fator “degranulação de mastócitos”, frequentemente relatado nos MCCs o qual poderia diminuir consideravelmente a granularidade na área.

Simoes *et al.* (1994), aparentemente foram os únicos a referenciar a falta de relação significativa entre granularidade e sobrevida, embora tenham observado que o aumento do tamanho dos grânulos tenha sido mais evidente naqueles MCCs que não recorreram. Interessante notar que no mesmo ano, este mesmo autor utiliza-se da granulação como ferramenta auxiliar na definição de diferenciação de MCCs (Simoes e Schonning, 1994).

6.4 – Análise Sintática Estrutural.

Numahara *et al.* (2001), enfatizam que “a distribuição das células em um tecido podem ser de três tipos: (a) aleatório ou Poisson, (b) agrupada ou (c)

regular. A distribuição aleatória é formada ao acaso e não há interação entre células individuais. Uma distribuição agrupada por interações atrativas e, quando certa interação repulsiva ocorre entre os indivíduos, eles mantêm distancia uns dos outros e uma distribuição regular é formada.”, assim é válido supor que o nível de organização de um tecido relaciona-se com a interação entre suas células.

O somatório dos ramos da AGM, ou seja, seu comprimento total (SAGM), já foi relacionado à variação na distância entre estruturas e células (Weyn *et al.*, 1999; Zaitoun *et al.*, 1998) e, Brinkuis *et al.* (1996), observaram que o comprimento da AGM refletia o grau de diferenciação arquitetural do tecido tumoral ao estudar carcinoma ovariano avançado em mulheres. Desta forma não somos os primeiros a relatar a relação da sobrevida do paciente com o comprimento da AGM ($p=0,051$), embora tenhamos obtido um valor de p limítrofe. Nos estudos de Palmer *et al.* (2008), o SAGM foi uma variável significativa quanto a sobrevida, porém foi obscurecido pelo estadiamento do carcinoma ovariano e à doença residual à análise multivariada. Ao analisarmos de forma multivariada o SAGM com o grau de consenso da mesma forma observamos o obscurecimento do SAGM, restando apenas o grau como variável independente ($p=0,000$).

As variáveis resultantes da análise sintática estrutural tais como CV perímetro dos PV, CV área dos PV, CV ângulo máximo dos TD, CV da esfericidade dos PV e Somatório dos ramos da AGM, estão em sua maioria relacionadas à distribuição arquitetural das células nas amostras (Bigras *et al.*, 1996; Brinkuis *et al.*, 1996; Coleman *et al.*, 1994; Duyckaerts e Godefroy, 2000; Dubois *et al.*, 1999; Kansal *et al.*, 2000; Karch *et al.*, 2005; Keenan *et al.*, 2000; Minciacchi *et al.*, 2009; Palanza *et al.*, 2005; Palmer *et al.*, 2008; Raby *et al.*, 2001; Sudbo *et al.*, 2000^a; Weyn *et al.*, 1999; Zaitoun *et al.*, 1998).

O CV é a variável que melhor reflete a distribuição das células em um tecido. Pode ser representado pela razão entre o desvio padrão e a média, desta forma, seu valor mínimo é zero quando não há desvio padrão, ou seja, a

distribuição é regular; o valor é um ou maior representa um desvio padrão igual ou superior à média obtida, revelando uma distribuição por agrupamentos e; quando o valor do CV gira ao redor de 0,5 a distribuição é aleatória (Bigras *et al.*, 1996; Carreta *et al.*, 2001; Dubois *et al.*, 1999; Duyckaerts e Godefroy, 2000; Karch *et al.*, 2005; Minciacchi *et al.*, 2009; Palanza *et al.*, 2005; Raby *et al.*, 2001).

O fato dos CVs de área, perímetro e esfericidade dos PV estarem significativamente refletindo a sobrevida indicam claramente que, quando em uma mesma amostra há aumento da frequência de aparecimento de PVs pequenos e grandes e de PVs regulares e alongados, o prognóstico é pior. Este padrão sugere a formação de agrupamentos celulares tanto mais abundantes quanto menor for a sobrevida. (Bigras *et al.*, 1996; Carreta *et al.*, 2001; Dubois *et al.*, 1999; Duyckaerts e Godefroy, 2000; Karch *et al.*, 2005; Minciacchi *et al.*, 2009; Palanza *et al.*, 2005; Raby *et al.*, 2001). Desta forma, grandes agrupamentos de mastócitos neoplásicos indicam um pior prognóstico.

Estas observações nos permitem entender o papel do CV do perímetro do PV como variável independente à análise multivariada das variáveis da ASE, independentemente se calculada juntamente com o grau e o novo escore ou não ($p=0,037$). A presença de PVs pequenos e grandes provocaria uma grande variação do perímetro médio, o que representa um CV alto (Duyckaerts e Godefroy, 2000). Assim quanto maior o CV do perímetro maior a variedade de tamanho do PV e menor a sobrevida e maior a desorganização tecidual.

A TD fornece parâmetros relacionados aos obtidos pelo MV, uma vez que se trata de subgrafo do MV (Kansal *et al.*, 2000; Morel *et al.*, 2001; Sudbø *et al.*, 2000^a).

Da mesma forma o CV do ângulo máximo dos triângulos Delaunay manteve-se como variável independente ($p=0,027$). Scarpelli (2008), ao estudar as variáveis de ASE em relação ao Tumor Venéreo Transmissível do Cão (TVTC), verificou que quanto maior a média dos ângulos mínimos dos triângulos Delaunay, mais rápida era a resposta da neoplasia ao tratamento quimioterápico

e que a média era significativamente correlacionada à cura. Se levarmos em consideração que os ângulos de um triângulo são complementares e seu somatório não deve ultrapassar 180° , é válido supor que o menor ângulo máximo de um triângulo possível é 60° . Assim, nos triângulos equiláteros, teríamos uma distribuição regular dos núcleos. Se há variação de ângulos máximos em uma triangulação Delaunay, aparentemente temos uma distribuição irregular dos núcleos marcados como já havíamos observado em nossos achados, confirmando assim a interpretação dada aos achados de CV de perímetro, 'esfericidade' e área dos PV.

As observações de Carreta *et al.* (2001), áreas livres ao redor das células são de tamanhos diferentes, portanto as células não são regularmente distribuídas através do espaço naquele tecido proporcionando um aumento de CV à ASE, tal fato pode também explicar os resultados obtidos quanto aos CV pois sabidamente necrose, hemorragia e edema estão presentes em MCCs e relacionam-se à sobrevida (Patnaik *et al.*, 1984 e Walder e Gross, 1992). Em nossos estudos não fomos hábeis em correlacionar estas variáveis com a sobrevida de forma inequívoca embora seu índice Kappa tenha sido considerado bom para as variáveis hemorragia e necrose.

Segundo Kumar *et al.* (2005), pleomorfismo e índice mitótico são indicativos da irregularidade de um tecido, indicando a agressividade (malignidade) das neoplasias. Os CVs estariam assim refletindo esta irregularidade, expressa na análise das variáveis de Patnaik pela mitose ($p=0,001$) e pleomorfismo ($p=0,024$). Esta última variável obteve um índice $K_{free}=0,99$, ou seja, muito próximo do que seria conferido ao acaso ($K_{free}=0$), desta forma podemos concordar com Brinkhuis *et al.* (1996), quando afirmam que a grande vantagem da ASE é sua objetividade. Nossos cálculos revelaram, após análise multivariada, que o Grau de Patnaik não foi obscurecido pelas variáveis significativas da ASE mostrando-se complementares a este refletindo, conforme a literatura acima exposta, a desordem como fator preponderante na indicação de maior agressividade. Quando calculadas juntamente com o escore proposto, não obtiveram o mesmo poder e foram substituídas por este último.

Assim, podemos ainda inferir que a ASE acrescentou informação prognóstica valiosa à graduação proposta por Patnaik e colaboradores em 1984, pois para todos os três observadores bem como para o grau de consenso, alguma de suas variáveis (no caso os CVs) revelou-se como fator prognóstico independente ao lado do grau nas análises multivariadas.

Podemos concluir que:

- É baixa a concordância entre observadores ao se utilizar o método proposto por Patnaik *et al.* (1984) na graduação de MCCs, evidenciando-se assim a baixa reprodutibilidade do método;
- Embora o grau de Patnaik esteja significativamente relacionado com a sobrevida dos animais afetados, individualmente muitos dos parâmetros utilizados por Patnaik *et al.* (1984) não o estão;
- Um escore simplificado, obtido de variáveis de significativamente relacionadas à sobrevida e de concordância aceitável, fornece relação significativa com a sobrevida sobrepujando na maioria das vezes o método de Patnaik;
- O protocolo frente ao estadiamento parece ser aquele onde a ausência de mitoses e a presença de granulação evidente impliquem em maior sobrevida;
- Novos estudos com maior amostragem devem ser realizados de modo a se testar a reprodutibilidade do escore proposto;
- A Análise Sintática Estrutural reflete de forma inequívoca os distúrbios arquiteturais presentes nas diferentes apresentações de diferenciação dos MCCs;
- A Análise Sintática Estrutural fornece variáveis matemáticas objetivas e de relevância prognóstica para MCCs;
- Variáveis derivadas da Triangulação Delaunay, do Mosaico Voronoi e da Árvore Geradora Mínima são mais robustas que o grau de Patnaik e podem complementá-lo, melhorando a previsibilidade desta neoplasia.

- Al-Sarraf R, Mauldin N, Patnaik AK, Meleo KA Prospective study of radiation therapy for the treatment of grade 2 mast cell tumors in 32 dogs. **Journal of veterinary Internal Medicine**; 1996, 10(6):376-378.
- Bigras G, Marcelpoil R, Brambilla E & Brugal G. Cellular Sociology applied to neuroendocrine tumors of the lung: quantitative model of neoplastic architecture. **Cytometry**; 1996, 24:74-82.
- Bostock DE, Crocker J, Harris K & Smith P. Nucleolar organizer regions as indicators of post-surgical prognosis in canine spontaneous mast cell tumors. **British Journal of Cancer**; 1989, 59:915-918.
- Brinkhuis M, Baak JPA, Meijer GA, van Diest PJ, Mogensen O, Bichel P, Neijt JP. Value of quantitative pathological variables as prognostic factors in advanced ovarian carcinoma. **Journal of Clinical Pathology**; 1996, 49:142-148.
- Cahalane AK, Payne S, Barber LG, Duda LE, Henry CJ, Mauldin GE, Frimberger AE, Cotter SM, Moore AS. Prognostic factors for survival of dogs with inguinal and perineal Mast cell tumors treated surgically with or without adjunctive treatment: 68 cases (1994-2002). **Journal of the American Veterinary Medical Association**; 2004, 225(3): 401-408.
- Camby I, Salmon I, Danguy A, Pasteels J-L, Kiss R. Computer-assisted microscope characterization of BCNU-induced modifications in the collective behavior of 12 human brain cancer cell lines. **Journal of Neuro-oncology**; 1996, 28: 1-11.
- Carreta D, Santarelli M, Vanni D, Carrai R, Sbriccoli A, Pinto F, Minciacchi D. The organization of spinal projecting brainstem neurons in an animal modelo of muscular dystrophy. A retrograde tracing study on mdx mutant mice. **Brain research**; 2001, 895:213-222.

- Coard KC, e Freeman VL. Gleason grading of prostate cancer: Level of concordance between pathologists at the University Hospital of West Indies. **American Journal of Clinical Pathology**; 2004; 122:373-6.
- Coleman K, van Diest PJ, Baak JPA, Mullaney J. Syntactic structure analysis in uveal melanomas. **British Journal of Ophthalmology**; 1994 78: 871-874.
- Dubois JC, Souchier C, Couble ML, Exbrayat P, Lissac M. An image analysis method for the study of cell adhesion to biomaterials. **Biomaterials**; 1999, 20:1841-1849.
- Duyckaerts C e Godefroy G. Voronoi tessellation to study the numerical density and the spatial distribution of neurons. **Journal of Chemical Neuroanatomy**; 2000, 20:83-92.
- Elston LB, Sueiro FAR, Cavalcanti JN, Metzke K. The importance of the Mitotic Index as a Prognostic Factor for Survival of Canine Cutaneous Mast Cell Tumors: A validation study. **Veterinary Pathology**; 2009, 46:362-365.
- Frimberger AE, Moore AS, LaRue SM, Gliatto JM Bengtson AE. Radiotherapy of incompletely resected moderately differentiated Mast Cell Tumor in the dog: 37 cases (1989-1993). **Journal of American Animal Hospital Association**; 1997, 33 (july-august): 320-324.
- Gerritsen RJ, Teske E, Kraus JS, Rutteman GR. Multiagent chemotherapy for mast cell tumours in the dog. **The Veterinary Quarterly**; 1998, 20(1):28-31.
- Gieger TL, Théon AO, Werner JA McEntee MC Rassnick KM, DeCock HEV. Biologic behavior and prognostic factors for mast cell tumors of the canine muzzle: 24 cases (1999-2001). **Journal of Veterinary Internal Medicine**; 2003, 17(5):687-692.
- Glaessgen A, Hamberg H, Pihl C-G. Interobserver reproducibility of modified Gleason score in radical prostatectomy specimens. **Virchows Archives**; 2004, 445:17-21.

- Grabarević Ž, Špoljar JB, Kurilj AG, Šoštarić-Zuckermann I-C, Artuković B, Hohšteter M, Beck A, Džaja P & Strmečki NM. Mast cell tumor in dogs – Incidence and Histopathological characterization. **Collegium Antropologicum**; 2009, 33(1):253-258.
- Guillaud M, Matthews JB, Harrisson A, MacAulay C. & Skov K. A novel image cytometric method for quantization of immunohistochemical staining of cytoplasmic antigens. **Analytical Cellular Pathology**; 1997, 14:87-99.
- Hahn KA, King GK & Carreras JK. Efficacy of radiation therapy for incompletely resected grade-III mast cell tumors in dogs: 31 cases (1987-1998). **Journal of the American Medical Association**; 2004, 224(1): 79-82.
- Hanain M, Onishi H, Elstein AS. Inter-rater agreement in judging errors in diagnostic reasoning. **Medical Education**; 2004, 38(6):609-616.
- Hendrick MJ, Mahaffey EA, Moore FM, Vos JH, Walder EJ. Histological classification of Mesenchymal tumors of skin and soft tissues of domestic animals, In: **World Health Organization International Histological classification of tumors of domestic animals**, 2ed, AFIP, 2s, 1:28, 1998.
- Hollensead SC, Lockwood WB, Elin RJ. Errors in pathology and laboratory medicine: Consequences and prevention. **Journal of surgical oncology**; 2004, 88(3):161-181.
- Ishiguro T, Kadosawa T, Takagi S, Kim G, Ohsaki T, Bosnakovski D, Okumura M, Fujinaga T. Relationship of disease progression and plasma histamine concentrations in 11 dogs with mast cell tumors. **Journal of Veterinary Internal Medicine**; 2003, 17:194-198.
- Kansal AR, Torquato S, Harsh IV, Chiocca EA, Deisboeck TS. Simulated brain tumor growth dynamics using a three-dimensional cellular automaton. **Journal of Theoretical Biology**; 2000, 203:367-382.
- Karch R, Neumann F, Ullrich R, Neumuller J., Podesser BK, Neumann M, Schreiner W. The spatial pattern of coronary capillaries in patients with dilated,

ischemic, or inflammatory cardiomyopathy. **Cardiovascular Pathology**; 2005, 14:135-144.

- Keenan S, Diamond J, McCluggage WG, Bharucha H, Thompson d, Bartels PH, Hamilton PW. An automated machine vision system for the histological grading of cervical intraepithelial neoplasia (CIN). **Journal of Pathology**; 2000, 192:351-362.
- Kravis LD, Vail DM, Kissebert WC, Ogilvie GK, Volk, LM Frequency of argyrophilic nuclear organizer regions in fine-needle aspirates and biopsy specimens from mast cell tumors in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**; 1996, 209(8):1418-1420.
- Kumar V, Fausto N., Abbas AK. **Robbins & Cotran – Patologia: bases Patológicas das doenças**. 7 ed. Elsevier, São Paulo, 2005. 1616p.
- London CA & Seguin B, Mast cell tumor in the dog. **The Veterinary Clinics: Small Animals Practice**; 2003, 33(3):473-489.
- Macy DW Canine Mast Cell Tumors. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**; 1985, 15(4):783-803.
- Maiolino P, Cataldi M, Paciello O, Restucci B, De Vico G; Nucleomorphometric analysis of canine cutaneous mast cell tumours **Journal Of Comparative Pathology**; 2005, 133 (2-3): 209-211.
- Marconato L, Marchetti V, Francione D, Masserdotti C, Gregori M, Leotta R, Abramo F Morphometrical approach for predicting regional lymph node micrometastatic load in canine mast cell tumors: preliminary results. **Veterinary and comparative pathology**; 2008, 6(3):162-170.
- McCaw DL; Miller MA, Bergman PJ, Withrow SJ, Moore AS, Knapp DW, Fowler D, Johnson JC. Vincristine therapy for mast cell tumors in dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**; 1997, 11(6):375-378.

- Metze K e Adam R. Comments on the paper “c-erbB-2 expression and nuclear pleomorphism in canine mammary tumors”. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**; 2005, 38: 141-143.
- Michels G, Knapp D, DeNicola, DB, 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**; 2002, 38:458-466.
- Minciacchi D, Kassa RM, Del Tongo C, Mariotti R, Bentivoglio M. Voronoi-based spatial analysis reveals selective interneuron changes in the cortex of FALS mice. **Experimental Neurology**; 2009, 215:77-86.
- Misdorp W, Mast cells and canine mast cell tumours. A review. **Veterinary Quarterly**; 2004, 26(4):156-169.
- Morel D, Marcelpoil R, Brugal G. A proliferation control network model: The simulation of two-dimensional epithelial homeostasis. **Acta Biotheoretica**; 2001, 49:219-234.
- Murphy S, Sparkes AH, Smith KC, Blunden AS, Brearley MJ. Relationship between the histological grade of cutaneous mast cell tumors in dogs, their survival and the efficacy of surgical resection. **The Veterinary Record**; 2004, 154(24):743-746.
- Northrup NC, Harmon BG, Gieger TL, Brown CA, Carmicheal KP, Garcia A, Latimer KS, Munday JS, Rakich PM, Richey RJ, Stedman NL, Cheng A, Howert EW Variation among Pathologists in histologic grading of canine cutaneous mast cell tumors. **Journal of Veterinary diagnostic investigation**; 2005, 17(3):245-248.
- Numahara T, Tanemura M, Nakagawa T, Takaiwa T. Spatial data analysis by epidermal Langerhans cells reveals an elegant system. **Journal of Dermatological Science**; 2001, 25:219-228.

- O'Keefe DA, Canine Mast Cell Tumors. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**; 1990, 20(4):1105-1115.
- Oberholzer M, Östreicher M, Christen H, Brühlmann M. methods in quantitative image analysis. **Histochemistry and Cell biology**; 1996, 105:333-355.
- O'Flaherty M, Lerum K, Martin P, Grassi D. Low agreement for assessing the risk of postoperative deep venous thrombosis when deciding prophylaxis strategies: a study using clinical vignettes. **BMC Health Service Research**; 2002, 2(1):16.
- Palanza L, Jhaveri S, Donati S, Nuzzi R, Vercelli A. Quantitative spatial analysis of the distribution of NADPH-diaphorase-positive neurons in the developing and mature rat retina. **Brain Research Bulletin**; 2005, 65:349-360.
- Palmer JE, Cassia LJS, Irwin CJ, Morris AG, Jansen EAM, Baak JP, Rollason TP. The Prognostic and Predictive Value of Syntactic Structure Analysis in Serous Carcinoma of the Ovary, **International Journal of Gynecological Pathology**; 2008, 27:191-198.
- Patnaik AK, Ehler WJ & MacEwen EG Canine Cutaneous Mast Cell Tumor: Morphologic grading and survival time in 83 dogs. **Veterinary Pathology**; 1984, 21(5):469-474.
- Pretty IA e Maupomé G. A closer look at diagnosis in clinical dental practice: Part 3: Effectiveness of radiographic diagnostic procedures. **Journal of Canadian Dental Association**; 2004, 70(6): 388-394.
- Preziosi R; Sarli G; Paltrinieri M. Multivariate survival analysis of histological Parameters and Clinical Presentation in Canine Cutaneous Mast Cell Tumours, **Veterinary Research Communications**; 2007, 31: 287-296.
- Preziosi R; Sarli G; Paltrinieri M. Prognostic value of intratumoral vessel density in Cutaneous Mast Cell Tumours of the dog. **Journal of Comparative Pathology**; 2004, 130:143-151.

- Raby BN, Polette M, Gilles C, Clavel C, Strumane K, Matos M, Zahm J-M, Van Roy F, Bonnet N, Birembaut P. Quantitative cell dispersion analysis: new test to measure tumor cell aggressiveness. **International Journal of Cancer**; 2001, 93:644-652.
- Randolph JJ *Online Kappa Calculator*. Acessado junho 3, 2009, from <http://justus.randolph.name/kappa>(2008).
- Rech RR, Graça DL, Kommers GD, Sallis ESV, Raffi MB, Garmatz SL Canine mast cell tumor. Study of 45 cases. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**; 2004, 56(4):441-448.
- Rogers KS, Mast cell tumors: Dilemmas of diagnosis and treatment. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**; 1996, 26(1):87-102.
- Romansik EM; Reilly CM, Kass PH, Moore PF & London CA. Mitotic Index is predictive for survival for Canine Cutaneous Mast Cell Tumors. **Veterinary Pathology**; 2007, 44:335-341.
- Sakai H, Noda A, Shirai N, Lidaka T, Yanai T & Masegi T. Proliferative activity of canine mast cell tumors evaluated by Bromodeoxyuridine incorporation and Ki-67 expression. **Journal of Comparative Pathology**; 2002, 127:233-238.
- Scarpelli KC, Variáveis Derivadas da Análise da Estrutura Sintática e Dados Clínicos como Fatores Preditivos em Tumor Venéreo Transmissível Canino com Terapia De Vincristina. Campinas (SP): UNICAMP; 2008
- Scott WD, Miller JHW, Griffin EC. Tumores neoplásicos e não neoplásicos. In: **Dermatologia de Pequenos Animais**, 5ed, Interlivros, Rio de Janeiro, 1996. p927-995.
- Seguin B, Besancon MF, McCallan JL, Dewe LL, Tenwolde MC, Wong EK, Kent MS. Recurrence rate, clinical outcome and cellular proliferation indices as prognostic indicators after incomplete surgical excision of cutaneous Grade II Mast Cell Tumors: 28 dogs (1994-2002). **Journal of Veterinary Internal Medicine**; 2006, 20:933-940.

- Seguin B, Bregazzi VS, Powers BE & Fettman MJ Clinical outcome of dogs with grade-II mast cell tumors treated with surgery alone: 55 cases (1996-1999). **Journal of the American Veterinary Medical Association**; 2001, 218(7):1120-1123.
- Seki N, Mohammed AY, Cuevas LE, Bailey W, Squire B, Ramsay A. Colour vision and proficiency in diagnostic microscopy. **Tropical Medicine and International Health**; 2005, 10(5):433-434.
- Sfiligoi G, Rassnick K, Scarlett JM, Northrup NC, Gieger T. Outcome of dogs with mast cell tumors in the inguinal or perineal region versus others cutaneous locations: 124 cases (1990-2001). **Journal of the American Veterinary Medical Association**; 2005, 226(8):1368-1374.
- Simoes JPC & Schoning P Canine mast-cell tumors - A comparison of staining techniques, **Journal of veterinary diagnostic investigation**; 1994, 4(4):458-465.
- Simoes JPC, Schoning P & Butine M Prognosis of canine mast cell tumors: A comparison of three Methods, **Veterinary Pathology**; 1994, 31:637-647.
- Simpson AM, Ludwig LL, Newman SJ, Bergman PJ, Hottinger HA, Patnaik AK Evaluation of surgical margins required for complete excision of cutaneous mast cell tumors in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**; 2004, 224(2):236-240.
- Sowter C & Bertolino P. Hystometry and the H.O.M.E. concept: An aid to the grading of intra-cervical neoplasia? **Analytical Cellular Pathology**; 1995, 9: 269-279.
- Strefezzi RDF, Xavier JG & Catão-Dias JL. Morphometry of Canine Cutaneous Mast Cell Tumors. **Veterinary Pathology**; 2003, 40:268-275.
- Sudbø J, Bankfalvi A, Bryne M, Marcelpoil R, Boysen M, Piffko J, Hemmer J, Kraft K & Reith A. Prognostic Value of Graph Theory-based Tissue Architecture Analysis in Carcinomas of the Tongue. *Laboratory Investigation*; 2000a, 80(12):1881-1889.

- Sudbø J, Marcelpoil R, & Reith A. New algorithms based on the Voronoi Diagram applied in a pilot study on normal mucosa and carcinomas. **Analytical Cellular Pathology**; 2000, 21:71-86.
- Sueiro, FAR; Daleck & Alessi, (Mast cell ultrastructure in different types of canine mast cell tumor) Ultraestrutura dos mastócitos de diferentes tipos histológicos de mastocitoma em cães. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**; 2002, 54(3).
- Susaneck SJ How useful are diagnostic tests in staging mast cell tumors? **DVM**; 2001, 32(2):1S.
- Tham DH, Mauldin EA & Vail DM Prednisone and vinblastine chemotherapy for canine mast cell tumor – 41 cases (1992-1997). **Journal of Veterinary Internal Medicine**; 1999, 13:491-497.
- Turrel JM; Kitchel BE, Miller Prognostic factors for radiation treatment of mast cell tumor in 85 dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**; 1988, 193(8):936-940.
- Waldemarin KCA, Beletti ME, Costa LF Nuclear morphometry of neoplastic cells as a method for diagnosis of histiocytoma, mastocytoma and transmissible venereal tumor in dogs. **Real-Time Imaging**; 2004, 10(4):197-204.
- Walder EJ & Gross TL. **Canine Mast Cell Tumor In: Gross, TL; Ihrke, PJ; Walder, EJ Veterinary Dermatopathology – a macroscopic and microscopic evaluation of canine and feline skin disease**, Mosby Year Book, St, Louis, 470-473, 1992.
- Watson D. The natural neighbor series manuals and sources codes. **Computers & Geosciences**; 1999, 25:463-466.
- Weyn B, Tjalma WAA, Vermeylen P, van Daele A, van Marck E, Jacob W. Determination of tumor prognosis based on angiogenesis-related vascular patterns measured by fractal and syntactic structure analysis. **Clinical oncology**; 2004, 16:307-316.

- Weyn B, van de Wouwer G, Kumar-Singh S, van Daele A, Scheunders P, van Marck E, Jacob W. Computer-assisted differential diagnosis of malignant mesothelioma based on syntactic structure analysis. **Cytometry**, 35:23-29, 1999.
- Zaitoun AM, Mardini H al & Record CO. Quantitative assessment of gastric atrophy using the syntactic structure analysis. **Journal of Clinical Pathology**; 1998, 51:895-900.

**APÊNDICE 1 – FORMULÁRIO DE AVALIAÇÃO DE MCCA
GRADUAÇÃO DE MASTOCITOMAS CANINOS**

Lâmina nº _____

Conclusão: mastocitoma grau _____

AVALIADOR: _____

GRAU I

- Pouco ou moderadamente celular
- Lesão confinada a derme e espaços interfoliculares
- Mastócitos bem diferenciados
- Células (Céls) em grupos ou em fileiras separadas por fibras colágenas maduras da derme
- Céls arredondadas monomórficas
- Citoplasma abundante
- Contorno celular bem definido
- Grânulos intracitoplasmáticos
- Núcleo arredondado
- Cromatina condensada
- Ausência de nucléolo
- Edema e necrose discretos (mínimos)

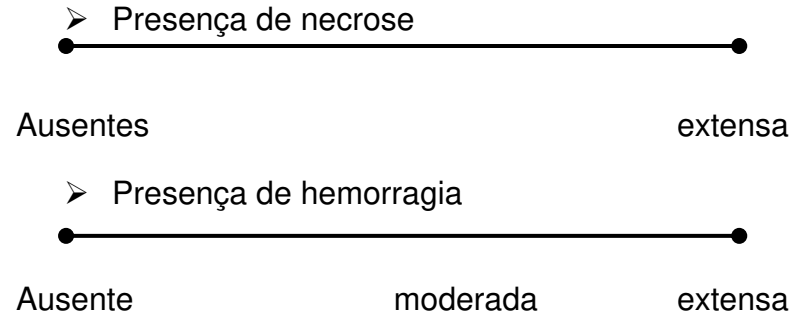
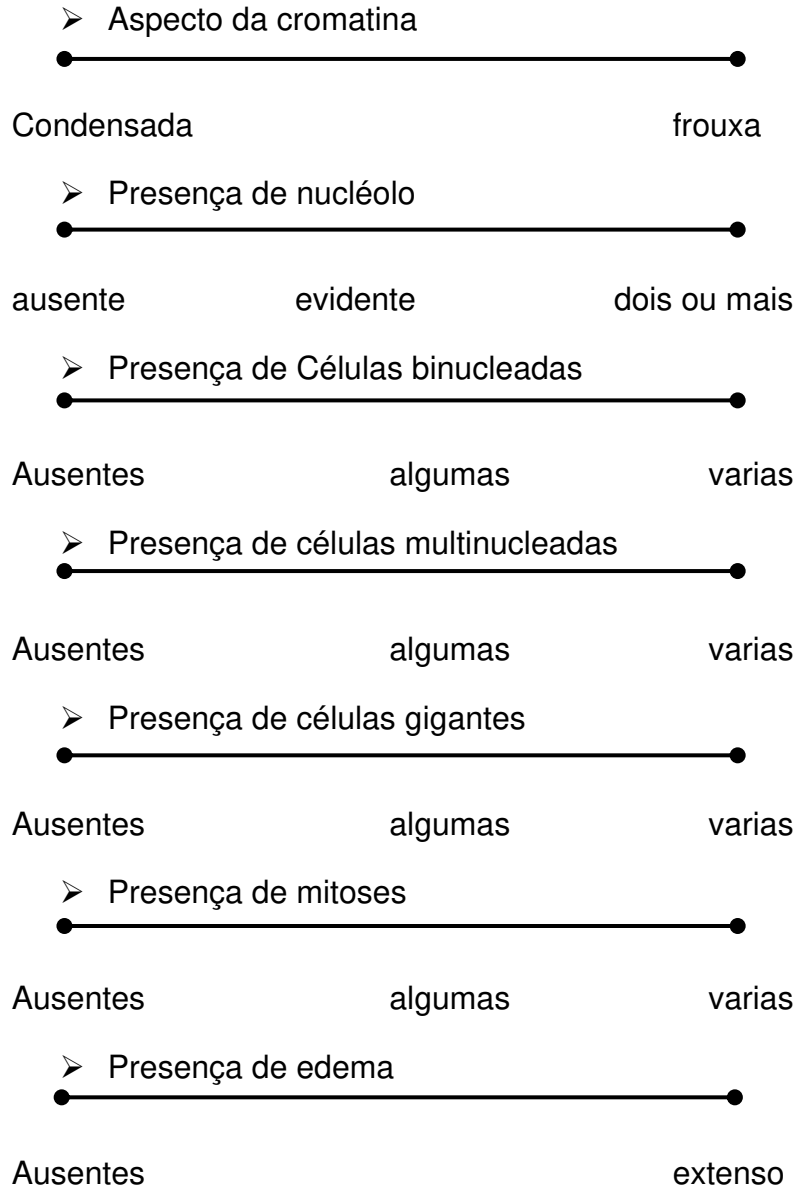
GRAU II

- Moderada a intensamente celular
- Infiltração e/ou substituição de derme profunda e subcutâneo
- Céls moderadamente pleomórficas
- Céls arranjadas em grupos com estroma fibrovascular delgado
- Presença de estroma fibrocolagenoso espessado com hialinização
- Céls arredondadas ou ovais
- Céls fusiformes e células gigantes espalhadas na lesão
- A maioria das céls apresenta citoplasma bem definido
- Céls com citoplasma indistinto
- Fina granulação intracitoplasmática
- Algumas céls com grandes grânulos hipercromáticos
- Núcleos arredondados a endentados
- Cromatina escassa
- Nucléolo evidente e único
- Células binucleadas ocasionais
- Raras mitoses
- Áreas de edema difuso
- Áreas de necrose

GRAU III

- Grande celularidade
- Pleomórfico
- Substituição de subcutâneo e tecidos profundos
- Céls de tamanho médio
- Céls arredondadas e/ou ovóides
- Céls fusiformes
- Céls dispostas em densas placas
- Citoplasma indistinto
- Grânulos intracitoplasmáticos finos ou pouco visualizáveis (não óbvios)
- Presença de estroma fibrovascular
- Estroma fibrocolagenoso espesso
- Estroma fibrocolagenoso com áreas hialinizadas
- Núcleo vesicular endentado
- Núcleo arredondado vesicular
- Um ou mais nucléolos proeminentes
- Presença frequente de células binucleadas
- Presença de células gigantes
- Presença de células multinucleadas
- Mitoses frequentes
- Presença de edema
- Presença de necrose
- Presença de hemorragia

**APÊNDICE 1 – FORMULÁRIO DE AVALIAÇÃO DE MCCS
GRADUAÇÃO DE MASTOCITOMAS CANINOS**



APÊNDICE 2 – PUBLICAÇÃO COM RESULTADOS OBTIDOS NA PRODUÇÃO DESTE TRABALHO DE TESE MEDIANTE CONTAGEM DE MITOSES

Vet Pathol 46:362–365 (2009)

Letter to the Editor

The Importance of the Mitotic Index as a Prognostic Factor for Survival of Canine Cutaneous Mast Cell Tumors: A Validation Study

Editor:

The importance of the mitotic index (MI) as a prognostic factor in veterinary oncology has been emphasized recently.^{5,12-14} In their interesting exploratory study on canine cutaneous mast cell tumors, Romansik et al.¹² showed a significant association between MI and overall survival, which could be important for clinical decision making, especially in the case of Patnaik grade II tumors. The median survival time for dogs with a tumor MI ≤ 5 was significantly longer than for those with a MI > 5 , regardless of the grade. Similarly, dogs with Patnaik grade II tumors and a MI ≤ 5 survived longer than those with a MI > 5 . The cut-point applied in this study was based on the distribution of the MI, as well as on MI categories published for other tumor types.

Because the choice of the cut-point is critical in prognostic factor studies^{6,7} and because the clinical relevance of new prognostic indicators should always be investigated in an independent group,^{9,10,12} we started a validation study to test the utility of the cut-points suggested by Romansik et al.¹² Fifty-seven dogs with cutaneous mast cell tumors were included in this study. In every case, the diagnosis had been confirmed independently by 3 veterinary pathologists, and complete follow-up information had been obtained. The tumor grade was determined according to Patnaik¹² by consensus of the 3 observers. The number of mitotic figures/10 high-power fields was counted as described by Romansik et al.¹² and compared with survival data in a Cox proportional hazards model using MI as a stratified variable.⁴ The mean MI of grade I tumors ($n = 5$) was 0.6 (range: 0–3). Grade II tumors ($n = 41$) had a mean MI of 2.2 (range: 0–16); grade III tumors ($n = 11$) had a mean MI of 7.4 (range: 0–21; Kruskal-Wallis test $P = .0033$). The Dunn posthoc test showed significant differences between grades I and II and between I and III but not between II and III. Furthermore, a Jonckheere-Terpstra test demonstrated that the MI values increased with grade ($P = .001$). When applying a cut-point at MI = 5, our results were very similar (Figs. 1, 2) to those reported by Romansik et al.¹² Dogs with an MI > 5 had a median survival time of 8 months, whereas dogs with MI ≤ 5 did not reach median survival time ($P = .003$; log-rank test). Next, we looked for other cut-points, submitting the MI values to a cluster analysis according to the Ward algorithm after a logarithmic transformation.^{2,9,11} Furthermore, the R^2 values, also called coefficients of determination, of each Cox regression were recorded. R^2 varies between 0.0 and 1.0 and can be interpreted as the fraction of the total variance of the survival regression, which is explained by the MI score system. Finally, the stability of the regressions was tested

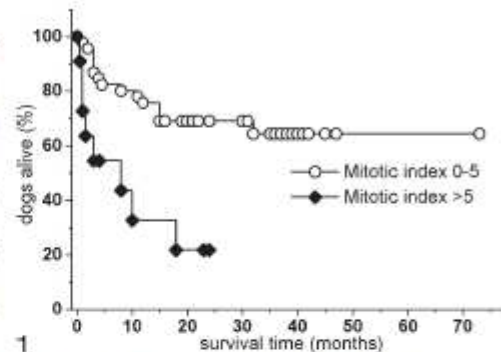


Fig. 1. Kaplan-Meier survival plot of all dogs ($n = 57$). Stratification at a cut-point of MI = 5. Log-rank test $P = .003$.

by bootstrap resampling. This technique creates new data sets of equal size by random sampling of the original data with replacement. Then for each of these "new" sets a new Cox regression is calculated and the variables entering the "new" regressions are recorded.^{1,3,4,8} WinStat 3.1 and SPSS 8.0 software was used.

The dendrogram derived from the cluster analysis strongly suggested the creation of 3 groups: 1) dogs with tumor MI = 0, which did not reach median survival; 2) dogs with tumor MI between 1 and 7 and a median survival time of 18 months; and 3) dogs with tumor MI > 7 and a

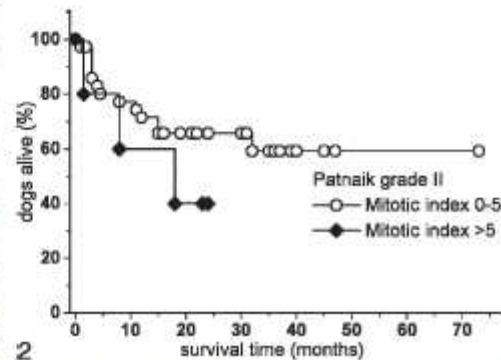


Fig. 2. Kaplan-Meier survival plot of grade II tumor-bearing dogs ($n = 41$). Stratification at a cut-point of MI = 5. Log-rank test $P = .09$.

APÊNDICE 2 – PUBLICAÇÃO COM RESULTADOS OBTIDOS NA PRODUÇÃO DESTE TRABALHO DE TESE MEDIANTE CONTAGEM DE MITOSES

Vet Pathol 46:2, 2009

363

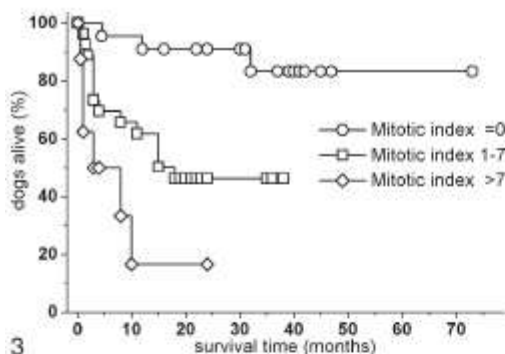


Fig. 3. Kaplan-Meier survival plot of all dogs ($n = 57$). Stratification in 3 groups; log-rank test $P < .0001$. Median survival time for group 3 (MI > 7), 3 months; for group 2 (MI between 1 and 7), 15 months; group 1 did not reach median survival time.

median survival of 3 months (Fig. 3). When looking only at the subgroup with grade II tumors (Fig. 4), dogs with a tumor MI = 0 did not reach median survival, whereas dogs with a tumor MI between 1 and 7 had a median survival time of 15 months. The R^2 value of Cox regression applying the MI stratification of Romansk et al.¹² was 0.05588 and therefore lower than that of the stratification proposed in this study (0.08596). The higher explanatory power of the latter was confirmed by the bootstrap resampling study; when comparing both MI stratifications simultaneously in 100 new bootstrap sets, the MI stratified according to our method entered into the final Cox model in 91% of the resampling sets; the MI stratified according to Romansk in only 9%.

In summary, our investigation underlines the prognostic importance of the mitotic count for dogs with cutaneous mast cell tumors. However, we believe that a stratification in 3 groups with cut-points at 1 and 7 mitoses per 10 high-power fields is superior to the stratification proposed by Romansk et al.¹² Further independent studies are necessary to corroborate our proposal.

Lilian B. Elston, DVM, MSc
School of Veterinary Medicine, PUC-MINAS,
Poços de Caldas
Felipe A.R. Sueiro, DVM, PhD
Veterinary School, UNIRP, São José do Rio Preto
Josemara N. Cavalcanti, DVM, PhD
Veterinary School, FESB, Bragança Paulista
Konradin Metzke, MD, PhD
Postgraduate Course in Pathophysiology
Department of Pathology
University of Campinas, Brazil

References

1 Adam RL, Silva RC, Pereira FG, Leite NJ, Lorand-Metze I, Metzke K: The fractal dimension of nuclear

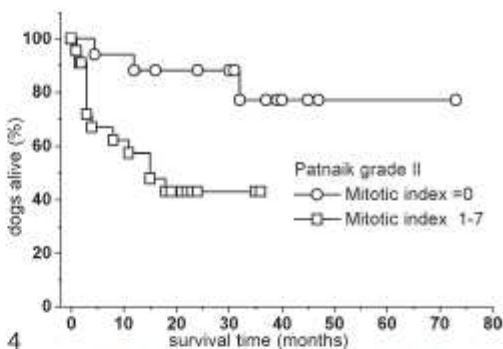


Fig. 4. Kaplan-Meier survival plot of grade II tumor-bearing dogs ($n = 41$). Stratification at a cut-point of MI = 0/1 and MI = 7/8; log-rank test $P = .0096$. Group 3, composed of only 2 dogs, was not included in the diagram. Median survival for MI 1-7: 15 months.

chromatin as a prognostic factor in acute precursor B lymphoblastic leukemia. *Cell Oncol* **28**:55-59, 2006

2 Calonego SB, Barjas-Castro ML, Metzke K, Pereira FG, Lorand-Metze I: The influence of storage and leukocyte depletion on the antigen densities of FY1, FY2, MNS3 and MNS4 measured by flow cytometry. *Transfus Apher Sci* **38**:101-107, 2008

3 Lorand-Metze I, Meira DG, Lima CS, Vassallo J, Metzke K: The differential diagnosis between aplastic anemia and hypocellular myelodysplasia in patients with pancytopenia. *Haematologica* **84**:564-565, 1999

4 Lorand-Metze I, Pinheiro MP, Ribeiro E, de Paula EV, Metzke K: Factors influencing survival in myelodysplastic syndromes in a Brazilian population: comparison of FAB and WHO classifications. *Leuk Res* **28**:587-594, 2004

5 Luong RH, Baer KE, Craft DM, Ettinger SN, Sease TJ, Bergman PJ: Prognostic significance of intratumoral microvessel density in canine soft-tissue sarcomas. *Vet Pathol* **43**:622-631, 2006

6 Metzke K: Dichotomization of continuous data: a pitfall in prognostic factor studies. *Pathol Res Pract* **204**:213-214, 2008

7 Metzke K, Adam RL: Pitfalls in prognostic factor studies. *Braz J Med Biol Res* **38**:141-143, 2005

8 Metzke K, Chiari AC, Andrade FL, Lorand-Metze I: Changes in AgNOR configurations during the evolution and treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Hematol Cell Ther* **41**:205-210, 1999

9 Metzke K, Lobo AM, Lorand-Metze I: Nucleolus organizer regions (AgNORs) and total tumor mass are independent prognostic parameters for treatment-free period in chronic lymphocytic leukemia. *Int J Cancer* **89**:440-443, 2000

10 Metzke K, Oliveira GB, Pereira FG, Adam RL, Lorand-Metze I: Spontaneous apoptosis in chronic

APÊNDICE 2 – PUBLICAÇÃO COM RESULTADOS OBTIDOS NA PRODUÇÃO DESTE TRABALHO DE TESE MEDIANTE CONTAGEM DE MITOSES

- lymphocytic leukemia is not an independent prognostic factor for stability of disease when compared with combined AgNOR and TTM scores. *Cell Oncol* **27**:199–201, 2005
- 11 Oliveira GB, Pereira FG, Metzke K, Lorand-Metze I: Spontaneous apoptosis in chronic lymphocytic leukemia and its relationship to clinical and cell kinetic parameters. *Cytometry* **46**:329–335, 2001
 - 12 Romansik EM, Reilly CM, Kass PH, Moore PF, London CA: Mitotic index is predictive for survival for canine cutaneous mast cell tumors. *Vet Pathol* **44**:335–341, 2007
 - 13 Sánchez J, Ramirez GA, Buendía AJ, Vilafranca M, Martínez CM, Altimira J, Navarro JA: Immunohistochemical characterization and evaluation of prognostic factors in canine oral melanomas with osteocartilaginous differentiation. *Vet Pathol* **44**:676–682, 2007
 - 14 Spangler WL, Kass PH: The histologic and epidemiologic bases for prognostic considerations in canine melanocytic neoplasia. *Vet Pathol* **43**:136–149, 2006