

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

GREICE CESTARI HUETE

**Avaliação de macrófagos e eosinófilos associados ao tumor  
como fatores prognósticos em mastocitomas cutâneos caninos**

---

Pirassununga

2016

GREICE CESTARI HUETE

**Avaliação de macrófagos e eosinófilos associados ao tumor  
como fatores prognósticos em mastocitomas cutâneos caninos**

VERSÃO CORRIGIDA

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências do programa de pós-graduação em Biociência Animal.

Área de Concentração:  
Biociência Animal

Orientador:  
Prof. Dr. Ricardo de Francisco Strefezzi

---

Pirassununga

2016

Ficha catalográfica elaborada pelo  
Serviço de Biblioteca e Informação, FZEA/USP,  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Cestari Huete, Greice

C888a Avaliação de macrófagos e eosinófilos associados ao tumor como fatores prognósticos em mastocitomas cutâneos caninos / Greice Cestari Huete ; orientador Ricardo De Francisco Strefezzi. -- Pirassununga, 2016.

87 f.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal) -- Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo.

1. Mastocitoma cutâneo canino. 2. Macrófagos-associados ao tumor. 3. Eosinófilos. I. De Francisco Strefezzi, Ricardo, orient. II. Título.



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos  
Seção de Apoio Acadêmico

**Ofício SCAPACAD/CEP/FZEA/05/2016**

DSM/aas

Pirassununga, 15 de junho de 2016.

Senhor Pesquisador,

De acordo com documento encaminhado na data de 24 de março de 2016, este Comitê aprova a alteração de título do projeto referente ao processo nº **14.1.1421.74.9**, sob responsabilidade do Prof. Dr. Ricardo de Francisco Strefezzi, para: "**Avaliação de macrófagos e eosinófilos associados ao tumor como fatores prognósticos em mastocitomas cutâneos caninos**", considerando que não houve alterações no manejo e no protocolo previamente submetidos.

Respeitosamente,

**Profa. Dra. Daniele dos Santos Martins**

Presidente do CEP FZEA/USP  
junho/15 – junho/17

**Professor Doutor Ricardo de Francisco Strefezzi**

MD Representante Docente do ZMV - FZEA

## GREICE CESTARI HUETE

### Avaliação de macrófagos e eosinófilos associados ao tumor como fatores prognósticos em mastocitomas cutâneos caninos

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Biociência Animal

**Data de aprovação:** \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Banca Examinadora:

Prof. Dr.: \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr.: \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr.: \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais que sempre me apoiaram, incentivaram emocionalmente e espiritualmente, ajudando a superar as adversidades da vida, ensinando que tudo que fazemos na vida tem consequências e o resultado vem através de merecimento e gratidão!

A você querido sogro Fernando Huete (*in memoriam*), onde estiver, sei que estará feliz por mim, sempre se orgulhava em dizer que tinha a nora veterinária e sua felicidade sempre me enchia de orgulho. Onde estiver, receba esta dedicatória como uma homenagem por ser o meu 2º pai.

Ao meu marido Rodrigo, meu parceiro, amigo e companheiro! Este trabalho é para você, meu amor!

Aos animais que serão sempre a minha fonte inspiradora para mais e mais estudos, visando superar desafios e problemas. Que eu possa aprender sempre mais e mais... afim de dar uma melhor qualidade de vida a vocês!

## AGRADECIMENTOS

Ao prof. Dr. Ricardo De Francisco Strefezzi, pela oportunidade de conhecer um pouco mais sobre o mundo da patologia e pela ajuda durante a execução deste trabalho, que teve que mudar de rumo algumas vezes para finalmente chegarmos a versão final. Obrigada por todo ensinamento, atenção e ajuda, sem você não teria conseguido.

Agradeço imensamente a Deus por me permitir superar os obstáculos e adversidades, mas mantendo-me firme e forte para atingir o objetivo e chegar até o final do mestrado com gratidão por todo aprendizado que pude adquirir ao longo desse período.

Aos funcionários dos laboratórios Nilton e Arina pela ajuda durante a execução deste trabalho.

Ao meu marido Rodrigo, sempre com muita paciência e compreensão nos momentos de ausência, de mau humor, de viagens a Pirassununga, de noites mal dormidas, de torcida para “dar certo” a imunomarcção... te amo imensamente.

Aos meus colegas de trabalho, que não são colegas e sim amigos de trabalho do Provet: Karen, Tiago, Alessandra, Márcio, Márcia pela ajuda e apoio sempre que precisei. As funcionárias do Provet pela ajuda em remanejar a agenda por diversas vezes, por toda torcida para o sucesso deste trabalho.

Ao Rodrigo Ubukata, o meu “chefinho” e amigo que me incentivou demais na realização deste mestrado, sem o seu apoio e incentivo eu não teria conseguido.

A minha amiga Juliana Cirillo por toda ajuda, amizade, carinho e paciência durante este período de realização do mestrado, pelas “tiradinhas de dúvidas”, pela parceria de sempre: o meu muito obrigada! Você foi uma pessoa que me ajudou muito a ser quem eu sou e a crescer na Oncologia, sou muito grata mesmo, por tudo!

Especial agradecimento a minha querida amiga e parceira de mestrado Karine Germano por todo companheirismo, todo empenho pela realização deste trabalho, pelas viagens e noites juntas à Pirassununga, muitas conversas, desabafos, conquistas, tristezas, mas também felicidades vividas juntas durante esse período que levarei para o resto de minha vida.

Com muito carinho e gratidão, deixo registrado aqui o meu mais sincero obrigado a Lídia, a Camila e o Thiago pela ajuda e por toda experiência que tiveram comigo durante a realização deste trabalho. A experiência de vocês, as ideias, o incentivo, a ajuda na execução da Imunoistoquímica e a torcida para que “não marque” o negativo fez toda a diferença e sem isso não teria dado certo. Muito obrigada, de coração, por tudo!

Aos meus pais que sempre me incentivaram a conquistar meus objetivos, a estudar, a ser uma pessoa de bem, eu agradeço especialmente a você papai Luiz Carlos, um guerreiro, a pessoa que me ensina que todos os dias, temos que agradecer a Deus a oportunidade de estarmos vivos e com saúde! Seu exemplo de vida me faz viver e fortalecer a fé.

Aos animais, principalmente os cães e gatos, que carinhosamente chamo de “peludos”, que são a minha fonte de inspiração sempre! A vida sem esses peludos não teria a menor graça e é para lhes dar qualidade de vida que busco sempre algo novo e continuarei estudando sempre!



## **EPÍGRAFE**

**“Nós, seres humanos, estamos na natureza para auxiliar o progresso dos animais, na mesma proporção que os anjos estão para nos auxiliar.”**

**Chico Xavier**

## RESUMO

HUETE, G. C. **Avaliação de macrófagos e eosinófilos associados ao tumor como fatores prognósticos em mastocitomas cutâneos caninos.** [Tumor-associated macrophages and eosinophils evaluation as prognostic factors in canine mast cell tumors] 2016. 87 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2016.

O mastocitoma é a neoplasia cutânea mais comum em cães. Acredita-se que as células inflamatórias associadas ao tumor desempenham papéis importantes no comportamento biológico do mastocitoma. Este estudo teve como objetivo verificar a presença de macrófagos associados ao tumor (TAMs) e eosinófilos na região intratumoral e comparar à graduação histopatológica e à evolução clínica dos casos para avaliar se são marcadores prognósticos para MCTs cutâneos caninos. Foram avaliados 38 MCTs provenientes de 30 animais submetidos à cirurgia, sem nenhuma outra terapia complementar. Os tumores foram submetidos à análise imuno-histoquímica para detecção de CD68 e à contagem de eosinófilos em lâminas coradas por hematoxilina e eosina. Os resultados foram comparados à classificação histopatológica segundo os critérios de Patnaik et al. (1984) e Kiupel et al. (2011) e à sobrevida e mortalidade em função do tumor. O número de TAM detectado pela imunomarcagem de CD68 não apresentou diferenças significativas entre os graus histopatológicos, assim como não foi um indicador de mortalidade em função do tumor, nem para sobrevida, o mesmo sendo observado para a contagem de eosinófilos. Os números de TAMs e eosinófilos não apresentaram correlação. Nossos resultados sugerem que a presença de TAM e eosinófilos em MCTs cutâneos caninos não são bons indicadores prognósticos para esta doença.

Palavras-chave: Mastocitoma. Macrófagos associados ao tumor. Eosinófilos.

## ABSTRACT

HUETE, G. C. **Tumor-associated macrophages and eosinophils evaluation as prognostic factors in canine mast cell tumors.** [Avaliação de macrófagos e eosinófilos associados ao tumor como fatores prognósticos em mastocitomas cutâneos caninos] 2016. 87 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2016.

Mast cell tumors are the most common skin cancer in dogs. It is believed that tumor-associated inflammatory cells play important roles in biological behavior of this neoplasm. This study aimed to verify the presence of the tumor associated macrophages (TAMs) and eosinophils in the intratumoral region in comparison with the histopathologic grading and clinical evolution of cases in order to assess their prognostic value for canine cutaneous MCTs. Thirty-eight MCTs from 30 dogs treated by surgery with no complementary therapy were investigated. The tumors were submitted to immunohistochemical analysis for CD68 detection and eosinophil count on HE-stained slides. The results were compared with histopathological classification, according to the criteria of Patnaik et al. (1984) and Kiupel et al. (2011), and with survival and mortality due to the disease. The number of TAMs and eosinophils showed no significant differences between the histopathologic grades, as well as it was not a predictor of disease-related mortality or survival. The number of TAMs and eosinophil count showed no correlation. Our results suggest that the presence of TAMs and eosinophils in cutaneous canine MCTs are not good prognostic indicators for this disease.

Keywords: mast cell tumor. Tumor-associated macrophages. Eosinophils.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Fotomicrografia de MCT mostrando padrões de imunomarcção para CD68. .... 51
- Figura 2 - Curva de sobrevida de Kaplan-Meier para os pacientes estudados, em função da expressão imuno-histoquímica para CD68. .... 53
- Figura 3 - Curva de sobrevida dos pacientes estudados, em função da expressão imuno-histoquímica para CD68 com sobrevida >365 dias. .... 53
- Figura 4 - Gráfico representando a mortalidade relacionada ao tumor e o número de casos censurados (mortes não-relacionadas ao MCT e animais vivos ao final do estudo) em função da expressão de CD68. .... 54
- Figura 5 - Distribuição das contagens de eosinófilos em função da graduação segundo Patnaik et al. (1984). .... 55
- Figura 6 - Distribuição das contagens de eosinófilos em função da graduação de Kiupel et al. (2011). .... 55
- Figura 7 - Curva de sobrevida de Kaplan-Meier para os pacientes estudados, em função da contagem de eosinófilos, utilizando o valor de corte de 28,6 eosinófilos. .... 56
- Figura 8 - Gráfico representando a mortalidade em função do tumor e o número de casos censurados (mortes não-relacionadas ao MCT e animais vivos ao final do estudo) em função das contagens de eosinófilos. .... 57
- Figura 9 - Fotomicrografia de MCTs apresentando alta contagem de eosinófilos. .... 57
- Figura 10 - Fotomicrografia de MCTs apresentando baixa contagem de eosinófilos. .... 58

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição dos casos analisados em função da graduação histopatológica e escores para expressão de CD68.....52

Tabela 2 - Distribuição dos valores máximos, mínimos e médios para contagem de eosinófilos em função das graduações histopatológicas de Patnaik et al. (1984) e Kiupel et al. (2011)..... 54

## **LISTA DE QUADROS**

Quadro 1- Distribuição dos dados dos animais incluídos no estudo.....29

Quadro 2 - Estadiamento clínico do MCT segundo a OMS.....50

## SUMÁRIO

<b>1 – INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>2 – OBJETIVOS</b> .....	17
<b>3 – REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	18
3.1 – MASTÓCITOS .....	18
3.2 – MACRÓFAGOS .....	20
3.2.1 – Macrófagos associados ao tumor (TAM) .....	22
3.3 – EOSINÓFILOS .....	24
3.4 - MASTOCITOMA CANINO .....	25
3.4.1 – Apresentação Clínica .....	27
3.4.2 – Diagnóstico .....	28
3.4.3 – Classificação Histopatológica .....	30
3.4.4 – Comportamento biológico e Fatores prognósticos .....	31
3.4.5 – Tratamento .....	35
3.4.5.1 – Cirurgia .....	35
3.4.5.2 – Radioterapia .....	36
3.4.5.3 - Quimioterapia .....	37
3.4.5.4 – Inibidores de Tirosina Quinase .....	40
3.4.5.5 – Criocirurgia .....	42
3.4.5.6 – Braquiterapia intralesional .....	42
3.4.5.7 – Terapia fotodinâmica .....	43
3.4.5.8 – Eletroquimioterapia .....	43
<b>4 – MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	45
4.1 ANIMAIS .....	45
4.2 HISTOPATOLOGIA .....	46
4.3 CONTAGEM EOSINÓFILOS .....	46
4.4 IMUNO-HISTOQUÍMICA .....	46
4.4.1 Avaliação das imunomarcações .....	48
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	48
<b>5 – RESULTADOS</b> .....	49
5.1- AVALIAÇÃO DA POPULAÇÃO ESTUDADA .....	49
5.2 - AVALIAÇÃO DAS MARCAÇÕES IMUNO-HISTOQUÍMICAS .....	51
<b>6 – DISCUSSÃO</b> .....	59

<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>65</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>67</b>



## 1 – INTRODUÇÃO

As neoplasias em animais domésticos são as principais causas de óbito nos cães. Os tumores cutâneos e subcutâneos são muito comuns nesta espécie, representando um terço de todos os tumores. Dentre elas, o mastocitoma (MCT) é a neoplasia cutânea mais comum (WITHROW et al., 2013). Por apresentar comportamento biológico muito variável e possuir alta incidência, é considerada uma neoplasia de extrema importância na oncologia veterinária. O prognóstico de um cão com MCT relaciona-se a diversos fatores, dentre eles a classificação histológica, sendo este de extrema importância para o delineamento de tratamento e predição do potencial metastático de tal neoplasia (BINGLE, et al., 2006; WELLE, et al., 2008).

O infiltrado de células inflamatórias associadas ao tumor é extremamente importante no comportamento biológico de diversos tumores em humanos, podendo ser considerado tão importante quanto as características biológicas das próprias células tumorais (ISHIBASHI et al. 2006). Componentes do sistema imune desempenham papéis diferentes na resposta contra o desenvolvimento de tumores e a presença de infiltrado inflamatório peritumoral vem sendo alvo de estudos há anos (CLAUDATUS et al., 1986). As respostas imunológica e adaptativa peritumoral ajudam a estabelecer o prognóstico em determinados tipos de câncer. Dentre os leucócitos presentes no infiltrado inflamatório peritumoral, os macrófagos são os mais abundantes (HAGEMMAN et al., 2009).

Um aumento de infiltrado de macrófagos associados ao tumor (TAMs) em alguns tipos de câncer vem sendo associado a piores prognósticos. TAMs são associados a microambientes pró-inflamatórios e facilitam o desenvolvimento e proliferação do MCT canino. Esse estudo avaliará se a quantidade de TAMs no MCT canino correlaciona-se a um pior prognóstico.

Já um aumento do infiltrado de eosinófilos em diversos tipos de câncer em humanos vem sendo associado a comportamento biológico menos agressivo, com melhor prognóstico em câncer de mama, carcinoma gástrico, de cabeça e pescoço, além do carcinoma de células escamosas em região cervical

(LOWE et al., 1981; OHASHI et al., 2000; ISHIBASHI et al., 2006). Porém estudos indicando elevada quantidade de eosinófilos em carcinomas cervicais que tiveram fator prognóstico ruim com sobrevida global mais curta (DRIEL et al., 1996; DRIEL et al., 1999), sugerem resultados controversos, necessitando de estudos adicionais.

Apesar do papel importante desempenhado pelos macrófagos e eosinófilos, encontrados no ambiente peritumoral, na resposta inflamatória antitumoral, pela escassez de estudos na veterinária que avaliem a frequência de TAMs e eosinófilos associados ao tumor, pela extrema importância na rotina clínica do MCT e da interação de mastócitos com o processo inflamatório e o infiltrado inflamatório no comportamento biológico dos tumores, a proposta deste estudo é analisar essa relação em MCT canino a fim de predizer se são fatores prognósticos.

## **2 – OBJETIVO**

O objetivo deste estudo foi avaliar a frequência de TAMs e eosinófilos na região intratumoral de mastocitomas cutâneos caninos, comparando às diferentes graduações histopatológicas, à mortalidade relacionada ao tumor e à sobrevida, a fim de determinar se são marcadores prognósticos para mastocitomas cutâneos caninos.

### 3 – REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 – MASTÓCITOS

Em meados do século XIX, um mastócito foi observado pela primeira vez pelo Dr. Von Recklinghausen no mesentério de um sapo. No século XX reconheceu-se a importância dos mastócitos quando a histamina foi descoberta e o papel da imunoglobulina E (IgE) em reações anafiláticas foi demonstrado (FRENZEL, HERMINE, 2013).

Mastócitos são células derivadas de células precursoras pluripotentes (se originam de células tronco hematopoiéticas) derivadas de células progenitoras CD34 da medula óssea (KRISHNASWAMY, AJITAWI, CHI, 2006; WELLE, et al., 2008; FRENZEL, HERMINE, 2013) e expressam CD13, CD34 e CD117 (METCALFE, et al., 1997). Estas células são liberadas ainda imaturas na corrente sanguínea e se diferenciam conforme o microambiente ao infiltrarem o tecido conjuntivo ou a mucosa (METCALFE, et al., 1997; WELLE, et al., 2008). Os precursores dos mastócitos migram da circulação para os tecidos periféricos, onde expressarão seu fenótipo final sob a influência de estímulos de fatores de crescimento SCF e citocinas produzidas no local (IL-3, IL-4, IL-9 e IL-10) (METCALFE, et al., 1997). A maturação e diferenciação dependerão de estímulos de fatores de crescimento (SCF e da IL-3) os quais se ligarão a receptores específicos e desencadearão cascatas de ativação, vias bioquímicas e vias moleculares intracelulares (WELLE, et al., 2008). Algumas substâncias produzidas pelos mastócitos parecem promover uma interação com os eosinófilos: IL-5 (fator de crescimento e sobrevivência), CCL5 (RANTES) (molécula quimiotática), quimase (supressora de apoptose de eosinófilos), fator de necrose tumoral (sobrevivência e quimiotaxia), heparina (estabilizam eotaxinas) e kit que interage com o “*stem cell factor*” (SCF) derivado de eosinófilos para produzir diferenciação, proliferação e ativação de mastócitos (KOVALSZKI, WELLE 2014).

Mastócitos participam de mecanismos de defesa do organismo, em reações imunes locais, reações de hipersensibilidade imediata e tardia, reações inflamatórias, eliminação de parasitas e na imunidade inata contra infecções bacterianas e virais (KRISHNASWAMY, AJITAWI, CHI, 2006). Possui em seu citoplasma grânulos com substâncias biologicamente ativas como heparina, histamina, fator quimiotático para eosinófilos e enzimas proteolíticas (MISDORP, 2004). Um mastócito neoplásico contém 25 a 50 vezes mais histamina que um mastócito normal e os cães com MCT possuem um nível plasmático superior de histamina, além de diminuição nos níveis séricos de gastrina devido aumento na acidez gástrica (MACY, 1985; FOX et al., 1990). Essas concentrações de histamina e gastrina não tem valor prognóstico no MCT (THAMM; VAIL, 2007). A histamina quando liberada pelos mastócitos se liga a receptores H1 e H2 em macrófagos causando liberação do fator supressor de fibroblasto com diminuição da fibroplasia normal e retardo na cicatrização das feridas. A histamina também reduz a proliferação de queratinócitos e inibe a epitelização das lesões (THAMM; VAIL, 2007).

Os mastócitos são células redondas que possuem grânulos no citoplasma, sendo este levemente eosinofílico, com núcleo redondo basofílico, grande e centralizado (BANKS, 1991; METCALFE, et al., 1997). Devido ao tipo de conteúdo presente nos grânulos dos mastócitos eles não se coram bem pela hematoxilina e eosina e necessitam de corantes especiais como, por exemplo, o Azul de Toluidina que cora estruturas celulares ou extracelulares de violeta, ao invés de azul e esta propriedade tintorial é denominada metacromasia (YOUNG, et al., 2007). Em sua superfície, possuem receptores de alta afinidade a IgE (FcεRI), que, quando ligados a um antígeno, desencadeiam a liberação dos grânulos por exocitose, fenômeno conhecido como desgranulação (KRISHNASWAMY, AJITAWI, CHI, 2006).

Nos cães há maior quantidade de mastócitos na pele, pulmões, vísceras e fígado (MISDORP, 2004). As doenças relacionadas aos mastócitos em cães envolvem a hipersensibilidade do tipo I, local e sistêmica, e os mastocitomas (RECH, et al., 2004).

A proliferação de um mastócito é regulada principalmente pelo SCF, também conhecido como Fator de Crescimento para Mastócitos, que se liga ao

receptor tirosina-quinase KIT na membrana celular (FRENZEL, HERMINE, 2013). Além dos mastócitos, células hematopoiéticas, células germinativas e melanócitos expressam este receptor transmembrânico. O SCF promove diversos efeitos sobre os mastócitos como crescimento, proliferação, diferenciação, migração, supressão da apoptose, desgranulação e adesão a fibronectina (WELLE, et al., 2008; TAKEUCHI et al., 2013; WITHROW et al., 2013; PATRUNO, et al., 2014).

### 3.2 – MACRÓFAGOS

Macrófagos são células multifuncionais pertencentes ao sistema mononuclear fagocítico (BANKS, 1991). Originam-se de monócitos e sua função depende da localização anatômica e do contexto fisiológico (HAGEMANN et al., 2009). Há anos são consideradas células efetoras do sistema imune (MOSSER; EDWARDS, 2008). Possuem formato variado, podendo apresentar-se desde fusiformes a arredondadas ou ovais, sendo residentes no tecido conjuntivo (BANKS, 1991). São ricos em lisossomos e são responsáveis por fagocitar elementos estranhos ao organismo, tendo participação no remodelamento e reparo tecidual (HUPPES, 2013). Sua função não se restringe ao remodelamento de tecidos, os macrófagos também participam de processos inflamatórios e na imunidade, incluindo citotoxicidade e secreção de citocinas, fatores de crescimento, lisozimas, proteases componentes do complemento, fatores de coagulação e prostaglandinas (BANKS, 1991; BINGLE et al., 2002; MOSSER; EDWARDS, 2008).

Existem dois fenótipos de macrófagos que dependerão da via de ativação, receptores e citocinas produzidas: M1 e M2. Os macrófagos do tipo M1 são ativados por produtos microbianos ou IFN- $\gamma$  e são ativados pela via clássica, produzem citocinas pró-inflamatórias (IL-12, IL-23, IFN- $\gamma$ , IL-18 e TNF- $\alpha$ ) e tem função de fagocitose frente a estímulos de bactérias ou citocinas Th1. Os macrófagos M2 são ativados pela via alternativa, tem ação anti-inflamatória e exercem atividades imunossupressoras, com tropismo por citocinas Th2 (IL-10 e TGF- $\beta$ ) (MOSSER; EDWARDS, 2008; HAGEMANN et al., 2009; CAILLOU et

al., 2011; HUPPES, 2013). O grupo de macrófagos M2 é subdividido em M2a quando ativado por exposição a IL-4 e IL-13; M2b quando ocorre exposição combinada a imunocomplexos e agonistas de TLR; M2c quando é ativado por IL-10 (ONUCHIC; CHAMMAS, 2010).

Macrófagos podem ser encontrados no ambiente peritumoral, exercendo papel importante na resposta inflamatória antitumoral através da produção de fatores de crescimento como o TNF- $\alpha$  (mediador da citotoxicidade tumoral) e citocinas como IL-2, IL-12, IL-18 (estimulantes do sistema imunológico), porém também são responsáveis pela produção de fatores de crescimento e citocinas como o fator de crescimento fibroblástico-1, fator de crescimento derivado de plaquetas, IL-1, TGF- $\beta$  que promovem o crescimento do tumor (LI et al., 2002; BINGLE, et al., 2006; HAGEMANN et al., 2009).

As principais células encontradas num infiltrado inflamatório tumoral são: linfócitos T, linfócitos B, células NK, macrófagos e eosinófilos (CLAUDATUS et al., 1986). Citocinas quimiotáticas como proteína quimiotática para monócitos (MCP-1), fator estimulante de colônias de macrófagos (M-CSF) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) estimulam o recrutamento de monócitos para os tumores (BINGLE et al., 2002). A MCP-1 é expressa por células epiteliais tumorais, células endoteliais, fibroblastos e macrófagos em tumores humanos (GRAVES et al., 1989). Estudos avaliaram a expressão de MCP-1 em tumores humanos e sugerem que esta seja uma proteína pró-tumorigênica, desempenhando papel importante na angiogênese, e é significativamente correlacionada com níveis de fatores angiogênicos (VEGF, fosforilase timina (TP), fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) e interleucina-8 (IL-8), onde um aumento da expressão de MCP-1 e VEGF foram indicadores de recidiva precoce (BINGLE, 2002; HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Enzimas proteolíticas, como as metaloproteinases, podem ser secretadas pelos macrófagos que tem a capacidade de degradar a matriz extracelular, facilitando a disseminação de células tumorais e também secretar fatores angiogênicos (fator de crescimento endotelial vascular – VEGF e fosforilase timina) que facilitam crescimento, infiltração e metástase tumoral (BINGLE, 2002; RAPOSO et al., 2012; RIABOV et al., 2014). A collagenase (MMP-1),

gelatinase A (MMP-2), estromelina (MMP-3), matrilina (MMP-7), gelatinase B (MMP-9) e elastase de macrófagos (MMP-12) são as metaloproteinases expressas por células tumorais e fibroblastos do estroma de alguns de tipos de tumores. Aumentos na expressão de MMPs têm sido relacionados com a progressão tumoral, por permitirem aumento na angiogênese e degradação das membranas basais (BINGLE, 2002).

A formação de novos vasos sanguíneos e linfáticos ocorre através de mecanismos complexos que envolvem migração e proliferação de células endoteliais, degradação de matriz extracelular, produção de citocinas e fatores de crescimento para as células epiteliais e endoteliais através das células neoplásicas ou das células pertencentes àquele microambiente, as quais desempenham papel importante para o crescimento tumoral e das metástases (YUAN, et al., 2014). Os macrófagos e mastócitos desempenham papel importante na promoção da angiogênese e linfangiogênese. Os mastócitos estão envolvidos na angiogênese, principalmente em estágios iniciais da carcinogênese do câncer cervical em humanos (UTRERA-BARILLAS, et al., 2010).

### 3.2.1 – Macrófagos associados ao tumor (TAM)

No tecido tumoral, os macrófagos recebem o nome de macrófagos associados ao tumor (TAMs) e parecem ter diminuição da função imune e exacerbação da função trófica (ONUICHIC; CHAMMAS, 2010). Os TAMs são derivados de monócitos periféricos recrutados para o tumor, mas acredita-se em proliferação local de macrófagos (BINGLE et al., 2002). Originam-se a partir de monócitos circulantes sendo recrutados para o local do tumor e programados através de fatores derivados do tumor como Fator Estimulante de Colônia 1 (CSF-1), Fator de Crescimento Endotelial Vascular A (VEGF-A) e Quimiocina CC ligante 2 (CCL2) (RIABOV et al., 2014).

O papel dos TAMs no desenvolvimento tumoral é bastante estudado e, suas principais funções incluem crescimento, sobrevivência, invasão, metástase,



angiogênese e linfangiogênese (HAGEMANN et al., 2009; RIABOV, 2014). A formação de novos vasos (angiogênese) desempenha papel importante para o desenvolvimento das células tumorais. Macrófagos atraídos e reprogramados pelas células tumorais são responsáveis por produzir fatores que facilitam a angiogênese e o fator de crescimento que está mais envolvido na angiogênese tumoral que deriva dos TAMs é a VEGF-A (RIABOV et al., 2014). A participação dos macrófagos na progressão tumoral ainda não foi completamente elucidada, mas foi descoberta uma interação parácrina entre os TAMs e as células tumorais, onde os macrófagos perivasculares secretam fator de crescimento epidérmico (EGF) que é captado pelas células tumorais através do receptor de ECF (EGFR) e faz quimiotaxia até o vaso sanguíneo. As células neoplásicas então secretam CSF-1 atraindo macrófagos que produzirão mais ECF, fazendo esse ciclo parácrino (ONUCHIC; CHAMMAS, 2010). A produção pelos macrófagos de moléculas citotóxicas como TNF- $\alpha$ , óxido nítrico e espécies reativas ao oxigênio causam citotoxicidade direta as células tumorais, além de estimularem rápida resposta linfocitária através da apresentação de antígenos tumorais e produção de IL-12, ao mesmo tempo ocorre secreção de fatores de crescimento que promovem proliferação, invasão e metástase, vascularização tumoral (BINGLE et al., 2002; MURDOCH et al., 2004).

A alta densidade de macrófagos está relacionada a um prognóstico ruim em alguns tipos de câncer em humanos como no carcinoma endometrial (KÜBLER et al., 2014; RIABOV, 2014), tumores ovarianos (ORRE, ROGERS, 1999) e no câncer de mama (BINGLE et al., 2006; YUAN et al., 2014). Tumores de mama em humanos com alta expressão de TAM eram mais vascularizados e apresentaram maior metástase em linfonodos axilares do que os tumores com baixa expressão de TAM (BINGLE et al., 2006). Em outros estudos a infiltração de TAM não mostrou piora no prognóstico para o câncer de cólon e de mama (ZHOU et al., 2010; MAHMOUD et al., 2012). No câncer de próstata em humanos, o aumento de TAM não foi relacionado como um valor prognóstico independente (YURI et al., 2015). Os TAM são fontes de MMP-9 em cânceres de mama, de vesícula urinária e nos carcinomas ovarianos em humanos, tumores nos quais a expressão de MMP foi mais elevada do que nos tecidos normais (GOLLAPUDI et al., 2013). Como os macrófagos possuem a habilidade

de produzir e secretar as MMPs, é possível sugerir que os TAM aumentem o potencial invasivo e metastático de um tumor, em conjunto com as células epiteliais e do estroma tumoral (BINGLE, 2002). Estudos mostraram uma função dos TAM em tumores malignos que incluiu a produção de fatores pró-angiogênicos (liberação de citocinas IL-6, fatores de crescimento VEGF e proteínas de matriz extracelular MMPs), o que facilitaria a progressão tumoral (BINGLE et al., 2006; RIABOV, 2014).

### 3.3 – EOSINÓFILOS

Eosinófilos são células sanguíneas que se originam nos granulócitos, assim como os basófilos e neutrófilos. Possuem vida média curta, levando 2 a 6 dias para maturação na medula óssea, e duram 6 a 12 horas na circulação sanguínea, ficando ativas no tecido conjuntivo por mais alguns dias (STITES, 1994). Apresentam núcleo bilobulado e granulações ovoides, constituindo cerca de 3% dos leucócitos totais. Os grânulos citoplasmáticos são constituídos por peroxidase eosinofílica (EPO), proteína eosinofílica básica principal (MBP), proteína catiônica eosinofílica (ECP) e neurotoxina derivada de eosinófilos (EDN) (LINS et al., 2008). Na superfície dos eosinófilos há dois tipos de receptores de imunoglobulina, IgE e IgG, além de receptores de complemento que, em síndromes hipereosinofílicas, infecções por helmintos e atopia encontram-se aumentados, sugerindo a participação desses receptores na resposta inflamatória dos eosinófilos (STITES, 1994). Os eosinófilos fagocitam bactérias mais lentamente que os neutrófilos, tendo um poder de destruição pequeno (JUNQUEIRA E CARNEIRO, 2004). A diferenciação do granulócito em eosinófilo é estimulada pelo Fator Estimulador de Colônia de Granulócitos e Macrófagos (GM-CSF), IL-3 e IL-5 (Fator de Diferenciação de Eosinófilo) (SILVA, 2005). A IL-5 produzida pelos eosinófilos e também pelos mastócitos tem papel importante na atração dos eosinófilos para o local do tumor (RECH et al., 2004). A ativação dos eosinófilos pode ocorrer pelo endotélio vascular por meio de citocinas derivadas de linfócitos T (GM-CSF, IL-3 e IL-5) e citocinas derivadas de monócitos e macrófagos (IL-1 e TNF) (STITES, 1994).

Os eosinófilos produzem fatores angiogênicos como o VEGF, bFGF, TGF- $\alpha$  e TGF- $\beta$ , que parecem desempenhar papel importante na neovascularização tumoral, e estimulam a migração e proliferação de células endoteliais que agem indiretamente na matriz extracelular facilitando a progressão tumoral (TATAROGLU et al., 2004).

Em MCTs é possível identificar a presença de eosinófilos nas amostras histológicas e sua presença pode ser decorrente de respostas inflamatórias locais ou por quimiotaxia decorrente da liberação do conteúdo dos grânulos intracitoplasmáticos (BLACKWOOD et al., 2012). A presença de eosinófilos na amostra, principalmente em MCTs pouco diferenciados, pode ajudar a diferenciar de uma neoplasia de células redondas (RECH et al., 2004).

Estudos em carcinoma de células escamosas em humanos mostraram envolvimento de infiltrado de eosinófilos no comportamento biológico, especialmente nos casos envolvendo cabeça e pescoço (GOLDSMITH et al., 1992), em cavidade oral (DORTA et al., 2002) e esôfago (OHASHI et al., 2000; ISHIBASHI et al., 2006). Em contrapartida, outros estudos mostraram pior prognóstico relacionado ao infiltrado eosinofílico em CEC de colo uterino (DRIEL et al., 1996) e cavidade oral (HORIUCHI et al., 1993).

### 3.4 - MASTOCITOMA CANINO

O mastocitoma é a neoplasia cutânea mais comum nos cães, compreendendo de 16 a 20% dos casos de todas as neoplasias cutâneas (DALECK; DE NARDI; RODASKI, 2009; POGGIANI et al., 2012; WARLAND; DOBSON, 2013; WITHROW et al., 2013). Além da forma cutânea, podemos encontrar MCTs subcutâneos e viscerais (BLACKWOOD, et al., 2012).

A etiologia é desconhecida, porém alguns autores sugerem exposição a substâncias irritantes e doenças inflamatórias crônicas cutâneas como fatores predisponentes (DALECK, DE NARDI; RODASKI, 2009). Alterações no gene

supressor tumoral *TP53* foram identificados em alguns cães com MCT (WITHROW et al., 2013).

Estudos mais recentes mostram mutações no gene *KIT*, proto-oncogene que codifica o receptor tirosina-quinase KIT, particularmente no exon 11, incluindo diferentes pontos de mutação e duplicações tandem na região de codificação justamembranar (RECH, et al., 2004; WELLE, et al., 2008; PATRUNO, et al., 2014; BONKOBARA, 2015). Mutações também podem ocorrer nos exons 2, 6, 7, 8, 9, 15 e 17 (TAKEUCHI et al., 2013). A maior frequência, depois da mutação do exon 11, ocorre nos exons 8 e 9 (BONKOBARA, 2015). Essas mutações permitem uma ativação contínua do receptor KIT, que leva à desregulação da transdução de sinais deste receptor, propiciando proliferação e sobrevivência aberrante dos mastócitos. Esta alteração facilita o desenvolvimento do MCT, e é associada a maiores riscos de metástase e recorrência local, maior taxa de proliferação tumoral e localização aberrante do KIT (LETARD, et al. 2008; MARCONATO et al., 2014). As mutações de KIT ocorrem em 9 a 40% dos MCT caninos (ZEMKE et al., 2002; KIUPEL et al., 2004; MARCONATO et al., 2014; BONKOBARA, 2015). A expressão de KIT tem sido demonstrada em MCT canino e a localização citoplasmática aberrante, é associada a função desregulada do KIT (TAKEUCHI et al., 2013; WITHROW et al. 2013).

Alterações na expressão das proteínas p21 e p27, inibidoras de ciclinas dependentes de quinase também foram identificadas em alguns MCT caninos. Ausência da expressão de p27 indicou evento precoce da tumorigênese em MCT, já a alta expressão de p21 em MCT de grau III, associou-se a maior progressão tumoral (WU et al., 2004).

Não há predisposição sexual descrita para MCTs, com exceção de um estudo europeu em que as fêmeas apresentaram um melhor prognóstico, sugerindo que hormônios tenham impacto sobre o comportamento tumoral (GERRITSEN et al., 1998). Por outro lado, há predisposição racial, sendo mais comumente afetados os cães das raças Boxer, Boston Terrier, Bull Mastiff, Golden Retriever, Labrador Retriever, Pug, Rhodesian Ridgeback, Schnauzer, Sharpei, Staffordshire Bull Terrier, Vizsla e Weimaraner (WITHROW; VAIL, 2007;

STREFEZZI, et al., 2010; VILLAMIL et al. 2011; POGGIANI, et. Al, 2012; WARLAND; DOBSON, 2013; LEIDINGER et al., 2014). Em algumas raças há maior frequência de tumores de baixo grau, como o Pug e o Boxer (WARLAND; DOBSON, 2013), enquanto que Labrador Retriever e Golden Retriever desenvolvem tumores mais agressivos (LEIDINGER, et al., 2014).

A média de idade dos cães acometidos por MCT é de 9 anos, geralmente variando entre 8,2 a 10,5 anos (PATNAIK et al., 1984). Há relatos em animais jovens de 3 a 6 meses (WELLE, et al., 2008) ou idosos com 19 anos de idade (WITHROW; VAIL, 2007).

#### 3.4.1 – Apresentação Clínica

O MCT pode apresentar-se na forma cutânea como nódulo único ou múltiplo, na forma subcutânea ou na forma visceral, também conhecida como MCT sistêmico, esta última precedida por lesão primária agressiva (DALECK; DE NARDI; RODASKI, 2009; WITHROW et al. 2013).

O aspecto macroscópico das lesões é bastante variável, podendo ser massas grandes ou pequenas, consistência macia ou firme, alopecia, eritema, ulceração, ser aderido ou não a planos profundos, com limites circunscritos ou com invasão de estruturas adjacentes (WITHROW; VAIL, 2007; DALECK; DE NARDI; RODASKI, 2009).

A aparência pode relacionar-se ao grau histológico. Tumores de baixo grau e bem diferenciados tendem a ser macios, nódulos únicos de 1 a 4 cm de diâmetro, com crescimento lento, e estão presentes há mais de 6 meses do diagnóstico. Geralmente são alopécicos e não-ulcerados. (WELLE et al., 2008; WITHROW et al. 2013). MCTs pouco diferenciados crescem rápido, ulceram, causam inflamação local e podem dar origem a pequenos nódulos ao redor da formação principal, denominados nódulos satélite. Geralmente os MCTs não são pigmentados, podem apresentar eritema e hiperpigmentação (WELLE, et al., 2008).

A maioria dos cães apresenta lesões cutâneas únicas, porém múltiplas lesões são descritas em 11 a 14% dos cães com MCT (WITHROW et al., 2013).

As raças Boxer, Pug, Weimaraner, Golden Retriever e Shar Pei são reportadas como mais frequentemente associadas a tumores múltiplos (MURPHY et al., 2006; WELLE, et al., 2008).

MCT ocorre com maior incidência em região inguinal/perineal, tórax, abdômen (50%), extremidades/membros (40%), cabeça e pescoço (10%) . (PATNAIK; EHLER; MACEWEN, 1984; WELLE et al., 2008; NORTH; BANKS, 2009; STREFEZZI, 2009; WITHROW et al., 2013). Há relatos de MCT em locais extracutâneos como conjuntiva, nasofaringe, laringe, glândula salivar, cavidade oral, ureter e medular espinal (WELLE, et al., 2008; WITHROW et al., 2013).

### 3.4.2 – Diagnóstico

O diagnóstico de MCT pode ser obtido através de citologia por agulha fina, pois as neoplasias de células redondas esfoliam facilmente durante a coleta. Era considerado um exame de triagem por não permitir gradação tumoral (STREFEZZI et al., 2003; STREFEZZI et al., 2009), porém estudos recentes propuseram critérios visando classificação do MCT de acordo com a morfologia encontrada, além da quantidade de grânulos citoplasmáticos: MCT bem diferenciado (anisocitose, anisocariose e pleomorfismo discreto, amostra é hiper celular; MCT moderadamente diferenciado (anisocitose, anisocariose, pleomorfismo, figuras atípicas moderados, com aumento da relação núcleo-citoplasma e amostra também hiper celular); MCT pouco diferenciado (anisocitose, anisocariose e pleomorfismo acentuados, com aumento da relação núcleo-citoplasma, elevadas figuras de mitose atípicas e células multinucleadas) (PEDRAZA et al., 2011; SCARPA et al., 2014; CAMUS et al., 2016).

O exame citológico é considerado simples, de baixo custo e possui alta taxa de acerto, que varia de 92 a 96% para MCT (WELLE, et al., 2008; BLACKWOOD, et al., 2012;). Citologicamente os MCTs são compostos por células redondas a ovais, núcleos ovoides ou redondos, moderada quantidade de citoplasma contendo grânulos basofílicos finos a grosseiros em número e tamanho variável (WELLE et al., 2008; HOSSEINI et al., 2014). A identificação dos grânulos intracitoplasmáticos é mais facilmente visualizada quando são usados corantes específicos como os de Romanowsky ou Azul de metileno

(BLACKWOOD, et al., 2012; JACKSON, et al., 2013). A coloração pode variar pelo grau de diferenciação da célula neoplásica onde, MCTs pouco diferenciados apresentam menor quantidade de heparina e outros glicosaminoglicanos, que interagem com os corantes histoquímicos, por isso faz-se necessário em alguns casos uso de outras colorações, como Azul de Toluidina, Giemsa, ou Wright-Giemsa para evidenciar os grânulos que ficarão azulados ou arroxeados (CANNAS, et al., 1994 WELLE, et al., 2008).

O diagnóstico final e a correta graduação de um MCT deve ser realizada por histopatologia (STREFEZZI, et al., 2009). A classificação ocorrerá conforme grau de diferenciação celular, natureza do estroma produzido pelas células neoplásicas, extensão da neoplasia, presença de necrose e/ou hemorragia e índice mitótico (PATNAIK et al., 1984; WELLE, et al., 2008; DALECK, DE NARDI, RODASKI, 2009; KIUPEL et al., 2011).

O estadiamento clínico permite uma avaliação correta da localização do tumor, se há metástase em linfonodo e/ou à distância, contribuindo com a definição do tratamento apropriado e determinação do prognóstico (DALECK, DE NARDI, RODASKI, 2009; STREFEZZI et al., 2009). A Organização Mundial de Saúde (OMS) propõe o sistema descrito no Quadro 1 (WELLE et al., 2008; WITHROW et al., 2013). Avalia-se número de formações, se houve ou não comprometimento do linfonodo sentinela, e se há metástase a distância (WELLE et al., 2008).

QUADRO 1 – Estadiamento clínico do MCT segundo a OMS

<b>Estadiamento</b>	<b>Descrição</b>
0	Tumor único, incompletamente excisado da derme, sem envolvimento de linfonodo regional. a) Sem sinais clínicos b) Com sinais clínicos
I	Tumor único confinado a derme, sem envolvimento de linfonodo regional. a) Sem sinais clínicos b) Com sinais clínicos
II	Tumor único confinado a derme, com envolvimento de linfonodo regional. a) Sem sinais clínicos b) Com sinais clínicos
III	Tumor múltiplo ou amplamente infiltrado, com ou sem envolvimento de linfonodo regional. a) Sem sinais clínicos b) Com sinais clínicos
IV	Qualquer tumor com metástase a distância, ou recidiva com metástase, incluindo envolvimento sanguíneo ou medular.

FONTE: WELLE et al., 2008

### 3.4.3 – Classificação Histopatológica

Três sistemas de graduação histológica para MCT foram desenvolvidos, sendo o primeiro proposto por Bostock em 1973, o segundo por Patnaik em 1984 e o mais recente, e terceiro por Kiupel em 2011. A proposta de classificação mais utilizada até 2011 era a de PATNAIK et al. (1984), que gradua os MCTs cutâneos em três graus. Em 2011 foi proposta uma nova graduação, mais simples, sendo usados apenas dois graus: baixo ou alto (KIUPEL et al., 2011).

A graduação de Patnaik et al. (1984) divide o MCT em três graus baseado em critérios da morfologia celular:

- MCT de Grau I ou bem diferenciado: mastócitos neoplásicos geralmente são uniformes, ovoides a arredondados, arranjados em cordões ou grupos. Os núcleos são excêntricos ao citoplasma e a cromatina é densa. Citoplasma abundante, bem delimitado, com muitos grânulos intracitoplasmáticos. As figuras de mitose estão ausentes. Eosinófilos podem ser observados, e as células neoplásicas estão restritas à derme e espaços interfoliculares. Não apresenta necrose e/ou hemorragia.
- MCT de Grau II ou moderadamente diferenciado: celularidade moderada a elevada, com mastócitos moderadamente pleomórficos, com variação no formato e tamanho, arranjados em grupos. Os núcleos são maiores e vesiculosos, eventualmente exibem células gigantes, com citoplasma finamente granular. Figuras de mitose ocorrem com certa frequência, de 0 a 2 figuras de mitose por campo de maior aumento. Células neoplásicas estendem-se à derme e subcutâneo. Áreas de edema, necrose e estroma fibrocolagenoso é abundante e com áreas de hialinização.
- MCT de grau III, indiferenciado ou pouco diferenciado: altamente celular, com mastócitos com alto grau de anaplasia, pleomórficos, arranjados na forma de lençóis ou grupos compactos que invadem tecido subcutâneo e tecidos mais profundos. Células neoplásicas apresentam nucléolos altamente vesiculosos e com tamanhos variados. Citoplasma não apresenta boa delimitação e os grânulos são escassos ou ausentes. Figuras de mitose frequentes, podendo ser atípicas. O estroma apresenta



escassa quantidade de colágeno e eosinófilos, exibindo hemorragia, edema e necrose.

O sistema de Patnaik é baseado em critérios subjetivos e isso provoca variações entre observadores, diminuindo a confiabilidade nesse sistema de classificação (STREFEZZI et al., 2003; KIUPEL et al., 2011). Esta discordância foi avaliada em um estudo onde 10 patologistas graduaram 60 MCT. Os autores observaram concordância em apenas entre 7% dos patologistas (NORTHUP, et al., 2005). Para reduzir essa discordância dos patologistas e proporcionar um diagnóstico mais preciso, com melhora no valor prognóstico, a graduação proposta por Kiupel et al. (2011) propôs apenas dois graus: alto e baixo grau. O MCT é considerado de alto grau se apresentar pelo menos uma dessas características: 7 ou mais figuras de mitose em 10 campos de maior aumento; 3 ou mais células multinucleadas em 10 campos de maior aumento (com alto grau de atipia e indentações, formato irregular); 3 ou mais núcleos bizarros (núcleos acentuadamente pleomórficos); cariomegalia em no mínimo 10% das células neoplásicas.

Estudos recentes compararam os dois sistemas de classificação histológica (Patnaik e Kiupel) e os resultados obtidos sugerem que a classificação de Kiupel é mais eficaz em prever o desenvolvimento de metástase e óbito, porém a graduação histológica não deve avaliada isoladamente, é preciso considerar estadiamento clínico e outros métodos moleculares de diagnóstico (SABATTINI et al., 2015; STEFANELLO et al., 2015).

#### 3.4.4 – Comportamento biológico e fatores prognósticos

O comportamento biológico do MCT canino é muito variável. Muitos fatores são descritos na literatura com informações que ajudam a estabelecer um prognóstico mais confiável, porém nenhum deles, quando analisado isoladamente, caracteriza esse comportamento ou a resposta a um tratamento (WELLE et al., 2008; TAKEUCHI et al., 2013).

A graduação histopatológica tem sido a ferramenta mais utilizada para avaliar o comportamento biológico, determinar um prognóstico e definir uma opção terapêutica (FINORA, et al., 2006; KIUPEL, et al., 2011), porém outros

fatores prognósticos devem ser considerados, como estadiamento clínico, localização anatômica, taxa de crescimento tumoral, raça, presença de sinais sistêmicos paraneoplásicos, recidiva tumoral, idade, tamanho do tumor, ploidia de DNA, densidade microvascular e mutação do c-kit (WELLE, et al., 2008; TAKEUCHI et al., 2013; STREFEZZI, et al., 2010; LELYVELD, et al., 2015).

A localização do MCT pode predizer um pior prognóstico quando está no focinho, cavidade oral, região inguinal, prepúcio, períneo ou áreas mucocutâneas (WELLE, et al., 2008; WITHROW et al., 2013).

MCT ulcerados, com eritema ou prurido, ou animais que apresentem sinais sistêmicos como melena, êmese, anorexia, eritema generalizado, edema, úlcera gastrointestinal são associados a pior prognóstico (WELLE, et al., 2008). Sinais clínicos decorrentes da desgranulação de mastócitos podem ocorrer de forma espontânea ou por manipulação excessiva do tumor durante o exame físico, citológico ou durante excisão cirúrgica e relacionam-se a liberação de histamina, heparina, fator quimiotático para eosinófilo e enzimas proteolíticas (WELLE, et al., 2008; BLACKWOOD, et al., 2012). Variam desde eritema e formação de pápulas ao redor do MCT, na pele (Sinal de Darier), até ocorrência de retardo na cicatrização, úlceras gastrointestinais e choque anafilático (WELLE et al., 2008; WITHROW et al., 2013).

Em algumas raças, o MCT pode ter um prognóstico mais favorável, como no caso dos Boxers (WELLE, et al., 2008) e dos Pugs (Mc NIEL, et al., 2004) ou um prognóstico desfavorável, um comportamento mais agressivo, como no caso dos Labradores e dos Shar Peis (MURPHY et al., 2006).

Marcadores histo e imuno-histoquímicos que avaliam a atividade proliferativa celular visam obter um prognóstico mais confiável. Resultados têm sido obtidos com a contagem de mitoses (ROMANSIK et al., 2007), contagem de AgNORs (Regiões Organizadoras Nucleolares com afinidade pela prata) (BOSTOCK et al., 1989; KRAVIS, et al., 1996); PCNA (Antígeno Nuclear de Proliferação Celular) (ABADIE, et al, 1999); e Ki67 (antígeno relacionado ao RNA nucleolar que associa expressão durante o ciclo celular, desde G1 até Mitose) (SAKAI, et al, 2002).

O índice mitótico (IM) é avaliado pela contagem do número de mitoses em 10 campos de maior aumento, observado através do exame histopatológico

(WELLE et al., 2008; VASCELLARI et al., 2013). Tem sido considerado um bom indicador prognóstico em diversos tumores em cães, como carcinoma renal, sarcoma de tecidos moles e MCT (ROMANSIK et al., 2007; DENNIS et al., 2011; COYLE et al., 2013; EDMONDSON et al., 2014; KANDEFER-GOLA et al., 2015). O IM em MCT canino possui relação direta com a graduação proposta por Patnaik et al. (1984) e, os cães com  $IM < 5$  apresentam um maior tempo de sobrevida (70 meses), quando comparados ao cães com  $IM > 5$  (2 meses) (ROMANSIK et al., 2007). O IM fornece um parâmetro prognóstico de proliferação muito bom, podendo ser comparado a alguns marcadores imuno-histoquímicos (KANDEFER-GOLA et al., 2015).

PCNA é uma proteína nuclear não-histona envolvida na replicação do DNA que desempenha papel importante na iniciação da proliferação celular pelo aumento da DNA polimerase. Possui meia-vida longa e esta envolvida em vários processos nucleares (WEBSTER et al., 2007; STREFEZZI et al., 2009). No MCT apresentou alta expressão em tumores recorrentes e metastáticos, porém a sua expressão não depende de grau histológico (WEBSTER et al., 2007; WELLE et al., 2008; BLACKWOOD et al., 2012). Estudos apontam que não possui valor prognóstico estatístico quando usado isoladamente (ABADIE et al., 1990; WELLE et al., 2008).

A avaliação quantitativa de AgNOR é útil para marcar o DNA ribossomal e seu nível de transcrição, o que permite uma visualização na variação no tamanho de nucléolos e número de pontos corados pela prata, e quanto maior o número de AgNOR por núcleo, pior prognóstico, pois indica uma maior proliferação celular, estando associada a maior mortalidade, recorrência local e metástase (RECH, et al., 2004; WELLE, et al., 2008). Alguns estudos em MCTs mostraram que contagens elevadas de AgNOR estão associadas a aumento de mortalidade, recorrência local e metástase (BOSTOCK et al., 1989; SCASE et al., 2006; WEBSTER et al., 2007).

O gene supressor tumoral *TP53* desempenha importante função no controle do ciclo celular, na manutenção da estabilidade genômica e na morte celular por apoptose. A mutação do *TP53* em MCTs cutâneos caninos foi avaliada, e os resultados mostraram diferença significativa na porcentagem de células positivas para TP53 de acordo com graduação histológica, sendo os MCT

de grau III os mais marcados, mas sem valor prognóstico em relação a tempo livre de doença e sobrevida (JAFFE et al. 2000). A expressão da proteína p53 foi avaliada juntamente com a expressão da proteína MDM2 em MCTs cutâneos caninos, e mostrou-se superexpressa, nos MCT de grau III, com moderada à marcada reatividade nuclear, sugerindo que a expressão desta proteína correlaciona-se ao grau histológico da neoplasia e pode exercer um papel na carcinogênese do MCT canino. Uma correlação entre MDM2 e TP53 não foi identificada, sugerindo uma regulação independente do TP53 (WU et al., 2006).

Ki67 é uma proteína nuclear expressa em praticamente todas as fases do ciclo celular e possui uma meia-vida curta (MUKARATIRWA, 2005; BLACKWOOD et al., 2012). Sua importância como fator prognóstico tem sido demonstrada em diversas neoplasias de cães, como no MCT, no melanoma oral, tumores mamários e tumores de glândula perianal (BERGIN, et al., 2011; PEREIRA et al., 2013; SANTOS et al., 2013; LELYVELD et al., 2015). É um marcador imuno-histoquímico e sua determinação é obtida pela contagem ou porcentagem de células positivas marcadas, onde uma alta expressão é associada a aumento na mortalidade, maior índice de recidiva e metástase (WEBSTER et al., 2008; POGGIANI et al., 2012). Estudos também mostraram que animais que tiveram contagens de Ki67 maior que 23 apresentaram maior índice de metástase, recidiva e mortalidade (WEBSTER et al., 2008). Outro estudo analisou 163 cães onde apenas casos de MCT de grau II foram incluídos, e os cães com índice superior a 1,8% tiveram sobrevida menor em relação aos casos com Ki67 menor que 1,8% (MAGLENNON et al. 2008). Em cães com menos de 7% de células positivas para Ki67 houve maior sobrevida em comparação aos que tiveram mais que 7% (STREFEZZI et al., 2010). O valor de corte 1,8% utilizado no estudo de Maglennon et al. (2008) teve como objetivo maximizar a especificidade do índice de Ki67, minimizando o número de falsos negativos.

Dos marcadores de proliferação citados, o índice mitótico e o Ki67 são os que demonstraram ter maior valor prognóstico (WEBSTER et al., 2008; POGGIANI, et al., 2012; VASCELLARI et al., 2013). Lelyveld et al. (2015) concluíram que o índice mitótico é um marcador menos sensível e mais

específico, já o Ki67 é mais sensível, porém menos específico ao predizer óbito em cães com MCT.

O padrão de expressão do KIT também é considerado fator prognóstico em MCT, tendo três localizações descritas: membranosas, citoplasmática difusa e citoplasmática focal (POGGIANI et al., 2012). Cães com MCT com localização do KIT citoplasmática focal ou difusa são associados a um pior prognóstico (WEBSTER et al., 2007; WELLE et al., 2008; POGGIANI et al., 2012; TAKEUCHI et al., 2013; FONSECA-ALVES et al., 2015).

Para cães com MCT canino de baixo grau (Kiupel) ou de grau II (Patnaik), visando o planejamento terapêutico, recomenda-se que o painel inclua marcadores prognósticos como o Ki67 (marcador de proliferação celular) utilizando como ponto de corte 23, avaliação da expressão da proteína KIT e presença ou ausência de mutação do gene c-kit para risco de metástase (WEBSTER et al., 2008; KIUPEL et al., 2011).

#### 3.4.5 – Tratamento

O tratamento de eleição do MCT é a excisão cirúrgica, mas existem outras terapias que podem ser utilizadas em associação a cirurgia e incluem radioterapia, quimioterapia, inibidores de tirosina-quinase, criocirurgia, braquiterapia intralesional, terapia fotodinâmica ou eletroquimioterapia (FRIMBERGER et al., 1998; NORTHROP et al., 2004; WELLE et al., 2008). O planejamento terapêutico depende de fatores prognósticos, como apresentação clínica, localização, tamanho do tumor, raça e índices de proliferação (IM, AgNOR, PCNA, Ki67) (GRANT et al., 2008; WELLE et al., 2008). Associação de quimioterapia ao tratamento cirúrgico deve ser considerada para MCT com alto risco de metástase (MILLER et al., 2014).

##### 3.4.5.1 – Cirurgia

A remoção cirúrgica é o tratamento mais indicado para MCTs localizados e não metastáticos, sendo necessária uma margem de segurança de 3 cm ao redor de todo o tumor, incluindo margem profunda, que pode incluir a exérese de um plano fascial (MULLER et al., 2005; BLACKWOOD et al., 2012; WITHROW et al., 2013; RISSELADA et al., 2015). Quando a margem de segurança não pode ser atingida, devido localização tumoral de difícil ressecção, como extremidade de membro e cabeça, deve-se optar por cirurgias radicais (amputação do membro), para obter margens livres, inclusive as profundas (DALECK, DE NARDI, RODASKI, 2009).

Durante a manipulação cirúrgica pode ocorrer desgranulação de mastócitos, e, principalmente nos tumores mais volumosos, é recomendado uso de bloqueadores de H1 e H2 para reduzir os riscos de efeitos locais e sistêmicos (BLACKWOOD et al., 2012).

O grau histológico é a variável que mais interfere quanto ao risco de recidiva tumoral, mesmo com completa remoção da margem de segurança (RISSELADA et al., 2015).

#### 3.4.5.2 – Radioterapia

A radioterapia (RT) é um tratamento que emprega feixes de radiações ionizantes que objetiva destruir as células tumorais, com pouco dano aos tecidos vizinhos sadios. Atinge o DNA das células, provocando modificações nos cromossomos das células em mitose, induzindo a apoptose (SALGADO, 2012).

A radioterapia em cães com MCT pode ser indicada quando houver excisão incompleta do tumor, como tratamento complementar ou em casos onde houve recidiva e uma nova cirurgia não é possível (BLACKWOOD et al., 2012; WITHROW et al., 2013). RT pode usada para controle local da doença ou de metástase regional. Para redução de grandes tumores pode-se utilizar a RT em baixas doses de 40-45 Gy visando a citorredução. Em tumores muito volumosos,

a RT com protocolos hipofracionados consegue manter doença estável durante 1 ano em 44 a 78% dos casos (WELLE et al., 2008).

Em cães com MCT inoperáveis ou de alto grau a RT paliativa também pode ser utilizada, resultando em uma melhora de qualidade de vida, mas sem aumento de sobrevida (DALECK, DE NARDI, RODASKI, 2009). A desgranulação de mastócitos além da presença de células tumorais radorresistentes em tumores volumosos, são possíveis complicações desta terapia (BLACKWOOD et al, 2012).

Em MCTs de grau I e II cuja cirurgia deixa margem comprometida, a RT é bastante efetiva (DALECK, DE NARDI, RODASKI, 2009). Em um estudo com 45 cães que apresentam MCT grau II com cirurgia incompleta, foi realizada RT com Cobalto 60 (15 frações de 3,2 Gy), destes, 26 cães apresentaram doença estável, 3 tiveram progressão da doença, 2 desenvolveram metástase à distância e 14 apresentaram novo MCT cutâneo, mostrando um bom controle local da doença (POIRIER et al., 2006). Um estudo com 35 animais com MCT em membros ou cabeça, administrou-se prednisolona por via oral na dose de 40mg/m<sup>2</sup> por 14 dias antes da RT e, após RT, a dose foi reduzida para 20mg/m<sup>2</sup> diariamente. Os animais receberam 4 sessões de RT de 8 Gy num aparelho acelerador linear, com intervalos de 7 dias. Doze animais apresentaram remissão completa, 19 remissão parcial, 2 tiveram doença estável e apenas 2 doença progressiva. O intervalo livre de doença foi de 1031 dias, podendo-se concluir que a associação de prednisolona à RT foi eficaz no controle de MCT inoperáveis (DOBSON et al., 2004).

Uma nova cirurgia com ampliação das margens é o tratamento mais indicado para casos de ressecção incompleta do tumor, mas nem sempre é possível e a RT pode ser usada como tratamento complementar, além de outras terapias adjuvantes descritas a seguir (WELLE et al., 2008; BLACKWOOD et al., 2012).

#### 3.4.5.3 - Quimioterapia

A quimioterapia é indicada para casos de MCT canino de alto grau, para tumores não-ressecáveis, para doenças em estágio clínico avançado, que

apresentem um fenótipo agressivo, para MCT sistêmicos, para MCT com marcadores de proliferação que sugerem alto risco ou para citorredução de tumores volumosos (MULLER et al., 2005; GRANT et al., 2008; WELLE et al., 2008; DALECK, DE NARDI, RODASKI, 2009; MILLER et al., 2014; RISSELADA et al., 2015).

Os fármacos mais utilizados no tratamento de MCT são: prednisona, vimblastina, lomustina e clorambucil (WITHROW et al., 2013).

A prednisona, um glicocorticoide que induz a morte celular por interagir com o receptor glicocorticoide e consequente apoptose, pode ser usado em cães com MCT como agente único ou em combinação com quimioterápicos, tendo a capacidade de reduzir o número de mastócitos no tumor promovendo alterações citoplasmáticas de vacuolização e aglutinação dos grânulos das células (DALECK et al., 2009; WITHROW et al., 2013). A dose recomendada varia de 1,0 a 2,2 mg/kg diariamente, por períodos pré-determinados e, quando usado como agente único observa-se resposta de 20% a 70% com curta duração (MCCAW et al., 1994; DOBSON et al., 2004; THAMM, TUREK, VAIL, 2006).

A vimblastina é um alcaloide extraído da Vinca Rósea que se liga à tubulina, inibindo a polimerização dos microtúbulos levando à parada na metáfase e citotoxicidade. Entra na célula por difusão simples, distribuindo-se rapidamente para os tecidos, é metabolizada no fígado, tem excreção biliar e secundariamente urinária (10 a 20%) (DE NARDI, ROSAKI, 2009; WITHROW et al., 2013). Animais com MCT graus II e III receberam 8 sessões de quimioterapia com vimblastina na dose de 2 mg/m<sup>2</sup> (4 doses semanais e 4 quinzenais) e prednisona até a 26<sup>a</sup> semana, após excisão cirúrgica com ou sem RT e 65% dos cães estavam vivos após 3 anos, com intervalo livre de doença de 1305 dias, mostrando um bom resultado do uso da quimioterapia nos cães com alto risco de metástase (THAMM, TUREK, VAIL; 2006). Vimblastina com prednisona promove taxa de resposta de 47% (GRANT et al., 2008). Em outro estudo com cães com MCT grau II que foram submetidos a cirurgia e apresentavam alto índice de Ki-67, sem metástase a distância, comparou-se o uso de masitinib com o uso de vimblastina com prednisona, e a maior taxa de sobrevida foi encontrada nos cães tratados com vimblastina e prednisona (MILLER et al., 2014).



A lomustina, 1-(2-cloroetil)-3-ciclohexil-1-nitrosuréia (CCNU) é um agente alquilante, da subclasse da nitrosureia, cuja administração é pela via oral e possui indicação para diversos tipos de câncer em humanos (tumor cerebral, doença de Hodgkin avançada, melanoma, câncer colorretal) (TEICHER, 1997). Suas principais indicações em cães incluem tumores cerebrais, linfoma, linfoma epiteliotrópico, MCT e sarcoma histiocítico (HEADING et al., 2011). A lomustina é hidroxilada intracelularmente pelas enzimas hepáticas microssomais do citocromo P450 para formar uma molécula alquilante. A degradação em metabólitos hidroxilados é rápida, com picos de concentração em 3-4 horas em humanos, apresenta alta solubilidade em lipídeos, com rápida distribuição para os tecidos e com capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica (HEADING et al., 2011). A via de excreção dos metabólitos é renal (50% da dose é encontrada na urina em 24 horas e 75% após 4 dias) mas também apresenta excreção biliar e circulação entero-hepática (DA SILVA, 2014). O uso da lomustina como terapia em MCT de grau II com exérese incompleta foi estudado por HOSOYA et al. (2009) e mostrou-se como uma boa terapia adjuvante, pois 77% dos cães apresentaram 2 anos sem progressão da doença. O uso como agente único de CCNU tem taxa de resposta de 42% em cães com MCT mensurável (RASSNICK et al., 1999). Uma associação de prednisona, vimblastina e lomustina resultou em taxa de resposta de 83% em cães com MCT com duração média de 10 meses (GRANT et al., 2008).

A vinorelbina é um alcaloide da vinca semissintético, derivado da vimblastina que vem sendo usada em alguns tipos de câncer em cães, inclusive o MCT, onde a dose recomendada é de 15 mg/m<sup>2</sup>, cujo principal efeito colateral é neutropenia dose-limitante. Em um estudo com 24 cães com MCT mensurável, a taxa de resposta encontrada com uso de vinorelbina como agente único foi de 13%, sugerindo que a atividade antitumoral pode ser superior quando associada a outros quimioterápicos no tratamento do MCT (GRANT et al., 2008).

O clorambucil é um agente alquilante derivado da mostarda nitrogenada que interfere na síntese de DNA, e é ciclo celular não específico, entrando nas células por difusão passiva (RODASKI, DE NARDI; 2008; WITHROW et al., 2013). Possui rápida absorção, metabolismo é hepático e os metabólitos são excretados via renal (RODASKI, DE NARDI; 2008). O uso do clorambucil na

dose de 5 mg/m<sup>2</sup> em dias alternados com prednisolona na dose de 20 a 40 mg/m<sup>2</sup> em 21 cães com MCT mostrou uma taxa de resposta completa em 14% dos casos, resposta parcial em 24% e taxa de resposta global de 38%. A duração média de resposta foi de 538 dias, com a vantagem de ser um protocolo com mínima toxicidade (TAYLOR et al., 2009).

#### 3.4.5.4 – Inibidores de Tirosina Quinase

Os receptores tirosina-quinase são receptores presentes na superfície do mastócito que desencadeiam a ativação celular com consequente proliferação, diferenciação e sobrevivência celular quando ativados por seu ligante. Mutações ou disfunções nesses receptores são associados a alguns tipos de câncer, incluindo o MCT canino onde 15 a 40% dos casos apresentam mutações no receptor KIT, o que confere pior prognóstico (WEBSTER et al., 2007). Mutações são encontradas em cerca de 30% dos MCT caninos de Grau II e III (BLACKWOOD et al., 2012). As alterações podem ocorrer pela superexpressão, mutação, translocação do cromossomo ou sinalização autócrina (BLACKWOOD et al., 2012; TAKEUCHI et al., 2013).

Os inibidores de tirosina quinase (TKIs) são pequenas moléculas inibidoras da tirosina-quinase que se ligam de maneira reversível ou não ao receptor, impedindo a fosforilação do domínio intracelular tirosina-quinase, através da inibição competitiva do sítio de ligação do ATP, inibindo a cascata de sinalização bioquímica com geração de apoptose, menor taxa de proliferação e angiogênese (KIUPEL et al., 2004; BLACKWOOD et al., 2012; LEITE et al., 2012).

São utilizados na medicina veterinária para tratamento de MCT canino o masitinib e o toceranib (HAHN et al., 2008; LONDON et al., 2009). O toceranib além de bloquear o receptor TKI, também é capaz de bloquear o receptor do fator de crescimento endotelial vascular (VEGFR) e o receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGFR). Está aprovado para uso o Palladia® da Pfizer Animal Health, em cães com recidiva de MCT Grau II e III (BLACKWOOD et al., 2012). Cães com MCT que usaram o Palladia® tiveram

melhora na taxa de resposta objetiva em 60%, onde a mutação no gene *KIT* e ausência de metástase em linfonodo regional associaram-se a melhor resposta ao tratamento (LONDON et al., 2009). Os principais efeitos colaterais observados foram diarreia, anorexia, letargia, vômito, claudicação e perda de peso (LONDON et al., 2009; BLACKWOOD et al., 2012). Já o uso do masitinib (MASIVET®, da AB Science) está aprovado para cães com MCT de graus II e III, inoperáveis, com mutação no gene *KIT*, e seu uso aumenta em 12 a 24 meses a sobrevida dos animais com tumores inoperáveis (HAHN et al., 2008; BLACKWOOD et al., 2012). Os principais efeitos colaterais observados foram diarreia, vômito, edema e neutropenia, sendo também descritos distúrbios renais como nefropatia por perda de proteína e anemia hemolítica (BLACKWOOD et al., 2012).

O imatinib (Glivec® da Novartis) é um inibidor seletivo de proteínas quinases do KIT, do PDGFR- $\alpha$  e PDGFR- $\beta$ , além das quinases intracelulares ABL, BCR-ABL (LEITE et al., 2012; BONKOBARA, 2015). Em humanos é usado em pacientes com tumor estromal gastrointestinal (GIST) inoperável ou metastático, com excelentes resultados na sobrevida geral e na sobrevida livre de progressão (VERWEIJ et al., 2004), para melanoma de mucosa, acral e de exposição solar prolongado com mutações no KIT (HODI et al., 2013) e para mastocitose com mutação do KIT, exceto para mutação KIT D816V (PARDANANI, 2013). Em 3 cães com MCT agressivo sem conhecimento de mutação do KIT tratados com imatinib na dose de 4,4 mg/kg diariamente observou-se remissão completa (BONKOBARA et al., 2015). Em um estudo com 38 cães com MCT tratados com imatinib na dose de 10-12,7 mg/kg diariamente, 16 apresentavam a mutação no KIT (exon 8,9 e 11), e obtiveram resposta total ou parcial. Já nos cães que não apresentavam a mutação (22 casos), apenas 5 apresentaram resposta objetiva e 3 que não era sabido se havia ou não a mutação que obtiveram resposta completa (MARCONATO et al., 2008). Os efeitos colaterais associados ao uso do imatinib em cães foram êmese, neutropenia, elevação das enzimas hepáticas, uréia e creatinina, dependente de dose (KOBAYASHI et al., 2013). Baseado nos estudos a dose melhor tolerada de imatinib pelos cães foi 10mg/kg (BONKOBARA et al., 2015).

#### 3.4.5.4.1 – Inibidores de Tirosina Quinase em combinação com quimioterapia

ROBAT et al. (2012) avaliaram a segurança do uso de quimioterapia com vimblastina e inibidor de tirosina-quinase toceranib em cães com MCT, onde as doses máximas toleradas foram 1,6 mg/m<sup>2</sup> a cada 15 dias com 3,25 mg/kg em dias alternados, respectivamente, o que mostrou atividade sinérgica ou aditiva do tratamento, porém uma avaliação prospectiva randomizada deverá ser realizada para mostrar eficácia do tratamento.

MITCHELL et al. (2012) avaliaram o uso de toceranib com doses metronômicas de ciclofosfamida onde houve um aumento nas concentrações séricas de IFN- $\gamma$  o que é inversamente relacionada as células Treg após 6 semanas de tratamento, o que indicou uma função imunomodulatória do toceranib.

#### 3.4.5.5 – Criocirurgia

A criocirurgia pode ser uma opção terapêutica em MCTs menores que 1 cm, múltiplos, mas não são rotineiramente utilizadas devido risco de desgranulação de mastócitos (KRAHWINKEL, 1980; BLACKWOOD et al., 2012). A morte celular com a criocirurgia se dá por desidratação, cristalização e ruptura das membranas celulares, desnaturação de substâncias lipoproteicas, estase vascular e choque térmico. Há resfriamento dos tecidos com aplicação de nitrogênio líquido a -196° C provocando congelamento da formação, reduzindo sua temperatura entre -20° C e -30° C, o que leva a destruição do tecido (KRAHWINKEL, 1980; DALECK, DE NARDI, RODASKI, 2009). Na região de aplicação da criocirurgia pode ocorrer leucodermia, despigmentação, leucotriquia e alopecia (DALECK, DE NARDI, RODASKI, 2009).

#### 3.4.5.6 – Braquiterapia intralesional

É uma terapia onde a radiação ionizante é originária de fontes radioativas colocadas próximas ao tecido a ser tratado, no interstício (WITHROW et al.,

2013). Onze cães com MCT de grau II e III foram submetidos a cirurgia e braquiterapia intersticial com irídio-192, onde o intervalo livre de progressão foi de 1391 dias, com efeitos colaterais sutis (NORTHRUP et al., 2004).

#### 3.4.5.7 – Terapia fotodinâmica

A terapia fotodinâmica (PDT) é um tratamento que envolve administração intravenosa de substância fotossensibilizante, que se acumula preferencialmente em células de rápida multiplicação, incluindo as células tumorais, seguida de iluminação com comprimento de onda específico que leva a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) que provocam a destruição e morte celular (ISRAEL et al., 2014; MROZ et al., 2014). É uma terapia de baixo custo, que confere poucos efeitos colaterais (fotossensibilização cutânea, náusea e vômito foram descritos, além de prurido e ardência no local de aplicação) e, nas células saudáveis, não produz efeito mutagênico, podendo ser repetido em caso de recidiva tumoral ou em grandes formações (MROZ et al., 2014; SELLERA et al., 2014). Na veterinária há relatos em alguns tipos de câncer, incluindo MCT, osteossarcoma, carcinoma de células escamosas, melanoma, fibrossarcoma, tumores de glândula sebácea além de metástase de carcinoma de próstata (MROZ et al., 2014).

#### 3.4.5.8 – Eletroquimioterapia

Eletroquimioterapia (ECT) é uma terapia que envolve a combinação de apropriadas ondas elétricas com aplicação local ou sistêmica de quimioterápico (SUZUKI et al., 2015). Estes pulsos levam a abertura de poros na membrana celular, a chamada eletroporação ou eletropermeabilização que possibilitam uma maior captação do quimioterápico, resultando na morte celular (SPUGNINI et al., 2006). Em MCTs remissões parcial e total já foram descritas após tratamento com ECT (KODRE, et al., 2009). Em 85% dos casos a ECT foi capaz de manter um controle local sem efeitos colaterais (SPUGNINI et al., 2006). O quimioterápico utilizado é a bleomicina na dose de 15000 UI/m<sup>2</sup>, seguido da

aplicação dos pulsos elétricos. A ECT é uma terapia aparentemente segura para MCTs não completamente ressecados tendo baixa toxicidade, sendo uma alternativa no tratamento do MCT (SUZUKI et al., 2015).

Lowe et al. (2016) avaliaram o uso de ECT em cães com MCT: como tratamento único para MCT até 1,0 cm de diâmetro (*ECT alone*); como terapia intra-operatória (*ECT intra-op*); adjuvante a cirurgia, com aplicação da ECT depois de 2 a 4 semanas da exérese incompleta do tumor (*ECT post-op*); em caso de recidiva do MCT após cirurgia (*ECT recur*) e os resultados mostraram um aumento no período livre da doença nos casos *ECT post-op* mas sem significância estatística quanto a sobrevida.

## 4 – MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 ANIMAIS

Foram selecionados 38 MCTs cutâneos, algumas amostras provenientes de banco de tumores e outras coletadas no trans-cirúrgico, de 30 animais, atendidos nos Hospitais Veterinários da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP e da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da USP (São Paulo/SP), do Laboratório PROVET (São Paulo/SP), da Clínica Onco Cane (São Paulo/SP), do Hospital Veterinário Público da Anclivepa (São Paulo/SP) e da Universidade Metodista de São Paulo (São Bernardo do Campo/SP). Os critérios para inclusão dos casos no presente estudo foram: (1) ausência de tratamento prévio e pós-cirúrgico com anti-inflamatórios e/ou quimioterápicos; (2) material histológico de qualidade e quantidade suficiente para análise imuno-histoquímica; (3) acompanhamento clínico pós-cirúrgico mínimo de 180 dias.

Para o diagnóstico do MCT, realizou-se anamnese, exame físico e punção aspirativa por agulha fina do nódulo e/ou exame histopatológico. Quando da confirmação de MCT, através do resultado da citologia, o paciente submeteu-se a excisão cirúrgica completa da neoplasia.

A história clínica dos pacientes foi obtida através da análise de prontuários, contatos telefônicos e consultas de retorno para informações sobre recidivas e sobrevida. As informações obtidas para o levantamento foram idade ao diagnóstico do MCT, sexo, raça, localização do tumor, realização de quimioterapia pré ou pós-cirúrgica, quantidade de nódulos, tempo de sobrevida do animal e, em casos de óbito, se foi relacionado ou não à doença. Morte relacionada à doença foi considerada como sendo resultado da disseminação neoplásica, em função de síndrome paraneoplásica ou eutanásia devido a estágios avançados do MCT.

## 4.2 HISTOPATOLOGIA

Os fragmentos de tumor foram fixados em solução de formol tamponado a 10% e encaminhadas para o Laboratório de Patologia do Hospital Veterinário da FZEA-USP, onde foram submetidos a processamento histológico de acordo com as técnicas de inclusão em parafina. Foram realizadas secções de 4 µm de espessura de cada bloco. As lâminas contendo os cortes das amostras foram coradas por hematoxilina e eosina para confirmação do diagnóstico de MCT e graduação das lesões, e por Azul de Toluidina, quando necessário, para evidência dos grânulos citoplasmáticos (PROPHET et al., 1992).

A graduação histológica foi realizada por patologista certificado pela Associação Brasileira de Patologia Veterinária (Ricardo De Francisco Strefezzi), sem informações sobre o caso clínico e a classificação seguiu os critérios propostos por Patnaik et al. (1984) e por Kiupel et al. (2011).

## 4.3 CONTAGEM EOSINÓFILOS

Para a contagem de eosinófilos foram selecionados cinco campos com alta frequência (“*hot-spots*”) de eosinófilos na lâmina de cada amostra. As imagens foram obtidas em microscópio binocular (Leica® DM500) acoplado a câmera de alta definição (Leica ICC50 HD®, Leica®), conectado a computador dotado de sistema de análise de imagens. Os valores de cada campo foram somados para obtenção do valor final de contagem de eosinófilos para cada caso. Em animais com mais de uma lesão, utilizou-se o valor mais alto.

## 4.4 IMUNO-HISTOQUÍMICA

O processamento imuno-histoquímico foi realizado no Laboratório de Patologia do Hospital Veterinário da FZEA-USP, com base no método descrito por Hsu et al. (1981) com modificações.

Cortes histológicos de 4 µm de espessura foram aderidos em lâminas silanizadas que foram armazenadas em estufa a 60° C por 30 minutos para



desparafinização. Foram realizados 2 banhos no Xilol a 100% por 15 minutos, re-hidratados em álcool absoluto, etanol 95% e 70% por 5 minutos, seguidos por lavagem em água corrente e destilada.

A recuperação antigênica foi realizada em TrisEDTA pH9,5 em câmara a vapor “*steamer*” a 94° C por 20 minutos, seguido de resfriamento durante 20 minutos. Três lavagens com solução TBS pH 9,5 durante 5 minutos cada, com adição de detergente Tween 20 a 1% foram feitos após o resfriamento.

O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado através da solução de bloqueio Dako (*Protein Block Serum-Free Ready-to-use*, código: X090930-2) durante 10 minutos em temperatura ambiente, em seguida realizou-se três lavagens com solução TBS por 5 minutos cada.

As proteínas inespecíficas foram bloqueadas com solução de leite desnatado Molico® a 2,5% em água destilada durante 15 minutos. A incubação com anticorpo monoclonal de camundongo anti-CD68 humano (clone PG-M1; Dako, Denmark) na diluição 1:50 foi realizada em todas as amostras, em câmara úmida, a temperatura ambiente (média de 27° C), durante 75 minutos.

As amostras foram lavadas novamente com TBS 4 vezes por 5 minutos e, posteriormente, incubados durante 15 minutos com o anticorpo secundário (EasylinkONE®, Easy Path®) conforme indicação do fabricante visando amplificar a reação. Mais 3 lavagens de 5 minutos com TBS foram realizadas e, para revelação da reação, adicionou-se às amostras a diaminobenzidina (DAB + Chromogen, Easy Path®) por 1 minuto. Os cortes foram então lavados em água destilada e contracolorados com Hematoxilina de Harris, seguidas de lavagem em água corrente. Realizou-se desidratação em álcool graduado, diafanização em banhos de xilol e montagem com lamínula.

As lâminas de controle negativo foram incubadas com imunoglobulina G e processadas simultaneamente, com a mesma diluição e tempo, para confirmar a especificidade do anticorpo primário. Controles positivos foram realizados com amostras de pulmão de cão.

#### 4.4.1 Avaliação das imunomarcações

As avaliações das imunomarcações foram realizadas em imagens obtidas em microscópio binocular (Leica® DM500) acoplado a câmera de alta definição (Leica ICC50 HD®, Leica®), conectado a computador dotado de sistema de análise de imagens. A avaliação para positividade de CD68 foi realizada, inicialmente, em positiva ou negativa, e de forma semiquantitativa, estimando-se a porcentagem de macrófagos neoplásicos marcados, sendo 0 para negativo, 1 para macrófagos isolados e 2 para grupos de macrófagos.

#### 4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos nas marcações imuno-histoquímicas foram comparados entre os graus histopatológicos por meio da análise de variância (ANOVA) com o Teste de Kruskal-Wallis/Dunn, ou teste de Mann-Whitney. As associações dos indicadores avaliados com a mortalidade dos animais em função dos MCTs foram analisadas pelo teste Teste Exato de Fisher.

A correlação entre os indicadores investigados foi analisada pelo Teste de Spearman. Posteriormente, cada indicador foi analisado individualmente com relação ao tempo de sobrevivência pelo método de Kaplan-Meier, seguido de logrank test. A análise estatística foi realizada com o auxílio dos softwares GraphPad Prism® (versão 4.02 for Windows, Graphpad Software, Inc. - San Diego, CA, USA) e BioEstat (Universidade Federal do Pará. Pará, Brasil) com nível de significância de 5%.

## 5 – RESULTADOS

### 5.1 - POPULAÇÃO ESTUDADA

Dos 38 cães incluídos neste estudo, dezessete eram machos (57%) e treze fêmeas (43%). A maior incidência foi em cães das raças Labrador e Boxer (7/30, 23%), seguida por animais sem raça definida (6/30, 20%). As demais raças foram, em ordem decrescente de frequência: Poodle (3/30, 10%); Dachshund e Fila Brasileiro (2/30, 7%); Doberman, Dogue Alemão, Golden Retriever e Pitbull com um exemplar de cada (1/30, 2%).

A média de idade dos cães com MCT neste estudo foi de 7,6 anos, variando de 3 a 15 anos. Os dados estão resumidos no Quadro 2. Quanto à localização dos tumores a maior incidência foi na região de extremidades e membros, acometendo 42% (16/38) dos casos, seguida da região de tórax (14/38, 36%), região inguinal e perineal (3/38, 8%) e cabeça e pescoço (2/38, 5%). A maioria dos animais apresentava uma única formação (30/38, 80%) e cinco animais possuíam duas ou mais formações (5/30, 17%).

Quanto à graduação histopatológica de Patnaik et al. (1984), 27% dos animais apresentaram MCT de grau I (8/30), 67% de grau II (20/30) e 6% de grau III (4/30). Pela classificação proposta por Kiupel, 74% (22/30) dos casos eram de baixo grau e 26% (8/30) eram de alto grau.

Quadro 2 – Distribuição dos dados dos animais incluídos no estudo, incluindo sexo, raça, idade e grau histológico conforme Patnaik et al. (1984) e Kiupel et al. (2011).

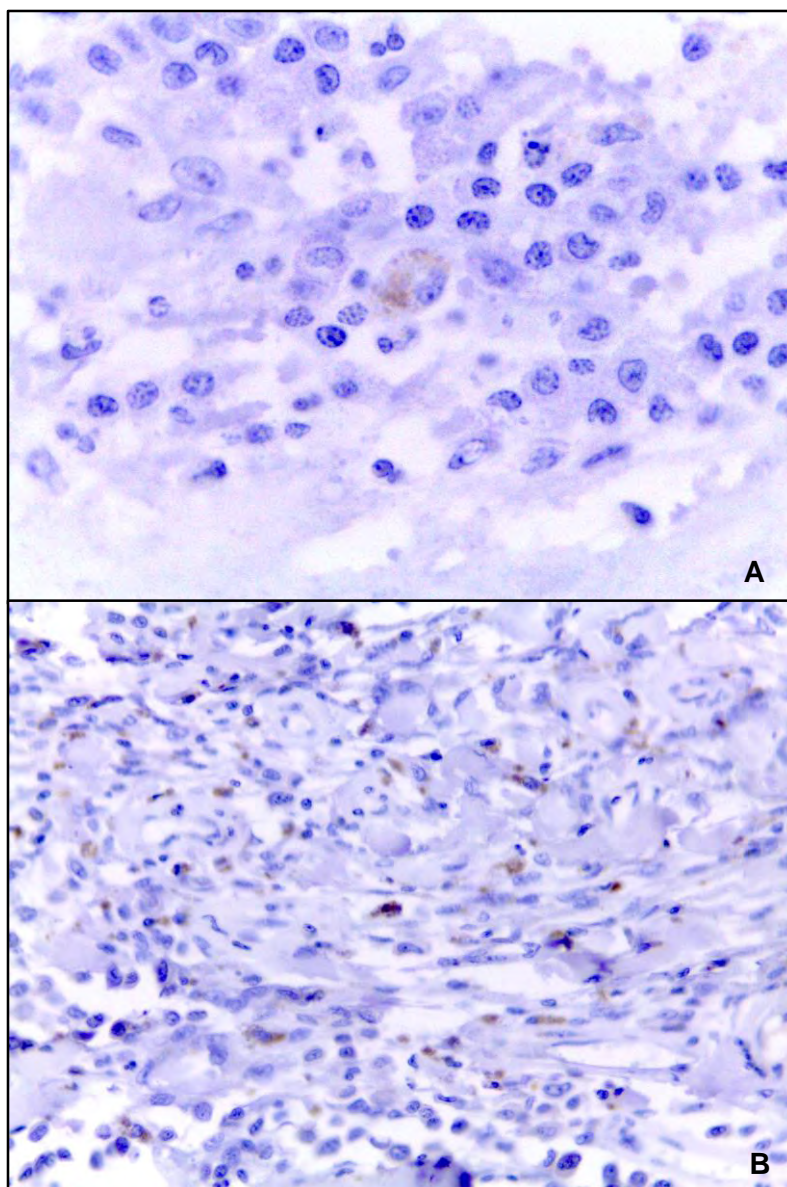
TUMORE S	Sexo	Raça	Idade	Patnaik	Kiupel	CD68	CD68 SCORE	Média de eosinófilos por campo
H01/01	F	Labrador	14	2	1	N	0	186,2
17/11	M	Boxer	14	2	1	S	1	17,8
21/14	-	-		2	2	N	0	26
22/14	F	Pit bull	7	2	2	N	0	167,4
23/14	F	Poodle	15	1	1	N	0	9,8
25/14	M	srd	13	2	1	S	2	91,6
39/14	M	Labrador	9	2	1	N	0	61,8
41/14	M	Labrador	10	2	1	S	1	101
72/12	F	Labrador	8	3	2	S	1	41,2
74/12	F	Labrador	8	3	2	N	0	28,6
75/12	F	Labrador	8	3	2	N	0	199,4
78/12	M	Boxer	7	2	2	N	0	13,4
92/14	M	Labrador	9	2	1	S	1	231,8
160/14	F	Labrador	12	2	1	S	2	71,4
474	F	Boxer	4	2	1	S	1	144,4
497/15	F	Golden	3	1	1	S	1	173,2
630	M	Poodle	7	2	1	S	2	138,6
637/02	M	Boxer	10	2	2	S	1	23
899	M	Dogue Alemão	6	2	1	N	0	28,6
1020	F	srd	7	2	1	S	1	189,4
1093	M	Labrador	3	2	1	S	1	0
338/02	F	srd	5	2	1	N	0	108,8
36513-C	M	Doberman	9	3	2	S	2	152,8
36535-c1	F	Boxer	9	3	2	N	0	5,2
36535-C3	F	Boxer	9	3	2	N	0	27,8
36562-C	F	Boxer	9	1	1	N	0	136,6
36837-C	M	Fila	9	1	1	S	1	68,6
36988 C1	F	Poodle	4	1	1	S	1	53,2
36988-C2	F	Poodle	4	1	1	S	2	67
37104-C2	F	Boxer	8	2	1	S	1	210
37543	M	srd	10	2	1	S	1	236,6
37800	M	Daschund	10	2	2	S	1	17,2
37800-4	M	Daschund	10	2	2	S	1	25,6
RS04	F	Srd	10	1	1	S	1	40,6
RS23	M	srd	8	1	1	N	0	69,2
RS24	M	srd	8	1	1	S	1	56,4
RS26	M	Fila	10	1	1	S	2	7,6
RS30	M	Daschund	12	3	2	S	1	81,2

Legenda: M: macho, F: fêmea, SRD: sem raça definida, S: sim, N: não

## 5.2 – MARCAÇÕES IMUNO-HISTOQUÍMICAS

A imunomarcção para CD68 foi positiva em 73,34% dos casos (22/30) e negativa em 26,66% dos casos (8/30), sendo que o padrão de imunomarcção encontrado foi citoplasmático granular. As amostras marcadas com o anticorpo anti-CD68 foram graduadas em escores, sendo 30% escore 0 (9/30), 50% (15/30) escore 1 e 20% escore 2 (6/30) (Fig. 1).

Figura 1 - Fotomicrografias de MCT canino mostrando padrões de imunomarcção para CD68.



FONTE: HUETE, 2016

Legenda: Imunomarcção para CD68, nota-se (A) marcação citoplasmática granular em macrófago isolado, representando a baixa expressão (escore 1), objetiva 100x; e em grupos de macrófagos, representando a alta expressão da proteína (escore 2), objetiva 40x. IHQ, contracoloração com Hematoxilina de Harris.

A comparação das imunomarcações de CD68 entre os diferentes graus histopatológicos, conforme classificação proposta por Patnaik et al. (1984), não apresentou diferenças significativas para positividade das amostras ( $p=0,9635$ ), nem para a avaliação em escores ( $p=0,7482$ ). O mesmo foi observado quando os tumores foram graduados pelo método de Kiupel et al. (2011) para positividade das amostras ( $p=0,6866$ ) e avaliação em escores ( $p=0,6199$ ) (Tabela 1).

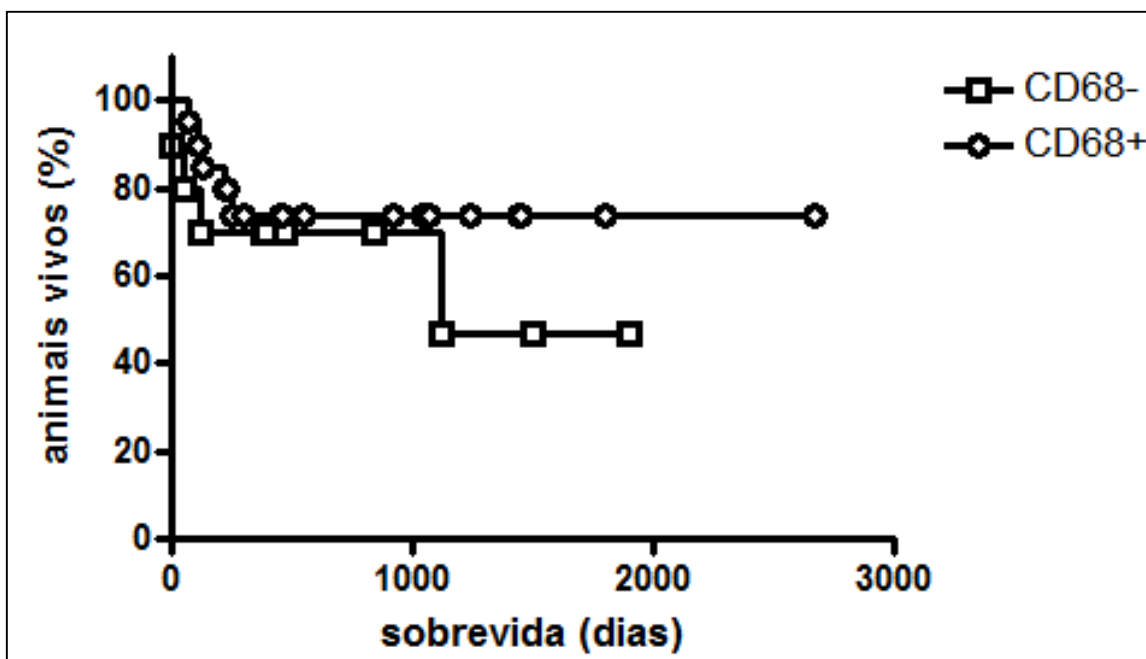
Tabela 1- Distribuição dos casos analisados em função da graduação histopatológica e escores para expressão de CD68

Escore	Patnaik et al. (1984)*			Kiupel et al. (2011)**	
	Grau I	Grau II	Grau III	Baixo	Alto
0	2 (28,57%)	6 (31,58%)	1 (25%)	6 (27,27%)	3 (37,50%)
1	3 (42,86%)	10 (52,63%)	2 (50%)	12 (54,54%)	4 (50%)
2	2 (28,57%)	3 (15,79%)	1 (25%)	4 (18,19%)	1 (12,50%)
Total	7 (100%)	19 (100%)	4 (100%)	22 (100%)	8 (100%)

\* $p = 0,6866$ , ANOVA/Kruskal Wallis, com  $p > 0,05$  entre os graus, pós-testes de Dunn, \*\* $p = 0,6199$ , Mann-Whitney.

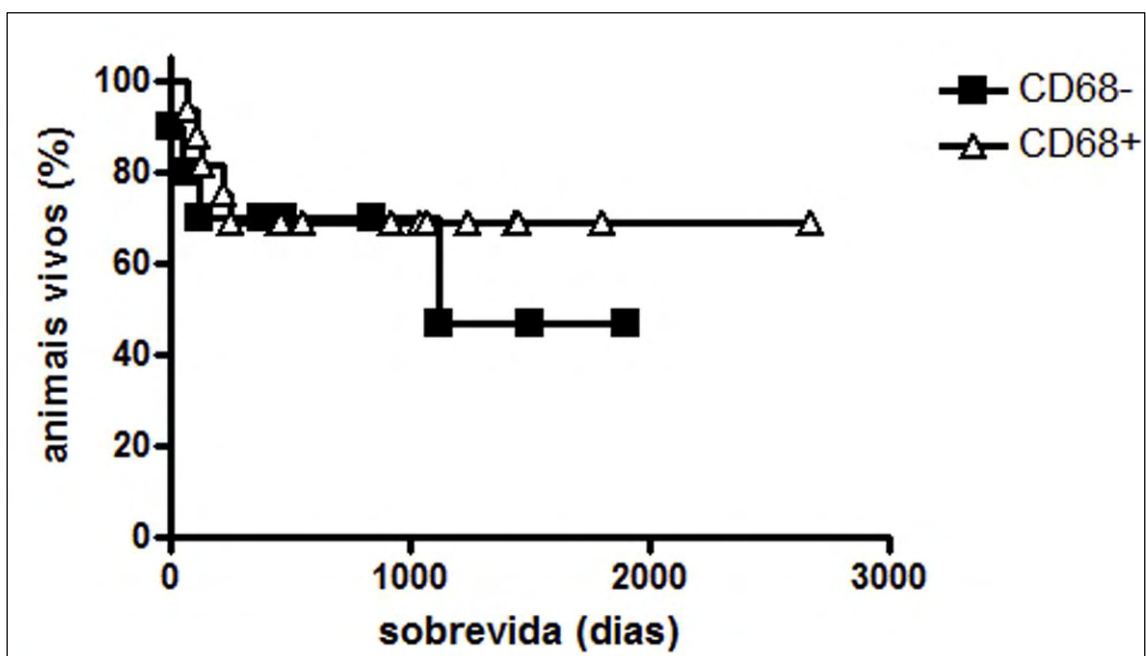
Para analisar a mortalidade e a sobrevida dos animais estudados com MCT com imunomarcção positiva ou negativa para CD68 foi realizado o teste exato de Fisher ( $p=1,000$ ) e Kaplan-Meier seguido de teste de *logrank* ( $p=0,7134$ ), onde a mediana de sobrevida foi de 1119 dias para casos negativos para CD68. Não foram encontradas diferenças significativas (Fig. 2 e 4). O mesmo ocorreu quando o período mínimo de observação para casos censurados foi elevado para 365 dias, cuja mediana de sobrevida manteve-se de 1119 dias para casos negativos para CD68 (Fig. 3).

Figura 2 - Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier para os pacientes estudados, em função da expressão imuno-histoquímica para CD68.



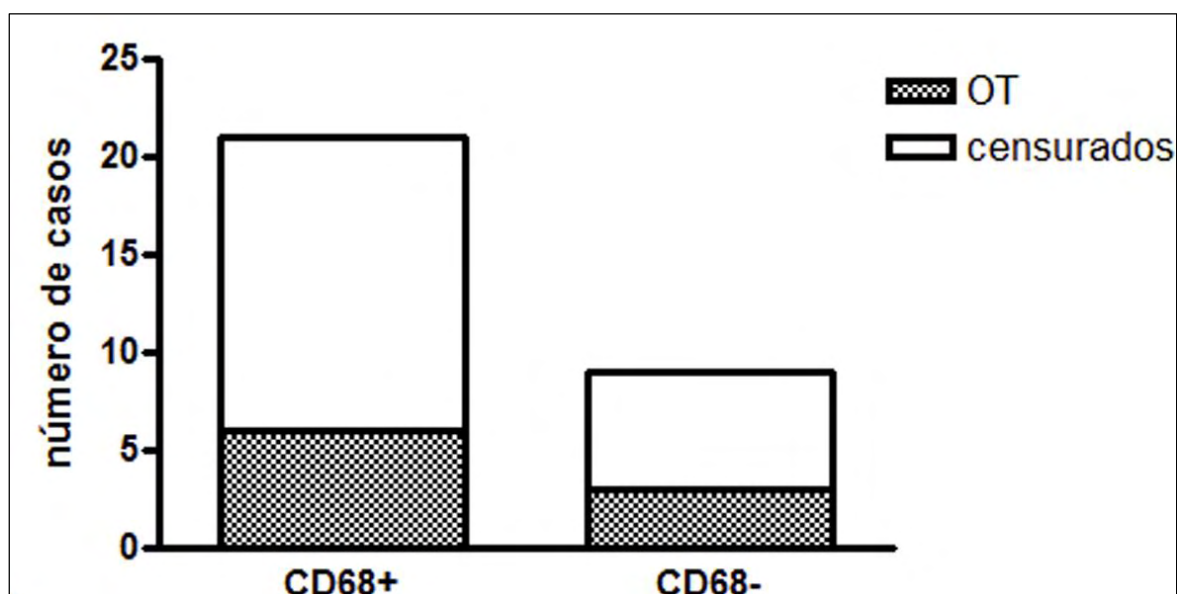
Legenda: Kaplan-Meier ( $p=0,3983$ ;  $X^2=0,7134$ ; mediana de sobrevivência = 1119 dias para casos negativos para CD68)

Figura 3 - Curva de sobrevivência dos pacientes estudados, em função da expressão imuno-histoquímica para CD68 com sobrevivência >365 dias de acompanhamento para casos censurados.



Legenda: Kaplan-Meier ( $p=0,5854$ ;  $X^2=0,2976$ ; mediana de sobrevivência = 1119 dias para casos negativos para CD68)

Figura 4 - Gráfico representando a mortalidade relacionada ao tumor e o número de casos censurados (mortes não-relacionadas ao MCT e animais vivos ao final do estudo) em função da expressão de CD68.



Legenda: Teste exato de Fisher ( $p=1,000$ ). OT = óbito em função do tumor

Quando os escores de CD68 foram comparados à contagem de eosinófilos nos MCTs estudados, não houve correlação entre os parâmetros ( $r=0,09149$ ;  $p=0,5956$ ). Os valores médios, máximos e mínimos para contagem de eosinófilos encontram-se listados na Tabela 2. Também não foram encontradas diferenças significativas entre as graduações histopatológicas para este parâmetro (Figs. 5 e 6).

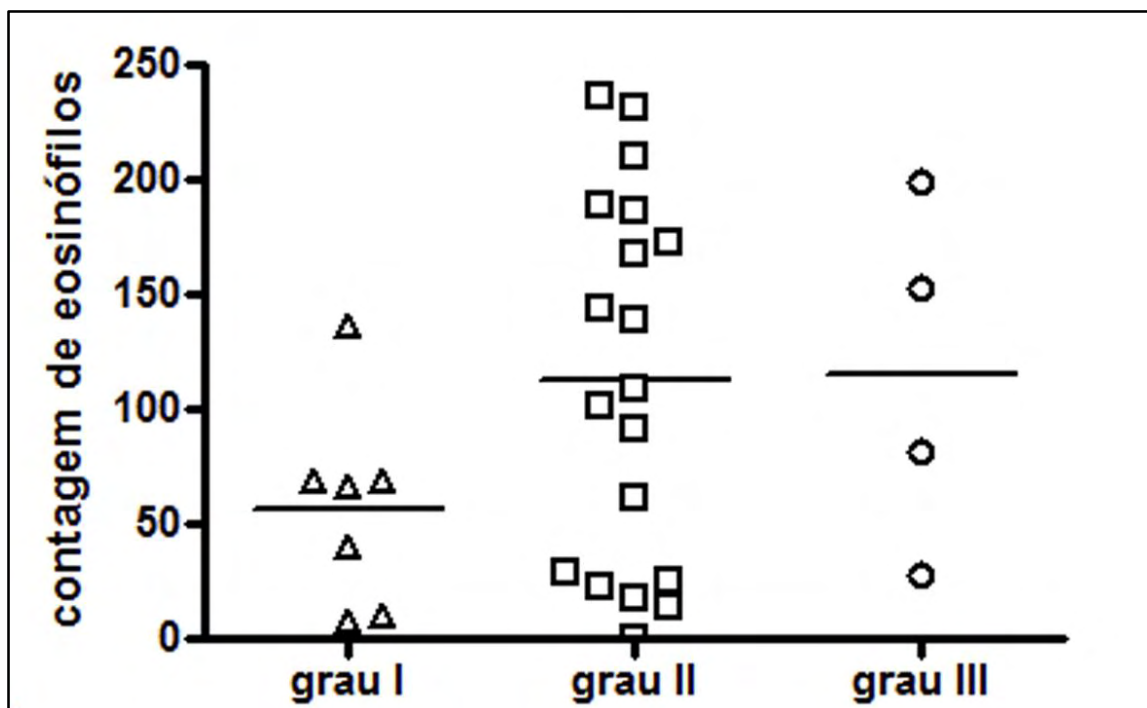
Tabela 2 - Distribuição dos valores máximos, mínimos e médios para contagem de eosinófilos em função das graduações histopatológicas de Patnaik et al. (1984) e Kiupel et al. (2011).

	Patnaik et al. (1984)			Kiupel et al. (2011)	
	Grau I (n=7)	Grau II (n=19)	Grau III (n=4)	Baixo grau (n=22)	Alto grau (n=8)
Máximo	173,2	236,6	199,4	236,6	199,4
Média $\pm$ DP	72 $\pm$ 51,54	107,7 $\pm$ 79,95	115,3 $\pm$ 72,96	100,2 $\pm$ 75,09	98,6 $\pm$ 58,97
Mínimo	7,6	0	5,2	0	23

Legenda: DP = desvio padrão

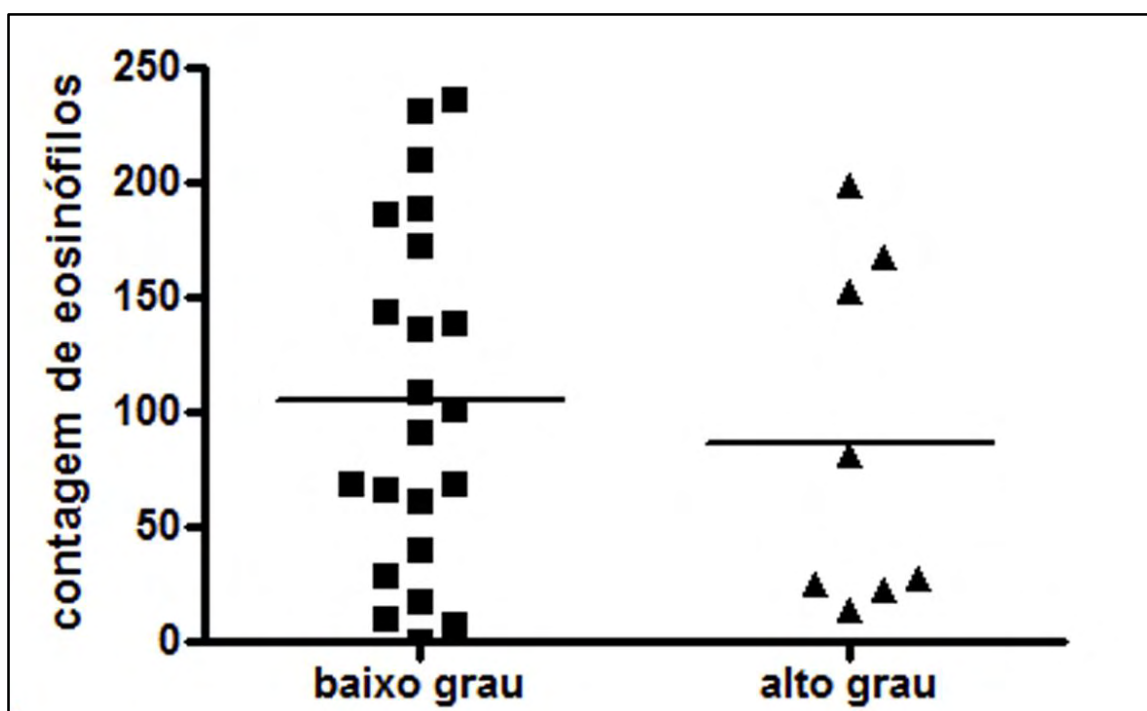


Figura 5 - Distribuição das contagens de eosinófilos em função da graduação segundo Patnaik et al. (1984).



Legenda: ANOVA/Kruskal Wallis ( $p=0,2136$ , com  $p>0,05$  entre os graus no pós-teste de Dunn).

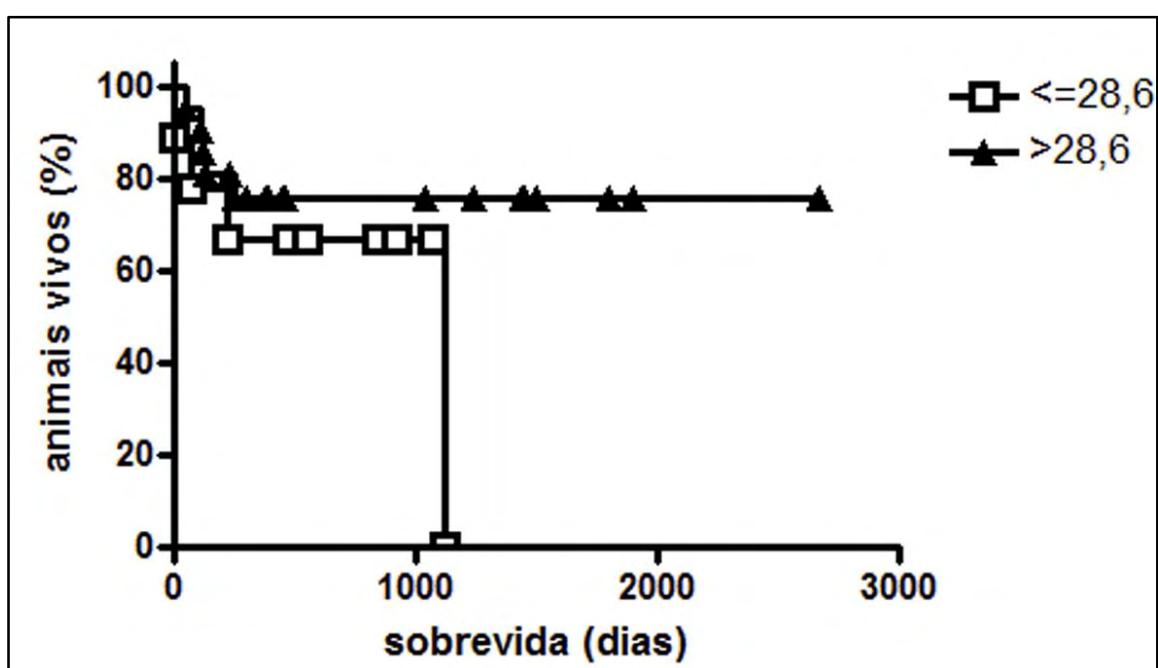
Figura 6 - Distribuição das contagens de eosinófilos em função da graduação de Kiupel et al. (2011).



Legenda: Teste de Mann-Whitney ( $p = 0,5897$ ).

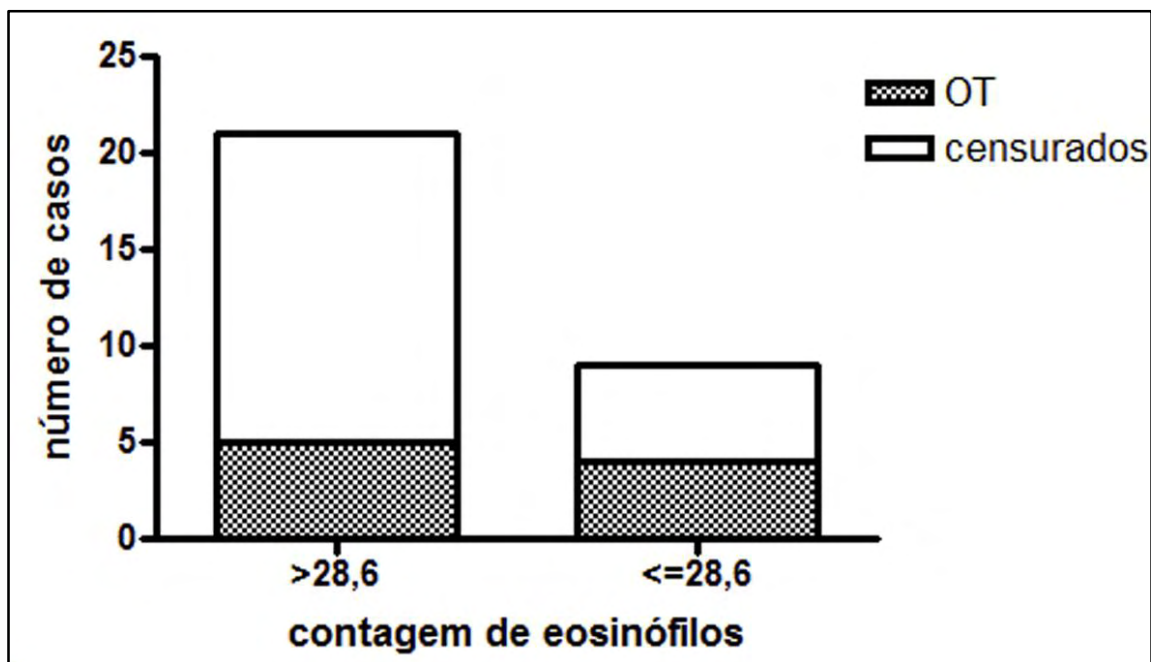
Em seguida, os valores de contagem de eosinófilos em animais que morreram em função da doença e animais censurados foram utilizados para construção de uma curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*), a fim de determinar um valor de corte para dois grupos, que resultou no valor de 28,6. Após isto, procedeu-se as análises de sobrevida e mortalidade para casos com alta quantidade de eosinófilos ( $>28,6$ ) e baixa quantidade de eosinófilos ( $\leq 28,6$ ), nos quais não foram detectadas diferenças estatisticamente significativas (Figs. 7 e 8).

Figura 7 - Curva de sobrevida de Kaplan-Meier para os pacientes estudados, em função da contagem de eosinófilos, utilizando o valor de corte de 28,6 eosinófilos.



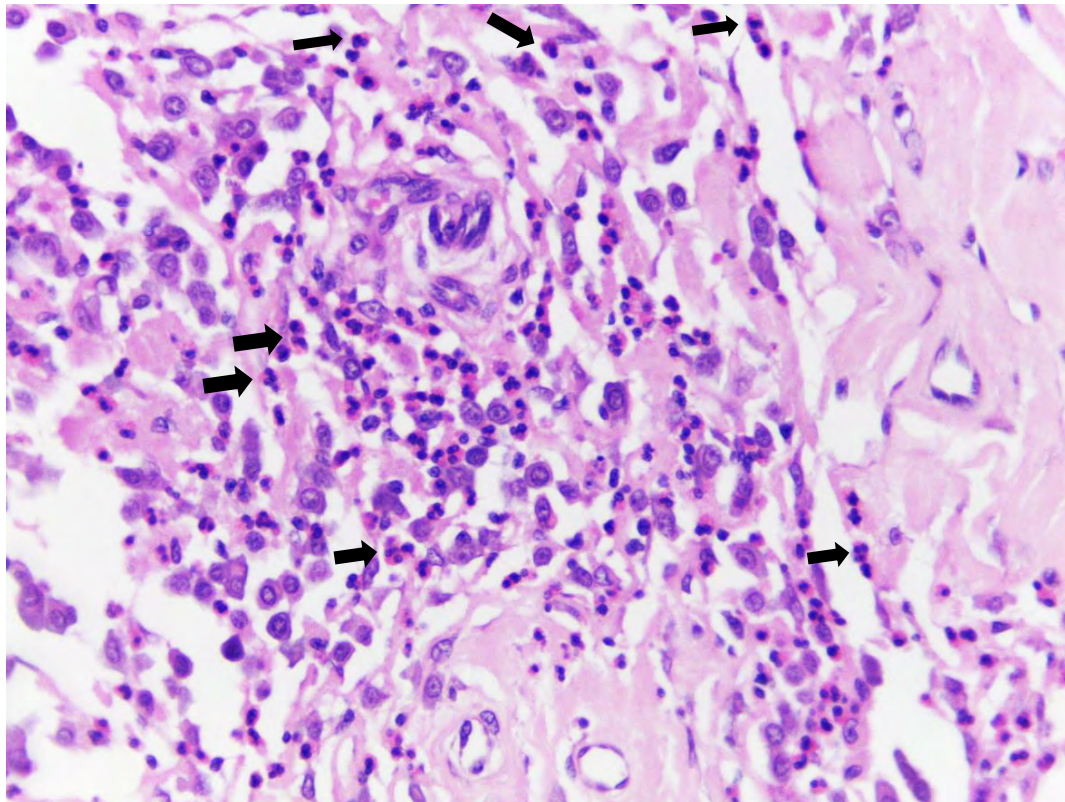
Legenda: Kaplan-Meier ( $p=0,2195$ ;  $X^2=1.508$ ; mediana de sobrevida = 1119 dias para eosinófilos  $\leq 28,6$ ).

Figura 8 - Gráfico representando a mortalidade em função do tumor e o número de casos censurados (mortes não-relacionadas ao MCT e animais vivos ao final do estudo) em função das contagens de eosinófilos.



Legenda: Teste exato de Fisher ( $p=0,3888$ )

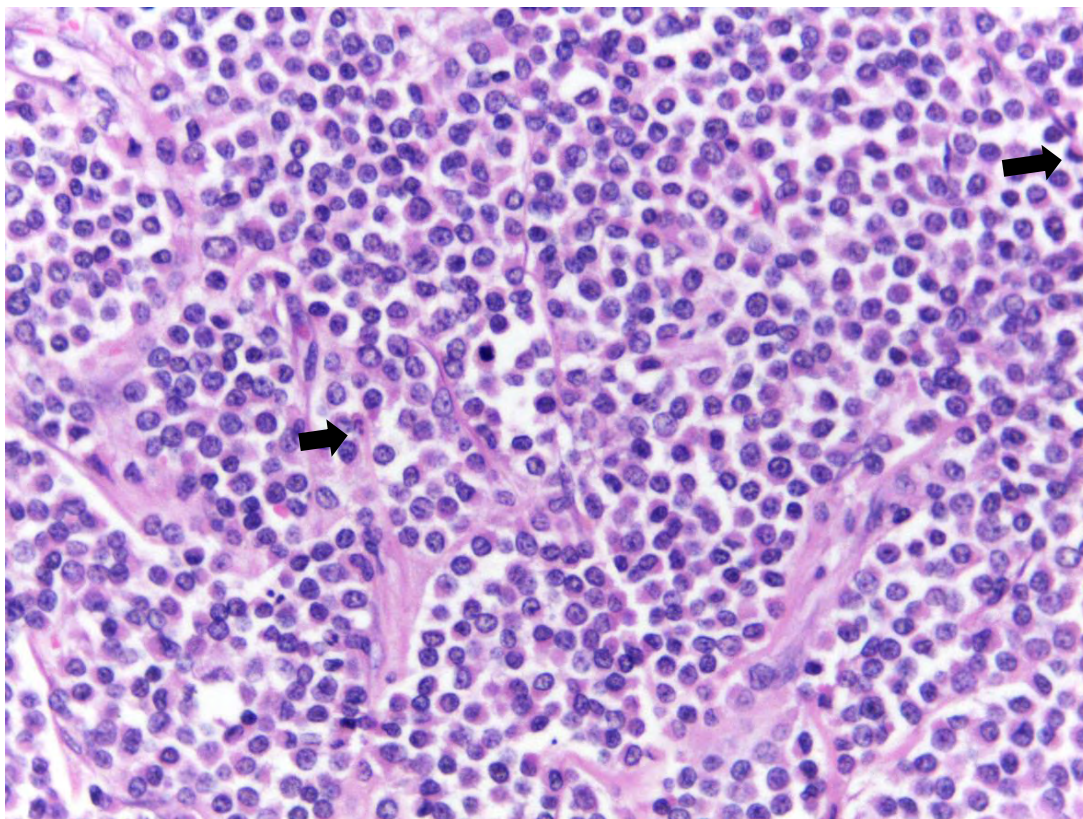
Figura 9 - Fotomicrografia de MCTs apresentando alta contagem de eosinófilos.



FONTE: HUETE, 2016

Legenda: Alta contagem de eosinófilos (setas), objetiva 100x, coloração com Hematoxilina de Harris.

Figura 10 - Fotomicrografia de MCTs apresentando baixa contagem de eosinófilos.



FONTE: HUETE, 2016

Legenda: Baixa contagem de eosinófilos, objetiva 100x, coloração com Hematoxilina de Harris

## 6 – DISCUSSÃO

Mastocitomas cutâneos são tumores com alta incidência na rotina da clínica veterinária, tendo um comportamento muito variado. A graduação histológica ainda é a ferramenta mais utilizada para determinar prognóstico e tratamento, porém sabe-se que ela não consegue prever o comportamento de todos os MCTs, tornando necessária a análise de marcadores adicionais visando prever o comportamento desses tumores (FINORA, et al., 2006; STREFEZZI, et al., 2009; STREFEZZI et al., 2010; KIUPEL, et al., 2011).

A distribuição quanto ao gênero mostrou relação macho:fêmea de 1,2 (machos representaram 55% dos casos e as fêmeas 45%), resultado semelhante ao relatado por White et al. (2011) não sugerindo predisposição sexual. A maioria dos estudos sugere não haver predisposição sexual para este tipo de neoplasia (FINNIE; BOSTOCK, 1979; PATNAIK et al., 1984; BOSTOCK, 1986; MACY, 1985; LONDON; SEGUIN, 2003). Simões et al. (1994) indicaram maior incidência de MCTs em fêmeas.

Dentre as raças acometidas, os cães da raça Labrador Retriever (21%) e sem raça definida (18%) foram os mais prevalentes, seguidos de Boxer (16%), Poodle (10%) e Daschund (8%). Resultados semelhantes são encontrados na literatura, onde os cães das raças Boxer, Labrador Retriever e Golden Retriever são os mais prevalentes (VILLAMIL et al., 2011; WHITE et al. 2011; WARLAND, DOBSON, 2013). A nossa casuística provavelmente não reflete adequadamente a população canina, pois os casos selecionados vieram de hospitais cuja população atendida geralmente é de baixa renda, havendo uma maior incidência de animais SRD.

A faixa etária dos animais acometidos em nosso estudo foi de 8,7 anos, variando de 3 a 15 anos, corroborando com os dados encontrados em literatura onde os cães idosos são mais acometidos (MISDORP, 2004; WELLE et al., 2008; STREFEZZI et al. 2010, BLACKWOOD et al. 2012, POGGIANI et al. 2012).

Cerca de 50 a 60% dos casos de MCT acometem região de tronco, seguida pelas extremidades (25 a 40%) e cabeça e pescoço (10%) (WELLE et al., 2008). Grabarevic et al. (2009); Poggiani et al. (2012) mostraram maior incidência de MCTs nos membros, sem diferenciação entre membro torácico e

pélvico, dados semelhantes foram encontrados neste estudo, onde 42% dos casos acometeu membros e extremidades. Estudos sugerem um pior prognóstico quando o MCT acomete determinadas localizações como região inguinal, perineal, cavidade oral, região mucocutânea, focinho (GIEGER et al., 2003; WITHROW, 2013).

Em relação a quantidade de formações, 86,7% dos animais inseridos neste estudo apresentaram uma única formação e 13,3% múltiplas formações, o que confere com a prevalência citada na literatura onde 3 a 25% dos cães apresentam MCT múltiplos (WELLE et al., 2008; BLACKWOOD et al., 2012).

Elevado grau histopatológico em cães com MCT confere um prognóstico desfavorável, sendo um fator preditivo para evolução da doença e ocorrência de metástases, reduzindo a sobrevida e o intervalo livre da doença (WELLE et al., 2008; KIUPEL et al., 2011; TAKEUCHI, et al., 2013). Alguns estudos apontaram variação entre patologistas na graduação histológica de uma mesma amostra, levando a uma maior predominância de MCTs de grau II, o que dificulta prever o comportamento biológico do tumor. Para aumentar a confiança no resultado histológico dos MCT atualmente são utilizadas as duas classificações, as de Patnaik e colaboradores (1984) e Kiupel e colaboradores (2011) (NORTHRUP et al., 2005; WELLE et al., 2008; STREFEZZI, et al., 2009; TAKEUCHI et al., 2013). No presente estudo, utilizamos as duas graduações histológicas, e os MCTs de grau II foram a maioria (55%), quando classificados pelo método de Patnaik et al. (1984), assim como os de baixo grau (66%), quando graduados pelo método de Kiupel et al. (2011), semelhante ao observado por outros pesquisadores, que referem maior incidência de MCTs de grau II e de baixo grau (PATNAIK, EHLER, MACEWEN, 1984; KIUPEL et al., 2004; WELLE et al., 2008; TAKEUCHI et al., 2013).

A contagem das células positivas para CD68 foi realizada independentemente da intensidade da coloração da marcação, conforme descrito na literatura, pois a distinção entre células fortemente marcadas e fracamente marcadas durante a contagem pode ser considerada subjetiva e induzir a erros de avaliação quando feita avaliação direta (SCOTT et al., 1991). Em nosso estudo encontramos poucos macrófagos nas lâminas e, pela técnica utilizada, consideramos positivo qualquer intensidade de marcação para CD68.

O microambiente tumoral vem sendo bastante estudado nos últimos anos e há evidências que células vasculares, fibroblastos e leucócitos desempenham papéis importantes na progressão do tumor e da metástase, sendo cada vez mais evidenciado que os TAMs representem os leucócitos infiltrantes que mais tem relação a um pior prognóstico (YUAN, et al., 2014). A presença de TAM em diferentes tipos de câncer em humanos e sua habilidade em promover angiogênese e facilitar desenvolvimento de metástases tem sido amplamente estudada (LEEK et al., 1996; BINGLE et al., 2006; MANTOVANI et al., 2010; YURI et al., 2015). Os macrófagos na periferia do tumor podem promover invasão local fornecendo enzimas que degradam a matriz extracelular como as metaloproteinases e proteases (HANAHAN et al., 2011). Estudos com resultados controversos quanto a altas quantidades de TAM foram reportados em pacientes com carcinoma pulmonar de pequenas células (NSCLCs) em humanos, onde Kerr et al. (1998) mostraram um bom prognóstico nestes pacientes, o que diferiu de Takanami et al. (1999), Koukourakis et al. (1998) e Tataroglu et al. (2014) que associaram este achado com pior prognóstico. O significado real quanto ao prognóstico de elevadas quantidades de TAM em diversos tipos de câncer ainda não é conhecido (GOLLAPUDI et al., 2013). No nosso estudo, uma elevada presença de TAMs intratumorais não mostrou valor prognóstico em cães com MCTs. Porém, não foi possível avaliá-los na região peritumoral, devido ao fato de que a maioria das amostras era composta da massa tumoral propriamente dita, e não das margens de invasão.

Na veterinária a associação de infiltração de TAM ao prognóstico em cães foi avaliada em tumores mamários (KROL et al., 2011; RAPOSO et al. 2012), onde o número de TAM e a expressão de MCSF-R (fator para receptor de colônias estimulantes de macrófagos) foram avaliados em cães com adenocarcinoma mamário em diferentes graduações histológicas, com ou sem metástase à distância, com resultados similares ao dos estudos em humanos, ou seja, indicando um pior prognóstico para a alta incidência de TAMs. RAPOSO et al. (2012) avaliaram a presença de TAM em cães com câncer de mama, relatando associação entre tumores com altos níveis de TAM a um pior prognóstico, com menor sobrevida e maior incidência de metástases, fato este não encontrado em nosso estudo. Em adenocarcinomas endometriais e câncer

de mama triplo-negativo em humanos, a alta infiltração de TAM foi associada à maior incidência de metástase em linfonodos e à distância (KÜBLER et al., 2012; YUAN et al., 2014). Uma relação entre infiltração de TAM e angiogênese tumoral foi descrita em alguns estudos de câncer de mama em humanos (LEEK et al., 1996; LEEK et al., 2000; TSUTSUI et al., 2005). Não foram encontrados trabalhos avaliando a quantidade de TAM em MCTs cutâneos caninos, nem buscando relacioná-la ao prognóstico desta doença. No presente estudo, não encontramos diferenças significativas na incidência de TAM em animais com MCT entre os graus histopatológicos, independentemente do tipo de escore utilizado. Também não houve relação com a sobrevida, discordando dos estudos em cânceres humanos (KÜBLER et al., 2012; YUAN et al., 2014).

Em carcinomas endometriais em mulheres, foi avaliada a infiltração de macrófagos, onde uma alta infiltração de TAM foi encontrada nos tumores mais agressivos, além de ter sido correlacionada ao aumento da angiogênese e baixa sobrevida (Salvesen, Iversen, Akslen; 1999). Em câncer prostático em humanos a relevância clínica de TAM e densidade microvascular não são bem determinadas, mas estudos mostraram que um maior número de TAM era mais frequente em carcinomas prostáticos do que em tecidos benignos (YURI et al., 2015), fato também descrito por Gollapudi et al. (2013) que também demonstrou maior expressão de TAM em tumores malignos.

Os resultados divergentes encontrados em diversos estudos sobre a presença de TAM, muitas vezes num mesmo tumor, podem ser reflexo do número de casos avaliados em cada estudo, do grau histológico dos tumores estudados, estágio em que os pacientes se encontravam no momento do diagnóstico, tamanho dos tumores, além de trabalhos utilizarem métodos de quantificação diferentes (BINGLE et al., 2002). TAM podem estar presentes em áreas menos vascularizadas do tumor e estarem associados a uma assinatura gênica pró-angiogênica, com alta expressão de VEGF-A (RIABOV et al., 2014). Nos macrófagos, áreas de hipóxia induzem a expressão de fator indutor de hipóxia (HIF-1 $\alpha$ ), fatores de transcrição que regulam a expressão de VEGF-A (BINGLE et al., 2002; RIABOV et al., 2014).



A função desempenhada pelos fatores angiogênicos e fatores de crescimento secretados pelas células tumorais vem sendo amplamente estudado e alguns estudos mostraram que quando há acúmulo de mastócitos no ambiente tumoral, fatores que promovem a angiogênese, como VEGF, histamina, heparina e triptase são liberados, facilitando o processo de angiogênese (TATAROGLU et al., 2004). Os TAMs podem induzir angiogênese através da secreção de TNF- $\alpha$ , VEGF e angiogenina e, quando há contagens elevadas de TAMs, tem sido associado a pior prognóstico (BINGLE et al., 2004, MURDOCH et al., 2004; RIABOV et al., 2014). Os TAMs podem atuar induzindo repostas inflamatórias no microambiente tumoral mas podem também promover o crescimento do MCT e o desenvolvimento de metástases.

Macrófagos produzem MMPs que facilitam angiogênese através da degradação da matriz extracelular e, ao mesmo tempo, inibem a angiogênese pela liberação de angiostatina (BINGLE et al., 2002). As MMPs, os inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs) e os VEGFs são os mediadores do processo de invasão tumoral e metástase em neoplasias em humanos e cães (LIU et al., 2000). As MMPs modulam o complexo microambiente tumoral e estão envolvidas nas fases iniciais da carcinogênese, invasão tumoral e metástase, sendo que o equilíbrio entre MMPs e TIMPs é essencial para a manutenção da homeostase (LIU et al., 2000). São quatro TIMPs descritas com diferentes propriedades bioquímicas, expressão e função biológica, agindo contra a invasão neoplásica e metástase, com efeitos anti-angiogênicos (LIU et al., 2000). Na veterinária os osteossarcomas caninos apresentaram níveis mais elevados de MMP-2 e MMP-9 (LOUKOPOULOS et al., 2009). Em MCTs caninos, as expressões de MMP-2, MMP-9, TIMP-2 não tiveram relação com graduação histopatológica, porém, nos MCTs com alta porcentagem de células positivas para TIMP-1 a sobrevida foi maior (PULZ et al., 2016).

O processo de angiogênese tem a participação de células originárias da medula óssea, como as células do sistema imune inato (macrófagos, neutrófilos, mastócitos e precursores mieloides) que infiltram lesões pré-malignas e tumores em progressão, e, as células inflamatórias peritumorais, que contribuem no processo de angiogênese num tecido previamente quiescente, sustentando a angiogênese associada com o crescimento tumoral, além de facilitar a invasão

local (HAGEMAN et al., 2014). A relação entre a associação de células inflamatórias TAMs, mastócitos e eosinófilos no processo de angiogênese, bem como a relação dessas células com o estágio tumoral são descritas em alguns estudos, como em humanos com NSCLC sem correlação destas células com estágio tumoral, não conferindo um pior prognóstico nesse estudo (TATAROGLU et al., 2004).

Segundo Rech et al., 2004, os eosinófilos estiveram presentes em todos os graus de MCT canino, isolados ou agrupados, resultados também encontrados em nosso estudo. Eosinófilos secretam fatores angiogênicos e, ao mesmo tempo, proteína eosinofílica catiônica que é citotóxica (VENGE et al., 1983). Em pacientes humanos com NSCLCs um número elevado de eosinófilos conferiu melhor prognóstico, mas não foi avaliada a relação com estágio tumoral (TAKANAMI et al., 2002). Em carcinoma de células escamosas em esôfago de humanos, a maior infiltração de eosinófilos está relacionada prognósticos melhores (ISHIBASHI et al., 2006). Em carcinomas uterinos (DRIEL et al., 1996) e de cavidade oral (HORIUCHI et al., 1993), o infiltrado eosinofílico foi associado a um prognóstico ruim. No nosso estudo não obtivemos resultados significativos quanto a contagem alta de eosinófilos (>28,6), graduação tumoral e relação com prognóstico.

Os dados encontrados em literatura quanto a expressão de TAM e de eosinófilos, bem como a sua participação na angiogênese tumoral e progressão tumoral são conflitantes (LEEK et al., 1996; TAKANAMI et al. 2002; TATAROGLU et al. 2004; TSUTSUI et al., 2005; UTRERA-BARILLAS et al., 2010; KROL et al., 2011; GOLLAPUDI et al., 2013; RAPOSO et al., 2013; SUYANI et al., 2013; YURI et al., 2014). Além da análise dos TAMs, a adição de outros parâmetros como a análise de expressão VEGF e densidade microvascular, poderia auxiliar na investigação do envolvimento dos macrófagos ao processo de vasculogênese. Os dados da literatura e os resultados encontrados neste estudo sugerem que os leucócitos polimorfonucleares não se relacionam com a graduação do MCT. As citocinas e outros fatores presentes no microambiente tumoral podem influenciar na síntese e atividade biológica de tais células.

## CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos neste estudo, podemos concluir que em cães com MCT:

- A presença de TAM e a contagem de eosinófilos não estão associadas aos graus histopatológicos propostos por Patnaik et al. (1984) e Kiupel et al. (2011);

- Não há correlação entre a presença de TAM e o número de eosinófilos na região intratumoral de MCTs cutâneos caninos;

- A presença de TAM e a contagem de eosinófilos na região intratumoral de MCTs cutâneos caninos não são marcadores prognósticos.

## REFERÊNCIAS

ABADIE, J. J.; AMARDEILH, M. A.; DELVERDIER, M. E. Immunohistochemical detection of proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 in mast cell tumors from dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. Chicago, v. 215, p. 1629-1634, 1999.

AMAGAI, Y.; TANAKA, A.; MATSUDA, A.; JUNG, K.; OIDA, K.; NISHIKAWA, S.; JANG, H.; MATSUDA, H. **Journal of small animal practice**. Oxford, v. 54, p. 377-380, 2013.

BANKS, W. J. **Histologia veterinária aplicada**. 2. ed..São Paulo: Ed Manole, 1991. p. 629.

BERGIN, I. L.; SMEDLEY, R. C.; ESPLIN, D. G. Prognostic evaluation of Ki67 threshold value in canine oral melanoma. **Veterinary Pathology**. Basel, v. 48, p. 41-53, 2011.

BINGLE, L.; BROWN, N.J.; LEWIS, C.E. The role of tumor-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies. **Journal of pathology**. Edinburgh, v. 196, p. 254-265, 2002.

BINGLE, L.; LEWIS, C. E.; CORKE, K. P.; REED, M. W. R.; BROWN, N. J. Macrophages promote angiogenesis in human breast tumour spheroids in vivo. **British Journal of Cancer**. London, v. 94, n. 1, p. 101 – 107, 2006.

BLACKWOOD, L.; MURPHY, S.; BURACCO, P.; DE VOS, J. P.; DE FORNEL-THIBAUD, P.; HIRSCHBERGER, J.; KESSLER, M.; PASTOR, J.; PONCE, F.; SAVARY-BATAILLE, K.; ARGYLE D. J. European consensus document on mast cell tumours in dogs and cats. **Veterinary and Comparative Oncology**. Oxford, v. 10, n. 3, p. 1-29, 2012.

BONKOBARA, M. Dysregulation of tyrosine kinases and use of imatinib in small animal practice. **The Veterinary Journal**. London, v. 205, p. 180-188, 2015.

BOSTOCK, D. E. The prognosis following surgical removal of mastocytomas in dogs. **Journal of the Small Animal Practice**. Oxford, v. 14, p. 27-41, 1973.

BOSTOCK, D. E. Neoplasms of the skin and subcutaneous tissues in dogs and cats. **British Veterinary Journal**. London, v. 142, n.1, p. 1-19, 1986.

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

CAILLOU, B.; TALBOT, M.; WEYEMI, U.; PIOCHE-DURIEU, C.; GHUZLAN, A.; BIDAT, J. M.; CHOUAIB, S.; SCHLUMBERGER, M.; DUPUY, C. Tumour-Associated Macrophages (TAMs) form an interconnected cellular supportive network in anaplastic thyroid carcinoma. **PLOS One**. San Francisco, v. 6, p. 1-13, l. 7, 2011.

CAMUS, M.S.; PRIEST, H.L.; KOEHLER, J.W.; DRISKELL, E.A.; RAKICH, P.M.; ILHA, M.R.; KRIMER, P.M. Cytologic Criteria for Mast Cell Tumor Grading in Dogs With Evaluation of Clinical Outcome. **Veterinary Pathology**. Basel, 2016.

CLAUDATUS, J. J.; D'OVIDIO, R.; LOSPALLUTI, M.; MENEGHINI, C.L. Skin tumors and reactive cellular infiltrate: further studies. **Acta Dermato Venereologica**. Stockholm, v. 66, p. 29-34, 1986.

COYLE, V. J.; RASSNICK, K. M. BORST, L. B.; RODRIGUEZ, C. O.; NORTJRUP, N. C.; FAN, T. M.; GARRETT, L. D. Biological behaviour of canine mandibular osteosarcoma. A retrospective study of 50 cases (1999–2007). **Veterinary and Comparative Oncology**, Oxford, 2013.

DALECK, C. R.; DE NARDI, A. B.; RODASKI, S. **Oncologia em Cães e Gatos**, ed. 1, São Paulo: Roca, 2009..

DA SILVA, E. Z. M.; JAMUR, M. C.; OLIVER, C. Mast cell function: a new vision of an old cell. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**. Baltimore, v. 7, p. 1-151, 2014.

DENNIS, M. M.; MCSPORRAN, K. D.; BACON, N. J.; SCHULMAN, F. Y.; FOSTER, R. A.; POWERS, B. E. Prognostic factors for cutaneous and subcutaneous soft tissue sarcomas in dogs. **Veterinary Pathology**. Basel, v. 48, n. 1, p. 73-84, 2011.

DORTA, R.; LANDMAN, G.; KOWALSKI, L.; LAURIS, J.; LATORRE, M.; OLIVEIRA, D. Tumor-associated tissue eosinophilia as a prognostic factor in oral squamous cell carcinomas. **Histopathology**. Oxford, v. 41, p. 152-157, 2002.

DOBSON, J.; COHEN, S.; GOULD, S. Treatment of canine mast cell tumors with prednisolone and radiotherapy. **Veterinary and Comparative Oncology**. Oxford, v. 2, n. 3, p. 132-141, 2004.

DRIEL, W. J. V.; HOGENDOORN, P. C. W.; JANSEN, F.; ZWINDERMAN, A. H.; TRIMBOS, J. B.; FLEUREN, G. J. Tumor-associated eosinophilic infiltrate of cervical cancer is indicative for a less effective immune response. **Human Pathology**. Philadelphia, v. 27, n. 9, p. 904-11, 1996.

DRIEL, W. J. V.; KIEVIT-TYSON, P.; BROEKEN, L.C.; ZWINDERMAN, A. H.; FLEUREN, G. J. Presence of an eosinophilic infiltrate in cervical squamous carcinoma results from a type 2 immune response. **Gynecologic Oncology**. New York, v. 74, n. 2, p. 188-95, 1999.

EDMONDSON, E. F.; HESS, A. M.; POWERS, B. E. Prognostic Significance of Histologic Features in Canine Renal Cell Carcinomas: 70 Nephrectomies. **Veterinary Pathology**. Basel, 2014.

FINNIE, J. W.; BOSTOCK, D. E. Skin neoplasia in dogs. **Australian Veterinary Journal**. Victoria, v. 55, p. 602-604, 1979.

FINORA, K.; LEIBMAN, N. F.; FETTMAN, M. J.; POWERS, B. E.; HACKETT, T. A.; WITHROW, S. J. Cytological comparison of fine-needle aspirates of liver and spleen of normal dogs and of dogs with cutaneous mast cell tumours and an ultrasonographically normal appearing liver and spleen. **Veterinary and Comparative Oncology**. Oxford, v. 4, n. 3, p. 178-183, 2006.

FONSECA-ALVES, C. E.; BENTO, D. D.; TORRES-NETO, R.; WERNER, J.; KITCHELL, B.; LAUFER-AMORIM, R. Ki67/KIT double immunohistochemical staining in cutaneous mast cell tumors from Boxer dogs. **Research in Veterinary Science**. London, v. 102, p. 122-126, 2015.

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

FRENZEL, L.; HERMINE, O. Mast cells and inflammation. **Joint Bone Spine**. Paris, v. 80, p. 141-145, 2013.

FRIMBERGER, A. E.; MOORE, A. S.; CINCOTTA, L., COTTER, S. M.; FOLEY, J. W. Photodynamic therapy of naturally occurring tumors in animals using a novel benzophenothiazine photosensitizer. **Clinical Cancer Research**. Philadelphia, v. 4. p. 2207-2218, 1998.

GERRITSEN, R. J.; TESKE, E.; KRAUS, J. S.; RUTTEMAN, G. R. Multi-agent chemotherapy for mast cell tumours in the dog. **The Veterinary Quarterly**. Dordrecht, v. 20, n. 1, p. 28-31, 1998.

GIANTIN, M.; ARESU, L.; BENALI, S.; ARICO, A.; MORELLO, E. M.; MARTANO, M.; VASCELLARI, M.; CASTAGNARO, M.; LOPPARELLI, R. M.; ZANCANELLA, V.; GRANATO, A.; MUTINELLI, F., DACASTRO, M. Expression of matrix metalloproteinases, tissues inhibitors of metalloproteinases and vascular endothelial growth factor in canine mast cell tumours. **Journal of Comparative Oncology**. London, v. 147, p. 419-429, 2012.

GIEGER, T. L.; THEON, A. P.; WERNER, J. A.; MCENTEE, M. C.; RASSNICK, K. M.; DECOCK, H. E. V. Biologic behavior and prognostic factors for mast cell

tumors of the canine muzzle: 24 cases (1990-2001). **Journal of Veterinary Internal Medicine**. Philadelphia, v. 17, p. 687-692, 2003.

GOLDSMITH, M. M.; BELCHIS, B. A.; CRESSON, D. H.; MERRIT, W.D.; ASKIN, F. B. The importance of the eosinophil in head and neck cancer. **Otolaryngol Head and Neck Surgery**. Rochester, v. 106, n. 1, p. 27-33, 1992.

GOLLAPUDI, K.; COLETTE, G.; GROGAN, T.; ZHANG, H.; SAID, J.W.; HUANG, J.; ELASHOFF, D.; FREEDLAND, S.; RETTIG, M.; ARONSON, J. Association between tumor-associated macrophage infiltration, high grade prostate cancer, and biochemical recurrence after radical prostatectomy. **American Journal of Cancer Research**. Madison, v. 3, p. 523-529, 2013.

GORDON, S. The macrophage: Past, present and future. **European Journal of Immunology**. Weinheim, v.37, p. 9 -17, 2007.

GRABAREVIĆ, Z.; SPOLJAR, J. B.; KURILJ, A. G.;, SOSTARIĆ-ZUCKERMANN, I. C.; ARTUKOVIĆ, B.; HOHSTETER, M.; BECK, A.; DZAJA, P.; STRMECKI, N. M. Mast cell tumor in dogs – incidence and histopathological characterization. **Collegium Antropologicum**. Zagreb, v. 33, n. 1, p. 253-258, 2009.

GRANT, J. A.; RODRIGUEZ, C. O.; KENT, M. S.; SFILGOI, G.; GORDON, I.; DAVIS, G.; LORD, L.; LONDON, C.A. A phase II clinical trial of vinorelbine in dogs with cutaneous mast cell tumors. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. Philadelphia, v. 22, p. 388-393, 2008.

GRAVES, D. T.; JIANG, Y. L.; WILLIAMSON, M. J., VALENTE, A. J. Identification of monocyte chemotactic activity produced by malignant cells. **Science**. Washington, v. 245, p. 1490–1493, 1989.

HAGEMANN, C.; ANACKER, J.; HAAS, S.; RIESNER, D.; SCHOMIG, B.; ERNESTUS, R.; VINCE, G.H. Comparative expression pattern of Matrix-Metalloproteinases in human glioblastoma cell-lines and primary cultures. **BMC Research Notes**. London, v. 293, n. 3, 2002.



HAGEMANN, T.; BISWAS, S. K.; LAWRENCE, T.; SICA, A.; LEWIS, C.E. Regulation of macrophage function in tumors: the multifaceted role of NF- $\kappa$ B. **Blood**. New York, v. 113, n. 14, p. 3139-3146, 2009.

HAHN, K. A.; OGILVIE, G.; RUSK, T.; DEVAUCHELLE, P.; LEBLANC, A.; LEGENDRE, A.; POWERS, B.; LEVENTHAL, P. S.; KINET, P. J.; PALMERINI, F.; DUBREUIL, P.; MOUSSY, A.; HERMINE, O. Masitinib is safe and effective for the treatment of canine mast cell tumors. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. Philadelphia, v. 22, n. 6, p. 1301–1309, 2008.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of Cancer: The next generation. **Cell**. Cambridge, v. 144, 2011.

HEADING, K. L.; BROCKLEY, L. K.; BENNETT, P. F. CCNU (lomustine) toxicity in 27 dogs: a retrospective study (2002–2007). **Australian Veterinary Journal**. Victoria, v. 89, p. 109–116, 2011.

HODI, F. S.; CORLESS C. L.; GIOBBIE-HURDER, A.; FLETCHER, J. A.; ZHU, M.; MARINO-ENRIQUEZ, A.; FRIEDLANDER, P.; GONZALEZ, R.; WEBER, J. S.; GAJEWSKI, T. F.; O'DAY, S. J.; KIM, K. B.; LAWRENCE, D.; FLAHERTY, K. T.; LUKE, J. J.; COLLICHIO, F. A.; ERNSTOFF, M. S.; HEINRICH, M. C.; BEADLING, C.; ZUKOTYNSKI, K. A.; YAP, J. T.; VAN DEN ABEELE, A. D.; DEMETRI, G. D.; FISHER, D. E. Imatinib for melanomas harboring mutationally activated or amplified *kit* arising on mucosal, acral, and chronically sun-damaged skin. **Journal of Clinical Oncology**. New York, v. 31, n. 10, p. 3182-3190, 2013.

HORIUCHI, K.; MISHIMA, K.; OHSAWA, M.; SUGIMURA, M.; AOZASA, K.; Prognostic factors for well-differentiated squamous cell carcinoma in the oral cavity with emphasis on immunohistochemical evaluation. **Journal of Surgical Oncology**. New York, v. 53, p. 92-96, 1993.

HOSOYA, K.; Kisseberth, W.C; Alvarez, F.J., Lara-Garcia, A.; Beamer, G.; Stromberg, P. C.; Couto, C.G. Adjuvant CCNU (lomustine) and prednisone chemotherapy for dogs with incompletely excised grade 2 mast cell tumours. **Journal of the American Animal Hospital Association**. South Bend, v.45, p. 14–18, 2009.

HOSSEINI, E.; PEDRAM, B.; BAHRAMI, A. M.; MOGHADDAM, M. H. J.; JAVANBAKT, J.; GHOMI, F. E.; MOGHADDAM, N. J.; KOOHESTANI, M.; SHAFIEE, R. Cutaneous mast cell tumor (Mastocytoma): cyto- histopathological and haematological investigations. **Diagnostic Pathology**. London, v. 9, 2014.

HUPPES, D. **Padronização da diferenciação *in vitro* e a ativação clássica ou alternativa da linhagem de células humanas U937 em macrófagos**. 2013. 78 f. Dissertação (Mestrado em Medicina) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.

ISHIBASHI, S.; YUSUKE, O.; SUZUKI, T.; MIYAZAKI, S.; MORIYA, T.; SATOMI, S.; SASANO, H. Tumor-associated tissue eosinophilia in human esophageal squamous cell carcinoma. **Anticancer Research**. Highlands, v. 26, p. 1419-1424, 2006.

ISRAEL, C. B.; SANTOS, D. F.; MAUÉS, T.; DE QUEIROZ, G. B.; COSTA, F. B.; DO NASCIMENTO, J. S.; BRUNO, S. F.; FERREIRA, M. L. G. Uso da terapia fotodinâmica empregando azul de metileno a 2% como agente fotossensibilizante para o controle de crescimento tumoral em calopsita (*Nymphicus hollandicus*) portador de sarcoma, **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**. Niterói, v. 21, n. 2, 2014.

JACKSON, D. E.; SELTING, K. A.; SPOOR, M. S.; HENRY, C. J.; WIEDMEYER, C. E. Evaluation of fixation time using Diff-Quik for staining of canine mast cell tumor aspirates. **Veterinary Clinical Pathology**. Santa Barbara, v. 42, n. 1, p. 99-102, 2013.

JAFFE, M. H.; HOSGOOD, G.; TAYLOR, H. W.; KERWIN, S. C.; HEDLUND, C. S.; LOPEZ, M. K.; DAVIDSON, J. R.; MILLER, D. M.; PARANJPE, M. Immunohistochemical and clinical evaluation of p53 in canine cutaneous mast cell tumors. **Veterinary Pathology**. Basel, v. 37, p. 40-46, 2000.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**, 10 ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

KANDEFER-GOLA, M.; MADEJ, J. A.; DZIMIRA, S.; NOWAK, M.; JANUS, I.; CIAPUTA, R. Comparative analysis of markers of cell proliferation in canine

mast cell tumours according to current classifications. **Polish Journal of Veterinary Sciences**. Olsztyn, v. 18, n. 2, p. 241-247, 2015.

KERR, K. M.; JOHNSON, S. K.; KING, G.; KENNEDY, M. M.; WEIR, J.; JEFFREY, R. Partial regression in primary carcinoma of the lung: does it occur? **Histopathology**. Oxford, v. 33, p. 55-63, 1998.

KIUPEL, M.; WEBSTER, J. D.; BILEY, K. L.; BEST, S.; DELAY, J.; DETRISAC, C. J.; FITZGERALD, S. D.; GAMBLE, D.; GINN, P. E.; GOLDSCHMIDT, M. H.; HENDRICK, M. J.; HOWERTH, E. W.; JANOVITZ, E. B.; LANGOHR, I.; LENZ, S. D.; LIPSCOMB, T. P.; MILLER, M. A.; MISDORP, W.; MOROFF, S.; MULLANEY, T. P.; NEYENS, I.; O'TOOLE, D.; RAMOS-VARA, J.; SCASE, T. J.; SCHULMAN, F. Y.; SLEDGE, D.; SMEDLEY, R. C.; SMITH, K.; SNYDER, P. W.; SOUTHORN, E.; STEDMAN, N. L.; STEFICEK, B. A.; STROMBERG, P. C.; VALLI, V. E.; WEISBRODE, S. E.; YAGER, J.; HELLER, J.; MILLER, R. Proposal of a 2-tier histologic grading system for canine cutaneous mast cell tumors to more accurately predict biological behavior. **Veterinary Pathology**. Basel, v. 48, n. 1, p. 147-155, 2011.

KOBAYASHI, M.; KUROKI, S.; ITO, K.; YASUDA, A.; SAWADA, H.; ONO, K.; WASHIZU, T.; BONKOBARA, M. Imatinib-associated tumour response in a dog with a non-resectable gastrointestinal stromal tumour harbouring a c-kit exon 11 deletion mutation. **Veterinary Journal**. London, v. 198, n. 1, p. 271-274, 2013.

KODRE, V.; CEMAZAR, M.; PECAR, J.; SERSA, G.; COR, A.; TOZON, N. Electrochemotherapy compared to surgery for treatment of canine mast cell tumours. **In vivo**. Athens, v. 23, p. 55-62, 2009.

KOUKOURAKIS, M. I. GIATROMANOLAKI, A.; KAKOLYRIS, S.; BYRNE, K. J. O.; APOSTOLIKAS, N.; SKARLATOS, J. Different patterns of stromal and cancer cell thymidine phosphorilase reactivity in non-small cell lung cancer: impact on tumour neo-angiogenesis and survival. **British Journal of Cancer**. London, v. 77, p. 1696-1703, 1998.

KOVALSZKI, A.; WELLER, P. Eosinophilia in mast cell disease. **Immunology and Allergy Clinics of North America**. Philadelphia, v. 32, n. 2, p. 357-364, 2014.

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

KRAHWINKEL, D. J. Cryosurgical treatment of skin diseases. **The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice**. Philadelphia, v. 10, p.787-801, 1980.

KRISHNASWANY, G.; AJITAWI, O.; CHI, D. S. The human mast cell: an overview. **Methods in Molecular Biology**. Totowa, v. 315, p. 13-34, 2006.

KRÓL, M.; MAJCHRZAK, K.; MUCHA, J.; HOMA, A.; BULKOWSKA, M.; JAKUBOWSKA, A.; KARWICKA, M.; PAWLOWSKI, M. K.; MOTYL, T. CSF-1R as an inhibitor of apoptosis and promoter of proliferation, migration and invasion of canine mammary cancer cells. **BMC Veterinary Research**. London, v. 9: 65, 2013.

KÜBLER, K.; AYUB, T.H.; WEBER, S.; ZIVANOVIC, O., ABRAMIAN, A.; KEYVER-PAIK, M.D.; MALLMAN, M.R.; KAISER, C.; SERÇE, N.B.; KUHN, W.; RUDLOWSKI, C. Prognostic significance of tumor-associated macrophages in endometrial adenocarcinoma. **Gynecologic Oncology**. New York, 2014.

LEEK, R. D.; LEWIS, C. E.; WHITEHOUSE, R.; GREENALL, M.; CLARKE, J.; JARRIS, A. I. Association of macrophage infiltration with angiogenesis and prognosis in invasive breast carcinoma. **Cancer Research**. Philadelphia, v. 56, p.4626-4629, 1996.

LEEK, R. D.; HUNT, N. C.; LANDERS, R. J.; LEWIS, C. E.; ROYDS, J. A.; HARRIS, A. L. Macrophage infiltration is associated with VEGF and EGFR expression in breast cancer. **Journal of Pathology**. Edinburgh, v. 190, p. 430-436, 2000.

LEIDINGER, E. F.; FREEMAN, K.; KIRTZ, G.; HOOIJBERG, E. H.; SICK, K. Breed related odds ratios and anatomic distribution of canine mast cell tumours in Austria: retrospective study of cases in the years 2000-2010. **Tierärztliche Praxis Kleintiere**. Stuttgart, v. 42, p. 367-373, 2014.

LEITE, C. A. V. G.; COSTA, J. V. G.; CALLADO, R. B.; TORRES, J. N.; LIMA JUNIOR, R. C. P.; RIBEIRO, R. A. Receptores tirosina-quinase: implicações terapêuticas no câncer. **Revista Brasileira de Oncologia Clínica**. Belo Horizonte, v. 8, n. 29, 2012.

LELYVELD, S.V.; WARLAND J.; MILLER R.; MAW, H.; FOALE, R.; GOODFELLOW, M.; DOBSON, J. Comparison between Ki-67 index and mitotic index for predicting outcome in canine mast cell tumours. **Journal of Small Animal Practice**. Oxford, v. 56, p. 312-319, 2015.

LETARD, S.; YANG, Y.; HANSSSENS, K.; PALMÉRINI, F.; LEVENTHAL, P. S.; GUÉRY, S.; MOUSSY, A.; KINET, J. P.; HERMINE, O.; DUBREUIL, P. Gain-of-function mutations in the extracellular domain of KIT are common in canine mast cell tumors. **Molecular Cancer Research**. Philadelphia, v. 6; n. 7, p. 1137-1145, 2008.

LINS, R. A. B. A distribuição dos eosinófilos nas diferentes fases de evolução do granuloma hepático em camundongos infectados pelo *Schistosoma mansoni*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. Brasília, v. 41, n. 2, p. 173-178, 2008.

LIU, Z.; ZHOU, X.; SHAPIRO, S. D.; SHIPLEY, J. M.; TWINING, S. S.; DIAZ, L. A.; WERB, Z. The serpin  $\alpha$ 1-proteinase inhibitor is a critical substrate for gelatinase B/MMP-9 in vivo. **Cell**. Cambridge, v. 102, n. 5, p. 647-655, 2000.

LONDON, C. A.; MALPAS, B. P.; WOOD-FOLLIS, S. L.; BOUCHER, F. J.; RUSK, W. A.; ROSENBERG, P. M.; HENRY, J. C.; MITCHENER, L.; KLEIN, K. M.; HINTERMEISTER, G. J.; BERGMAN, J. P.; COUTO, C. G.; MAULDIN, N. G.; MICHELS, M. G. Multi-center, placebo-controlled, double-blind, randomized study of oral toceranib phosphate (SU11654), a receptor tyrosine kinase inhibitor, for the treatment of dogs with recurrent (either local or distant) mast cell tumor following surgical excision. **Clinical Cancer Research**. Philadelphia, v. 15, n. 11, p. 3856–3865, 2009.

LOUKOPOULOS, P.; MUNGALL, B. A.; STRAW, R. C.; THORNTON, J.; ROBINSON, W. F. Matrix metalloproteinase-2 and -9 involvement in canine tumors. **Veterinary Pathology**. Basel, v. 40, n. 4, p. 382-394, 2003.

LOWE, D.; JORIZZO, J.; HUTT, M. Tumour-associated eosinophilia: a review. **Journal of Clinical Pathology**. London, v. 34, p. 1343 – 1348, 1981.

LOWE, R.; GAVAZZA, A.; IMPELLIZERI, J. A.; SODEN, D. M.; LIBAS, G. The treatment of canine mast cell tumours with electrochemotherapy with or without surgical excision. **Veterinary and Comparative Oncology**. Oxford, 2016.

MACY, D. W. Canine mast cell tumors. **Vet Clin North Am Small**. Philadelphia, v. 15, n. 4, p. 783-803, 1985.

MAGLENNON, G.A.; MURPHY, S.; ADAMS, V.; MILLER, J.; SMITH, K.; BLUNDEN, A.; SCASE, T.J. Association of Ki67 index with prognosis for intermediate-grade canine cutaneous mast cell tumours. **Veterinary and Comparative Oncology**. Oxford, v. 6, n. 4, p. 268-274, 2008.

MAHMOUD, S. M. LEE, A.H.; PAISH, E. C.; MACMILLAN, R. D.; ELLIS, I. O.; GREEN, A. R. Tumour-infiltrating macrophages and clinical outcome in breast cancer. **Journal of Clinical Pathology**. London, v. 65, p. 159-163, 2012.

MARCONATO, L.; GIULIANO, B.; GIORGIO, R.; CESARI, A.; ZATELLI, A.; ZINI, E. Clinicopathological features and outcome for dogs with mast cell tumors and bone marrow involvement. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. Philadelphia, v. 22, n. 4, p. 1001–1007, 2008a.

MARCONATO, L.; MARCHETTI, V.; FRANCIONE, D.; MASSERDOTTI, C.; GREGORI, R.; LEOTTA, R.; ABRAMO, F. Morphometrical approach for predicting regional lymph node micrometastatic load in canine mast cell tumours: Preliminary results. **Veterinary and Comparative Oncology**. Oxford, v. 6, n. 3, p. 162–170, 2008b.

MARCONATO, L.; ZORZAN, E.; GIANTIN, M.; DI PALMA, S.; DACASTO, M. Concordance of c-kit mutational status in matched primary and metastatic cutaneous canine mast cell tumors at baseline. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. Philadelphia, v. 28, p. 547-553, 2014.

MCCAWE, D. L.; MILLER, M. A.; OLGIVIE, G. K.; WITHROW, S. J.; BREWER, W. G. J.; KLEIN, M. K.; BELL, F. W.; ANDERSON, S. K. Response of canine mast cell tumors to treatment with oral prednisone. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. Philadelphia, v. 8, n. 6, p. 406-408, 1994.

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

MILLER, R.L.; VAN LELYVELD, S.; WARLAND, J.; DOBSON, J. M.; FOALE, R. D. A retrospective review of treatment and response of high-risk mast cell tumours in dogs. **Veterinary and Comparative Oncology**. Oxford, 2014.

MISDORP, W. Mast Cells and canine mast cell tumours: A review. **Veterinary Quarterly**. Dordrecht, v. 26, p. 156-169, 2004.

MITCHELL, C. J.; CHURCHWARD-VENNE, T. A.; WEST, D. W.; BURD, N. A.; BREEN, L. BAKER, S. K.; PHILLIPS, S. M. Resistance exercise load does not determine training-mediated hypertrophic gains in young men. **Journal of Applied Physiology**. Bethesda, v. 113, n. 1, p. 71-77, 2012.

MOSSER, D. M.; EDWARDS, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. **Nature**. London, v. 8, 2008.

MROZ, P.; VATANSEVER, F.; MUCHOWICZ, A.; HAMBLIN, M. R. Photodynamic therapy of murine mastocytoma induces specific immune responses against the cancer/testis antigen P1 A. **Cancer Research**. Philadelphia, v. 73, n. 21, 2013.

MUKARATIRWA, S. Prognostic and predictive markers in canine tumours: rationale and relevance – a review. **Vet Q**. v. 27, p. 52-64, 2005.

MULLER, A.; GUAGUÈRE, E.; DEGORCE-RUBIALES, F. **Terapêutica Dermatológica do Cão**. Ed. 1, São Paulo: Roca, 2005.

MURDOCH, C.; GIANNOUDIS, A.; LEWIS, C. E. Mechanisms regulating the recruitment of macrophages into hypoxic areas of tumors and other ischemic tissues. **Blood**. New York, v. 104, p. 2224–2234, 2004.

MURPHY S.; Sparkes, A. H.; Blunden, A. S.; Brearley, M. J.; Smith, K. C. Effects of stage and number of tumours on prognosis of dogs with cutaneous mast cell tumours. **Veterinary Record: Journal of the British Veterinary Association**. London, v. 158, n. 9, p. 287-291, 2006.

NORTHRUP, N. C.; ROBERTS, R. E.; HARRELL, T. W. et al: Iridium-192 interstitial brachytherapy as adjunctive treatment for canine cutaneous mast cell tumors, **Journal of the American Animal Hospital Association**. South Bend, v. 40, p. 309-315, 2004.

NORTHRUP, N. C.; HOWERTH, E. W.; HARMON, B. G.; BROWN, C. A.; CARMICHEAL, K. P.; GARCIA, A. P.; LATIMER, K. S.; MUNDAY, J. S.; RAKISH, P. M.; RICHEY, L. J.; STEDMAN, N. L.; GIEGER, T. L. Variation among pathologists in the histologic grading of canine cutaneous mast cell tumors with uniform use of a single grading reference. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. Columbia, v. 17, n.6, p. 561–564, 2005.

OHASHI, Y.; ISHIBASHI, S.; SUZUKU, T.; SHINEHA, R.; MORIYA, T.; SATOMI, S.; SASANO, H. Significance of tumor associated tissue eosinophilia and other inflammatory cell infiltrate in early esophageal squamous cell carcinoma. **Anticancer Research**. Highlands, v. 20, p. 3025-3030, sep-oct. 2000.

ORRE, M.; ROGERS, P. A. W. Macrophages and microvessel density in tumours of the ovary. **Gynecologic Oncology**. New York, v. 73, p. 47 – 50, 1999.

ONUCHIC, A. C.; CHAMMAS, R. Câncer e o microambiente tumoral. **Revista de Medicina (São Paulo)**. São Paulo, v. 89, n. 1, p. 21-31, 2010.



PARDANANI, A. Systemic mastocytosis in adults: 2013 update on diagnosis, risk stratification, and management. **American Journal of Hematology**. New York, v. 88, n. 7, p. 612-624, 2013.

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

PATRUNO, R.; MARECH, I.; ZIZZO, N.; AMMENDOLA, M.; NARDULLI, P.; GADALETA, C.; INTRONA, M.; CAPRIUOLO, G.; RUBINI, R. A.; RIBATTI, D.; GADALETA, C. D.; RANIERI, G. c-Kit expression, angiogenesis, and grading in canine mast cell tumour: a unique model to study c-Kit driven human malignancies. **Biomed Research International**. Tokyo, v. 2014, 2014.

PEDRAZA, F.; GRANDI, F.; ROCHA, N.S. The need for cytologic/histologic correlation studies to establish a cytologic grading system for canine mast cell tumors in veterinary medicine. **Veterinary Clinical Pathology**. Santa Barbara, v. 40, p. 280–281, 2011.

PEREIRA, R. S.; SCHWEIGERT, A.; DIAS DE MELO, G.; FERNANDES F. V.; SUEIRO, F. A. R.; MACHADO, G. F. Ki-67 labeling in canine perianal glands neoplasms: a novel approach for immunohistological diagnostic and prognostic. **BMC Veterinary Research**. London, v. 9, p. 83, 2013.

POGGIANI, S. S. C., TERRA, E.M., NETO, R.T. COSTA, M.T., AMORIM, R.L. Canine cutaneous mast cell tumor: Biologic Behavior and Its Correlation with Prognostic Indicators. **Open Journal of Veterinary Medicine**. Trípoli, v. 2, p. 255-261, 2012..

POIRIER, V. J.; ADAMS, W. A.; FORREST, L. J.; GREEN, E. M.; DUBIELZIG, R. R.; VAIL, D. M. Radiation therapy for incompletely excised grade II canine mast cell tumors. **Journal of the American Animal Hospital Association**. South Bend, v. 42, n. 6, p. 430-434, 2006.

PULZ, L. H.; BARRA, C. N.; KLEEB, S. R.; XAVIER, J. G.; CATÃO-DIAS, J. L.; SOBRAL, R. A.; FUKUMASU, H. ; STREFEZZI, R. F. . Increased expression of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 correlates with improved outcome in

canine cutaneous mast cell tumours. **Veterinary and Comparative Oncology**. Oxford, v. 14, 2016.

RAPOSO, T.; GREGÓRIO, H.; PIRES, I.; PRADA, J.; QUEIROGA, F. L. Prognostic value of tumour-associated macrophages in canine mammary tumours. **Veterinary and Comparative Oncology**. Oxford, v. 12, p. 10-19, 2012.

RAPOSO, T. P.; PIRES, I.; CARVALHO, M. I.; PRADA, J.; ARGYLE, D. J.; QUEIROGA, F. L. Tumour-associated macrophages are associated with vascular endothelial growth factor expression in canine mammary tumours. **Veterinary and comparative oncology**. Oxford, v. 13, n. 4, p. 464-474, 2013.

RASSNICK, K. M.; BAILEY, D. B.; FLORY, A. B.; BALKMAN, C. E.; KISELOW, M. A.; INTILE, J. L.; AUTIO, K. Efficacy of vinblastine for treatment of canine mast cell tumors. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. Philadelphia, v. 22, n. 6, p. 1390–1396, 2008.

RECH, R. R.; GRAÇA, D. L.; KOMMERS, G. D.; SALLIS, E. S. V.; RAFFI, M. B.; GARMATZ, S. L. Mastocitoma cutâneo canino. Estudo de 45 casos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. Belo Horizonte, v. 56, n. 4, p. 441-448, 2004.

RIABOV, V., GUDIMA, A., WANG, N., MICKLEY, A., OREKHOV, KZHYSHKOWSKA, J. Role of tumor associated macrophages in tumor angiogenesis and lymphangiogenesis. **Frontiers in physiology**. Lausanne, v. 5, a. 75, p. 1-13, march. 2014.

RISSELADA, M.; MATHEWS, K. G.; GRIFFITH, E. Surgically planned versus histologically measured lateral tumor margins for resection of cutaneous and subcutaneous mast cell tumors in dogs: 46 cases (2010-2013). **Journal of American Veterinary Medical Association**. Chicago, v. 247, n. 2, p.184-189, 2015.

ROMANSIK, E. M.; REILLY, C. M.; KASS, P.H.; MOORE, P. F.; LONDON, C. A. Mitotic index is predictive for survival for canine cutaneous mast cell tumors. **Veterinary Pathology**. Basel, v.44, p. 335-341, 2007.

SAKAI, H.; NODA, A.; SHIRAI, N.; IDAKA, T.; YANAI, T.; MASEGI, T.; Proliferative activity of canine mast cell tumours evaluated by bromodeoxyuridine incorporation and Ki-67 expression. **Journal of Comparative Pathology**. Liverpool, v.127, p. 233-238, 2002.

SALGADO, N. A radioterapia no tratamento oncológico: prática clínica e sensibilidade cultural. **Interações**. Campo Grande, v. 22, p. 39-57, 2012.

SALVESEN H. B.; IVERSEN, O. E.; AKSLEN, L. A. Prognostic significance of angiogenesis and Ki-67, p53, and p21 expression: a population-based endometrial carcinoma study. **Journal of Clinical Oncology**. New York, v. 17, n. 5, p. 1382-1390, 1999.

SANTOS, A. A.; LOPES, C. C.; RIBEIRO, J. R. Identification of prognostic factors in canine mammary malignant tumours: a multivariable survival study. **BMC Veterinary Research**. London, v. 9, p. 1, 2013.

SCARPA, F; SABATTINI, S.; BETTINI, G. Cytological grading of canine cutaneous mast cell tumours. **Veterinary And Comparative Oncology**. Oxford, 2014.

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

SCHULTEISS, P. C.; GARDINER, D. W.; RAO, S.; OLEA-POPELKA, F.; TUOHY, J. L. Association of histologic tumor characteristics and size of surgical margins with clinical outcome after surgical removal of cutaneous mast cell tumors in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. Chicago, v. 238, p. 1464-1469, 2011.

SCOTT, R.J. et al. A comparison of immunohistochemical markers of cell proliferation with experimentally determined growth fraction. **Journal of Pathology**. Edinburgh, v.165, p.173- 178, 1991.

SCOTT, D. W.; MILLER, W. H.; GRIFFIN, C. G. **Small Animal Dermatology**, 6. ed., Saint Louis: W. B. Saunders, 2001.

SELLERA, F. P.; GARGANO, R. G.; POGLIANI, F. C. Terapia fotodinâmica: revisão de literatura. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia**. São Paulo, v. 12, n. 1, 2014.

SIMOES, J. P. C.; SCHONING, P.; BUTINE, M. Prognosis of canine mast cell tumors: a comparison of three methods. **Veterinary Pathology**. Basel, v. 31, n. 6, p. 637-647, 1994.

SLEECKX, N.; VAN BRANTEGEM, L.; VAN DEN EYNDEN, G.; FRANSEN, E.; CASTELEYN, C.; VAN CRUCHTEN, S.; KROEZE, E. V.; VAN GINNEKEN, C. Lymphangiogenesis in canine mammary tumours: a morphometric and prognostic study. **Journal of Comparative Pathology**. Liverpool, v. 150, p. 184-193, 2014.

SPUGNINI, E.P.; VINCENZI, B.; BALDI, F.; CITRO, G.; BALDI, A. Adjuvant eletrochemotherapy for the treatment of incompletely resected canine mast cell tumors. **Anticancer Research**. Highlands, v. 26, p. 4585-4590, 2006.

STEFANELLO, D.; BURACCO, P.; SABATTINI, S.; FINOTELLO, R.; SCASE, T.; DI PALMA, S.; BETTINI, G.; FERRARI, R.; MARTANO, M.; GATTINO, F.; MARRINGTON, M.; MAZZOLA, M.; ELISABETTA VASCONI, M.; ANNONI, M.; MARCONATO, L. Comparison of 2- and 3-category histologic grading systems for predicting the presence of metastasis at the time of initial evaluation in dogs with cutaneous mast cell tumors: 386 cases (2009–2014) . **Journal of the American Veterinary Medical Association**. Chicago, v. 246, n. 7, p. 765-769, 2015.

STITES, D. P. Terr Al. **Basic and Clinic Immunology**, 8 ed.: editora Applenton & Longe, 1994.

STREFEZZI, R.F.; XAVIER, J.G.; CATAO-DIAS, J.L. Morphometry of canine cutaneous mast cell tumors. **Veterinary Pathology Online**. New York, v. 30, n. 3, p. 268-275, 2003.

STREFEZZI, R.F. **Indicadores prognósticos para mastocitomas: estudo morfológico e imunoistoquímico**. 2007. 93 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

STREFEZZI, R.F.; KLEEB, S.R.; XAVIER, J.G.; CATAO-DIAS, J.L. Prognostic indicators for mast cell tumors. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**. Belo Horizonte, v. 2, p. 110-121, 2009.

STREFEZZI, R.F., et al. Nuclear morphometry in cytopathology: a prognostic indicator for canine cutaneous mast cell tumors. **Journal Veterinary Diagnostic Investigation**. Columbia, v. 21, n. 6, p. 821-5, nov. 2009.

STREFEZZI, R.F., KLEEB, S. R.; XAVIER, J. G.; DIAS, J. L. C. Avaliação da proliferação celular como indicador prognóstico para mastocitomas cutâneos caninos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. Seropédica, v. 30, n. 7, p. 559-565, jul. 2010.

SUYANI, E.; SUCAK, G. T.; AKYÜREK, N.; SAHIN, S.; BAYSAL, N. A.; YAGCI, M.; HAZNEDAR, R. Tumor-associated macrophages as a prognostic parameter in multiple myeloma. **Annals of Hematology**. Berlin, v. 92, p. 669-677, 2013.

SUZUKI, D. O. H.; ANSELMO, J.; OLIVEIRA, K. D.; FREYTAG, J. O.; RANGEL, M. M. M.; MARQUES, J. L. B.; RAMOS, A. Numerical model of dog mast cell tumor treated by electrochemotherapy. **Artificial Organs**. Cleveland, v. 39, n. 2, 2015.

TAKANAMI, M.; TAKEUCHI, K.; KODAIRA, S. Tumor-associated macrophage infiltration in pulmonary adenocarcinoma: association with angiogenesis and poor prognosis. **Oncology**. Basel, v. 57, p. 138-142, 1999.

TAKANAMI, I.; TAKEUCHI, K.; GIKA, M. Immunohistochemical detection of eosinophilic infiltration in pulmonary adenocarcinoma. **Anticancer Research**. Highlands, v. 22, p. 2381-2396, 2002.

TAKEUCHI, Y.; FUJINO, Y.; WATANABE, M.; NAKAGAWA, T.; TAKEUCHI, A.; BONKOBARA, M.; KOBAYASHI, T.; OHNO, K.; UCHIDA, K.; ASANO, K.; NISHIMURA, R.; NAKAYAMA, H.; SUGANO, S.; OHASHI, Y. TSUJIMOTO, H. Validation of the prognostic value of histopathological grading or c-kit mutation in canine mast cell tumours: a retrospective cohort study. **Veterinary Journal**. London, v. 196, n.3, p. 492-498, 2013.

TATAROGLU, C.; KARGI, A.; OZKAL, S.; ESFREFOLGU, N.; AKKOÇLU, A. Association of macrophages, mast cells and eosinophil leukocytes with angiogenesis and tumor stage in non-small cell lung carcinomas (NSCLC). **Lung Cancer**. Limerick, v. 43, p. 47-54, 2004.

TAYLOR F.; GEAR, R.; HOATHER, T.; et al: Chlorambucil and prednisolone chemotherapy for dogs with inoperable mast cell tumours: 21 cases, **Journal of Small Animal Practice**. Oxford, v. 50, p. 284-289, 2009.

TEICHER, B. Antitumor alkylating agents In: DEVITA, V. (Ed.). **Cancer: principles and practice of oncology**. 5th ed. Philadelphia, PA: Lippincott-Raven, 1997. p. 405–418.

THAMM, D. H., TUREK, M. M., VAIL, D. M. Outcome and prognostic factors following adjuvant prednisone/vinblastine chemotherapy for high-risk canine mast cell tumour: 61 cases. **The Journal of Veterinary Medical Science**. Tokyo, v.68, p. 581-587, 2006.

THAMM, D. H.; VAIL, D. M. Mast cell tumours. In: **Small Animal Clinical Oncology**. 5. ed. Missouri: Saunders Elsevier, 2007, p. 402 – 424.

TSUTSUI, S.; YASUDA, K.; SUZUKI, K.; TAHARA, K.; HIGASHI, H.; ERA, S. Macrophage infiltration and its prognostic implications in breast cancer: the relationship with VEGF expression and microvessel density. **Oncology Reports**. Athens, v. 14, p. 425-431, 2005.

UTRERA-BARILLAS, D.; CASTRO-MANRREZA, M.; CATELLANOS, E.; GUTIÉRREZ-RODRÍGUEZ, M.; DE ESPARZA, O. A.; GARCÍA-CEBADA, J.; VELAZQUEZ, J.R.; FLORES-RESÉNDIZ, D.; HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ, D.; BENÍTEZ-BRIBIESCA, L. The role of macrophages and mast cells in lymphangiogenesis and angiogenesis in cervical carcinogenesis. **Experimental and Molecular Pathology**. New York, v.89, 190-196, 2010.

VASCELLARI, M. M.; GIANTIN, K.; CAPELLO, A.; CARMINATO, E. M.; MORELLO, A.; VERCELLI, A.; GRANATO, P.; BURACCO, M.; DACASTO, F.; MUTINELLI. Expression of Ki67, BCL-2, and COX-2 in Canine Cutaneous Mast Cell Tumors: Association With Grading and Prognosis. **Veterinary Pathology**. Basel, v. 50, n. 1, p. 110-121, 2013.

VENGE, P.; DAHL, R. FREDENS, K.; HALLGREN, R.; PETERSON, C. Eosinophilic cationic proteins (ECP and EPX) in health and disease. In: YOSHIDA, T., TORISU, M. **Immunobiology of the eosinophil**. Amsterdam: Elsevier; 1983. P. 163-178.

VERWEIJ, J.; CASALI, P. G.; ZALCBERG, J.; LECESNE, A.; REICHARDT, P.; BLAY, J. Y.; ISSELS, R.; HOGENDOORN, P. C.; VAN GLABBEKE, M.; BERTULLI, R.; JUDSON, I. Progression-free survival in gastrointestinal stromal tumours with high-dose imatinib: randomized trial. **Lancet**. London, v. 364, p. 1127-1134, 2004.

VILLAMIL, J.A., HENRY, C.J., BRYAN, J.N., ELLERSIECK, M., SCHULTZ, L., TYLER, J.W., HAHN, A.W. Identification of the most common cutaneous neoplasms in dogs and evaluation of breed and age distributions for selected neoplasms. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. Chicago, v. 239, n. 7, 960–965, 2011.

WARLAND, J.; DOBSON, J. Breed predispositions in canine mast cell tumour: a single centre experience in the United Kingdom. **The Veterinary Journal**. London, v. 197 p. 496-498, 2013.

WEBSTER, J. D.; YUZBASCIYAN-GURKAN, V.; MILLER, R. A.; KANEENE, J. B.; KIUPEL, M. Cellular proliferation in canine cutaneous mast cell tumors:

associations with c-kit and its role in prognostication. **Veterinary Pathology**. Basel, v. 44, p. 298-308, 2007.

WEISHAAR, K.M.; THAMM, D. H.; WORLEY, D. R.; KAMSTOCK, D. A. Correlation of nodal mast cells with clinical outcome in dogs with mast cell tumour and a proposed classification system for the evaluation of node metastasis. **Journal of Comparative Pathology**. Liverpool, v. 151, p. 329-338, 2014.

WELLE, M. M.; BLEY, C.R.; HOWARD, J.; RÜFENACHT, S. Canine mast cell tumours: a review of the pathogenesis, clinical features, pathology and treatment. **Vet. Dermatol.** Oxford and New York, v. 19, p. 321–339, 2008.

WHITE, C. R.; HOHENHAUS, A. E.; KELSEY, J.; PROCTER-GRAY, E. Cutaneous mast cell tumors: associations with spay/neuter status, breed, body size, and phylogenetic cluster. **Journal of the American Animal Hospital Association**. South Bend, v. 47, n. 3, p. 210-216, 2011.

WITHROW, S. J.; VAIL, D. M.; LAGE, R. L. **Small Animal Clinical Oncology**, 5. ed. Missouri: Elsevier Saunders, 2013.

WU, H., T. Hayashi, and M. Inoue,: Immunohistochemical expression of p27 and p21 in canine cutaneous mast cell tumors and histiocytomas. **Veterinary Pathology**. Basel, v. 41, p. 296–299, 2004.

WU, H.; HAYASHI, T.; INOUE, M. Immunohistochemical expression of Mdm2 and p53 in canine cutaneous mast cell tumours. **Journal of Veterinary Medicine Series A. Physiology, Pathology and Clinical Medicine**. Berlin, v. 53, n. 2, p. 65-68, 2006.

YOUNG, B.; LOWE, J. S.; STEVENS, A.; HEATH, J. W. Tecidos conjuntivos e de sustentação. In: **Histologia funcional**. 2. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, cap. 4, p. 65-81, 2007



YUAN, Z.; LUO, R.; PENG, R.; WANG, S.; XUE, C. High infiltration of tumor-associated macrophages in triple-negative breast cancer is associated with a higher risk of distant metastasis. **Onco Targets and Therapy**. Auckland, v. 7, p. 1475-1480, 2014.

YURI, P.; HENDRI, A. Z.; DANARTO, R. Association between tumor-associated macrophages and microvessel density on prostate cancer progression. **Prostate International**. Seoul, v. 3, p. 93-98, 2015.

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

ZHOU, Q.; PENG, R. Q.; WU, X. J.; XIA, Q.; HOU, J. H.; DING, Y.; ZHOU, Q. M.; ZHANG, X.; PANG, Z. Z.; WAN, D. S.; ZENG, Y. X.; ZHANG, X. S.. The density of macrophages in the invasive front is inversely correlated to liver metastasis in colon cancer. **Journal of Translational Medicine**. London, p. 8-13, 2010.