

Lúcia Hechter, Daniel Guimarães Gerardi
Faculdade de Veterinária – Hospital de Clínicas Veterinárias

INTRODUÇÃO

O mastocitoma é o tumor de pele mais diagnosticado em cães. Os sinais clínicos associados à presença da neoplasia, são, frequentemente, secundários à liberação de histamina, heparina e outras substâncias bioativas contidas no interior dos mastócitos neoplásicos. Em decorrência da ação sistêmica destas substâncias, a ulceração gastrointestinal (GI) é uma complicação significativa, com estudos sugerindo uma prevalência de 83% em achados *post mortem*. Os mecanismos de ulceração GI não foram completamente elucidados, entretanto, sugere-se que possam estar relacionados à elevação nos níveis de histamina plasmática.

OBJETIVOS

O presente trabalho avalia a ocorrência de lesões GI em caninos com mastocitoma cutâneo, buscando relacionar seu aparecimento com o surgimento e gravidade de sinais GI e valor de histamina plasmática no momento do diagnóstico.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados 41 cães da rotina clínico/oncológica do Hospital de Clínicas Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul com diagnóstico confirmado de mastocitoma cutâneo. Os cães incluídos no estudo foram avaliados clinicamente e, se considerados aptos, posteriormente, foram submetidos à cirurgia para exérese do tumor e exame endoscópico para avaliação do trato gastrointestinal. Todos os cães foram avaliados para presença e a gravidade dos sinais clínicos GI segundo escala proposta por Cascon (2011), modificada para o presente estudo. Histologicamente, as amostras coletadas durante exame endoscópico foram avaliadas segundo os critérios propostos por Day et al. (2008). Na data do procedimento cirúrgico, uma amostra de sangue venoso foi coletada para obtenção de plasma, sendo o plasma separado e congelado a -80°C até a sua análise. Para a determinação quantitativa de histamina *in vitro* utilizou-se um teste de ELISA de competição (Histamine ELISA, IBL Internacional, Hamburg, Germany) com limite de detecção 0,02ng/ml. A dosagem de histamina plasmática foi realizada em 40 cães com mastocitoma, e em 18 cães considerados saudáveis (grupo controle).

Inicialmente, todas as amostras foram mantidas em bandeja com gelo, até completo descongelamento. Após descongeladas, as amostras foram aciladas e mantidas *overnight* a uma temperatura entre $2-8^{\circ}\text{C}$. Subsequentemente, cada padrão acilado, controle acilado e amostras de paciente aciladas foram pipetadas em duplicata nos respectivos poços da microplaca e, à elas, foi adicionado o conjugado enzimático (histamina conjugada à peroxidase) e antissoro de coelho anti-histamina. A microplaca foi incubada a temperatura ambiente (TA) por três horas.

Durante o período de incubação, uma quantidade de antígeno presente na amostra e uma quantidade fixa de antígeno marcado com enzima competem pelos locais de ligação dos anticorpos que revestem os poços.

Transcorridas as três horas, a solução de incubação foi desprezada, os poços foram lavados quatro vezes com 250 μL do tampão de lavagem. A solução de substrato TMB (3,3',5,5' tetrametilbenzidina) foi adicionada e a placa incubada novamente por 40 minutos à TA. Após a reação do substrato, a ligação antígeno-anticorpo é identificada, e a intensidade da cor desenvolvida é inversamente proporcional à quantidade de antígeno na amostra (Figura 1). Para parar a reação do substrato, foi adicionado à solução de parada e, o conteúdo dos poços agitado cuidadosamente logo após sua adição. A densidade óptica foi medida com auxílio de um espectrofotômetro a 450 nm (VersaMax ELISA microplate reader®/molecular devices) imediatamente após a adição da solução de parada e, a quantificação das amostras, foram obtidas a partir da equação da reta proveniente da curva de calibração.

As variáveis quantitativas foram descritas pela mediana, percentis 25 e 75 e comparadas entre grupos pelo teste de Mann-Whitney.

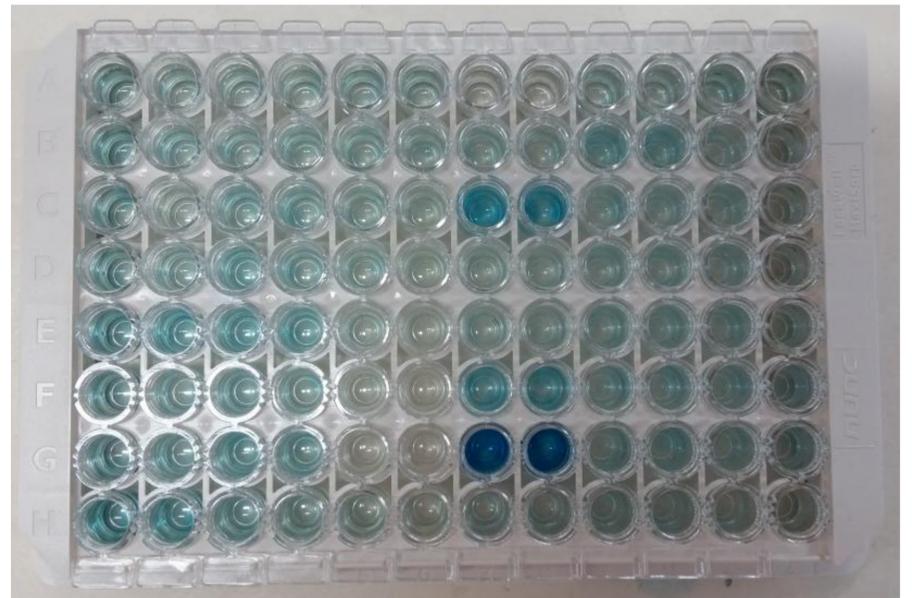


Figura 1: Microplaca contendo amostras após serem incubadas com o substrato TMB, previamente a leitura da densidade óptica. Fonte: Gabriela Reis Ledur.

RESULTADOS

Os valores da mediana, percentis, mínimo e máximo da concentração plasmática de histamina nos grupos controle e cães com mastocitoma estão apresentados na tabela 1. Diferenças estatísticas significativas não foram observadas entre a concentração plasmática de histamina em cães com mastocitoma e nos cães do grupo controle.

Tabela 1. Valores da mediana, percentis e mínimo e máximo da concentração de histamina plasmática (ng/mL) dos cães com mastocitoma (n=40) e os cães do grupo controle (n=18).

Histamina Plasmática (ng/ml)	Controle	Cães com mastocitoma	P*
Mediana	0,0975	0,0160	
Percentil 25	0,0097	0,0003	0,055
Percentil 75	0,4644	0,1479	
Valor mínimo	Inferior ao limite de detecção do teste	> 0,02	
Valor máximo	1,7293	2,5675	

*Valor P obtido pelo teste de Mann-Whitney.

No grupo de cães com mastocitoma, também não foi observado associação entre a intensidade dos sinais clínicos, lesões gastroduodenais e os valores da concentração plasmática de histamina ($P>0,05$). Da mesma forma, não foi observado diferença estatística significativa nos valores plasmáticos da histamina entre os animais com ou sem lesão gastroduodenal ($P>0,05$). No entanto, em cinco cães (15,6%), foi constatado de forma simultânea a presença de sinais GI, lesões gastroduodenais e valores de histamina plasmática acima do valor da mediana dos cães do grupo controle.

CONCLUSÃO

Na população estudada, os sinais clínicos GI e as lesões gastroduodenais observados no momento do diagnóstico não apresentaram associação com os valores de histamina plasmática encontrados, sugerindo que outros fatores possam influenciar a degranulação dos mastócitos neoplásicos e, conseqüente aparecimento de lesões e sinais GI em cães com mastocitoma cutâneo.