

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

Natália Goulart Leite

**QUANTIFICAÇÃO DOS MACRÓFAGOS M1 E M2 ASSOCIADOS A  
MASTOCITOMAS CUTÂNEOS CANINOS**

---

Pirassununga

2022

Natália Goulart Leite

**QUANTIFICAÇÃO DOS MACRÓFAGOS M1 E M2 ASSOCIADOS A  
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 Biociência Animal.

Área de Concentração: Prevenção diagnóstico e terapias Inovadoras.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo de Francisco Strefezzi.

---

Pirassununga

2022

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

L533q Leite, Natália Goulart  
Quantificação dos macrófagos M1 e M2 associados a mastocitomas cutâneos caninos / Natália Goulart Leite ; orientador Ricardo de Francisco Strefezzi. -- Pirassununga, 2022. 84 f.

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

1. Mastocitoma. 2. Macrófagos associados ao tumor. 3. Prognóstico. 4. CD163. I. Strefezzi, Ricardo de Francisco, orient. II. Título.



## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "QUANTIFICAÇÃO DOS MACRÓFAGOS M1 E M2 ASSOCIADOS A MASTOCITOMAS CUTÂNEOS CANINOS", protocolada sob o CEUA nº 7606111019 (ID 001346), sob a responsabilidade de **Ricardo de Francisco Strefezi e equipe; Natália Goulart Leite** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo - FZEA/USP (CEUA/FZEA) na reunião de 14/11/2019.

We certify that the proposal "M1 and M2 macrophages quantification in canine cutaneous mast cell tumors", utilizing 100 Dogs (males and females), protocol number CEUA 7606111019 (ID 001346), under the responsibility of **Ricardo de Francisco Strefezi and team; Natália Goulart Leite** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Animal Science and Food Engineering - (São Paulo University) (CEUA/FZEA) in the meeting of 11/14/2019.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa \(Acadêmica\)](#)

Vigência da Proposta: de [10/2019](#) a [07/2022](#)

Área: [Biociência Animal](#)

Origem: [Unidade Didático Clínico Hospitalar da FZEA](#)

Espécie: [Cães](#)

sexo: [Machos e Fêmeas](#)

idade: [0 a 20 anos](#)

N: [100](#)

Linhagem: [qualquer](#)

Peso: [0 a 100 kg](#)

Local do experimento: Laboratório de Patologia da UDCH

Pirassununga, 28 de novembro de 2019

Profa. Dra. Daniele dos Santos Martins  
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da  
Universidade de São Paulo - FZEA/USP

Profa. Dra. Cristiane Gonçalves Titto  
Vice-Cordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da  
Universidade de São Paulo - FZEA/USP

Natália Goulart Leite

**QUANTIFICAÇÃO DOS MACRÓFAGOS M1 E M2 ASSOCIADOS A 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 Biociência Animal.

**Data da aprovação** \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_

**Banca Examinadora:**

**Prof. Dr.** \_\_\_\_\_

**Instituição:** \_\_\_\_\_

**Julgamento:** \_\_\_\_\_

**Prof. Dr.** \_\_\_\_\_

**Instituição:** \_\_\_\_\_

**Julgamento:** \_\_\_\_\_

**Prof. Dr.** \_\_\_\_\_

**Instituição:** \_\_\_\_\_

**Julgamento:** \_\_\_\_\_

Aos meus avós, Maria e Francisco Leite, os grandes responsáveis por todas as minhas conquistas.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, ao mestre Jesus e toda espiritualidade, por me forjar forças e competências até aqui.

Em especial aos meus avós Maria e Francisco Leite, que são os grandes responsáveis por eu chegar até aqui, sempre me apoiando, incentivando em minhas decisões. Meus avós que embora não tenham diploma de mestre, são mestres na vida, mestres em amor aos filhos, netos, e ao próximo. Mestres em dedicação a família, mestres em ensinar e dar exemplo com suas vivências e experiências para que nós nos tornássemos pessoas melhores. Tenho muito orgulho de ser neta de vocês, vocês representam muito pra mim, amo vocês!

Ao meu vô, Francisco Leite: vô obrigada por acreditar em meus sonhos e me auxiliar em todas as etapas, para que eu chegasse até aqui. O senhor é meu maior exemplo de hombridade, honestidade, garra, força e perseverança. Seu exemplo de vida me motiva todos os dias a acordar e ir em busca dos meus sonhos. Obrigada pelo seu amor e cuidado paternal, desde sempre. Se hoje sou quem sou, é graças ao senhor. Te amo, infinitamente.

A minha vó Maria: vó, há 9 anos a senhora foi morar do lado certo da vida eterna, quando isso tudo ainda estava no início, era o primeiro ano da minha graduação, sei o quanto sempre vibrou por minhas conquistas, sempre me apoiando e incentivando. Hoje não estamos mais unidas pelos laços da carne, mas certamente pelo elo indestrutível do amor. Obrigada por tudo! Tenho certeza que onde estiver está sempre torcendo para meu sucesso profissional e pessoal.

Aos meus filhinhos amados: Pompom, Lininhu e Ísis, cada qual com seu jeitinho singular de ser, que me ensinaram e ensinam, cotidianamente, a ser um ser humano melhor, olhar a vida de um modo mais amoroso, com mais leveza, a perceber que a felicidade é simples, a aproveitar em plenitude cada pequeno momento e, sobretudo, me ensinando a lição mais valorosa de todas: o amor, na sua expressão mais genuína. Vocês são minha fonte de inspiração para que eu possa me tornar uma profissional melhor, amo vocês, incomensuravelmente.

Lininho, meu amado filhinho, gostaria de registrar aqui a gratidão pela oportunidade de ter sido sua mãe durante seus três anos e meio aqui na terra. Não há palavras em nosso vernáculo que descreva tudo que você significa para mim. Você é luz, meu sol de girassol, que brilhará para todo sempre, em meu coração. Obrigada por ter me acompanhado durante praticamente todo esse período, por ser meu companheirinho de todas as horas. Você me fez sorrir, amar, aprender e conjugar tantos outros verbos que tornaram essa vida válida. Sua presença em minha vida foi suficiente para mudar a minha existência, para todo o sempre. Nossos laços estão perpetuados, pela trama do amor.

A Cida Pontes, que chegou de mansinho em minha vida, com suas palavras e atitudes amorosas, de apoio, incentivo e motivação. Você que me ensinou que não são os laços de sangue que formam uma família, mas sim o afeto, a sinceridade, o cuidado e o amor. Obrigada por estar comigo nessa jornada incrível e desafiadora, que é a vida.

Aos afetos sinceros que a FZEA me deu: Jessika Daniel e Wellington Bessi, que muitas vezes foram minha família aqui, em Pirassununga. Vocês que choraram meu choro, riram o meu riso e compartilharam comigo momentos tão significativos, desafiadores, tristes e alegres. A amizade de vocês representa uma conquista maior do que qualquer título acadêmico. Desejo que no horizonte de nossos caminhos sempre haja um espaço para nossa amizade.

A querida Lindsay, que nesse período foi muito mais do que técnica do laboratório, foi uma amiga, conselheira, ouvinte. Obrigada por toda ajuda técnica, mas sobretudo, pelo seu afeto e acolhimento de sempre. Agradeço pela oportunidade de compartilhar um tempo e espaço com uma pessoa tão especial, como você.

Aos colegas de laboratório, Paulo Martinelli e Thiago Vargas pela partilha de conhecimento, conversas, auxílio na pesquisa e bons momentos juntos. Assim como os demais que de algum modo colaboraram na execução desse trabalho.

Por último, mas não menos importante, ao meu orientador professor Ricardo de Francisco Strefezzi, primeiramente por ter me aceitado orientar, depois pela paciência, ensinamentos e oportunidade de crescer profissionalmente. Por me ensinar a pesquisar, me estimular a pensar, sempre solícito em tirar minhas dúvidas e, com certeza, um dos



principais responsáveis por esse trabalho. Obrigada pela oportunidade de aprender com você, ainda que a passos lentos. Você é um exemplo de profissional para mim.

E aos animais, que são minha fonte de inspiração. Sem eles a vida não teria tanto sentido. É por eles e para eles que busco aprender e me aprimorar, a cada dia. Por eles que continuarei sempre a estudar, no intuito de lhes proporcionar conforto e qualidade de vida.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001"

Agradeço à Fapesp pelo financiamento deste e de outros projetos desenvolvidos pelo grupo de pesquisa (processo 2020/10582-0)

“Enquanto você viver, continue aprendendo a viver.”

Sêneca

## RESUMO

LEITE, N.G. **Quantificação dos macrófagos M1 e M2 associados a mastocitomas cutâneos caninos**. 2022. 83 f. Dissertação (Mestrado em biociência animal). Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos. Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2022.

O mastocitoma (MCT) é um dos tumores cutâneos de maior ocorrência na clínica de pequenos animais. Sua prevalência é maior em cães do que em gatos e seu comportamento biológico é bastante variável. Devido ao comportamento biológico agressivo deste tumor, bem como suas características macroscópicas extremamente variáveis, se faz necessário o estudo de novos indicadores prognósticos. A compreensão dos mecanismos de desenvolvimento e crescimento tumorais que envolvem leucócitos no microambiente neoplásico é uma questão importante tanto para o prognóstico do câncer, quanto para o desenvolvimento de terapias antineoplásicas. Macrófagos Associados ao Tumor (TAMs) podem exibir fenótipos M1, importantes células efetoras imunes, ou M2, capazes de suprimir a função dos M1 e influenciar a angiogênese e o reparo tecidual. O papel dos macrófagos M1 e M2 em neoplasias humanas tem sido amplamente estudado em câncer de mama, pulmão e pâncreas em humanos, mas em medicina veterinária os estudos a respeito de sua influência no comportamento de neoplasias ainda são escassos. O objetivo do presente estudo foi identificar e categorizar os diferentes fenótipos de macrófagos em MCTs e compará-los à graduação histológica, morte em função da doença e tempo de sobrevivência. Trinta e quatro casos de MCTs cutâneos caninos foram avaliados por meio de imuno-histoquímica para identificação, quantificação e avaliação da distribuição tecidual dos macrófagos M1 e M2. As informações obtidas foram comparadas aos graus histopatológicos, mortalidade em função da doença e tempo de sobrevivência pós-cirúrgica. MCTs de alto grau histológico apresentam maior densidade de macrófagos M2 identificados pela positividade para CD163. Não houve correlação entre a densidade de macrófagos M2, quantificada por escores, e densidade microvascular intratumoral (MVD). Novos estudos devem ser realizados a fim de confirmar nossas observações e elucidar o papel dos macrófagos M2 nessa neoplasia.

Palavras-chave: Mastocitoma, Macrófagos Associados ao Tumor, Prognóstico

## SUMMARY

LEITE, N.G. **Quantificação dos macrófagos M1 e M2 associados a mastocitomas cutâneos caninos.** Quantification of M1 and M2 macrophages associated with canine mast cell tumors. 2022. 83 f. Dissertação (Mestrado em biociência animal). Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos. Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2022.

Mast cell tumor (MCT) is one of the most frequent cutaneous tumors in small animal clinical practice. Its prevalence is higher in dogs than in cats and its biological behavior is quite variable. However, due to the biological behavior of this tumor, as well as its extremely variable macroscopic characteristics, the identification of new prognostic indicators is needed. Understanding the mechanisms of tumor development and growth involving leukocytes in the neoplastic microenvironment is an important issue both for the prognosis of cancer and for the development of antineoplastic therapies.

Tumor Associated Macrophages (TAMs) can exhibit M1 phenotypes, important immune effector cells, or M2, capable of suppressing M1 function and influencing angiogenesis and tissue repair. The role of M1 and M2 macrophages in human neoplasms has been widely studied in breast, lung and pancreas cancer in humans, but in veterinary medicine, studies regarding their influence on the behavior of neoplasms are still limited. The aim of the present study was to identify and categorize the different macrophage phenotypes in MCTs and compare them to histological adoption, disease-related death and survival time. Thirty-four cases of canine cutaneous MCTs were evaluated using immunohistochemistry to identify, quantify and evaluate the tissue distribution of M1 and M2 macrophages. The information was advanced to histopathological grades, mortality due to the disease and post-surgical survival time. High histological grade MCTs have a higher density of M2 macrophages identified by CD163 positivity. There was no interference between M2 macrophage density, quantified by scores, and intratumoral microvascular density (MVD). New studies must be carried out in order to confirm our observations and to elucidate the role of M2 macrophages in this neoplasm.

Keywords: Mast Cell Tumor, Tumor Associated Macrophages, Prognostic.

## Lista de ilustrações

Figura 1. A- Nódulo eritematoso em região de abdômen de cão. B- Nódulo único, bem circunscrito em região de tórax canino. C- Múltiplos nódulos em região de face de cão. D- Múltiplos nódulos ulcerados em região de flanco de cão.....	21
Figura 2 - Fotomicrografias de linfonodo de coelho mostrando padrões de imunomarcção para CD163 .....	40
Figura 3 - Fotomicrografias de abscesso cutâneo canino mostrando padrões de imunomarcção para iNOS.....	41
Figura 4 - Fotomicrografias de MCTs caninos mostrando padrões de imunomarcção para iNOS. ....	42
Figura 5 - Fotomicrografia de tecido cutâneo canino mostrando padrões de imunomarcção de iNOS em mastócito. ....	43
Figura 6 - Fotomicrografia de tecido cutâneo canino (mastocitoma) mostrando scores para o número de macrófagos M2, bem como padrões de imunomarcção de CD163 em macrófago.....	44
Figura 7 - Fotomicrografia de MCT mostrando padrões de imunomarcção de vWF em células endoteliais.....	45
Figura 8 – Gráfico de distribuição dos escores de macrófagos em função da graduação de Kiupel et al. (2011) .....	46
Figura 9 – Gráfico de distribuição das contagens de vasos sanguíneos em função da graduação de Kiupel et al. (2011) .....	47
Figura 10 – Gráfico do teste Spearman de correlação para 32 lesões disponíveis com CD163 e vWF.....	47
Figura 11 – Teste Spearman de correlação para 13 lesões disponíveis para análise de ki67 e score CD163.....	48
Figura 12 – Teste Spearman de correlação para 13 lesões disponíveis para análise de ki67 (proliferação celular) e MDV (microdensidade vascular) .....	48
Figura 13 - Curva de sobrevivência de Kaplan Meier para os pacientes estudados, em função da expressão imuno-histoquímica para CD163.....	49

## Sumário

<b>1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS.....</b>	<b>16</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>18</b>
2.1 <i>O Mastócito.....</i>	<i>18</i>
2.2 <i>O Mastocitoma.....</i>	<i>19</i>
2.2.1 <i>Incidência e Etiopatogenia .....</i>	<i>19</i>
2.2.2 <i>Fatores Predisponentes.....</i>	<i>19</i>
2.2.3 <i>Localização e Características Macroscópicas .....</i>	<i>20</i>
2.2.4 <i>Comportamento Biológico e Metástases.....</i>	<i>21</i>
2.2.5 <i>Diagnósticos e Fatores Prognósticos .....</i>	<i>23</i>
2.2.6 <i>Tratamento .....</i>	<i>25</i>
2.3 <i>O Macrófago.....</i>	<i>29</i>
2.3.1 <i>Subtipos de Macrófagos.....</i>	<i>29</i>
2.3.2 <i>Macrófagos Associados ao Tumor (TAMs).....</i>	<i>32</i>
<b>3.OBJETIVOS .....</b>	<b>34</b>
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>34</b>
4.1 <i>Origem dos Materiais e Critérios de Inclusão e Exclusão.....</i>	<i>34</i>
4.2 <i>Processamento Histopatológico.....</i>	<i>35</i>
4.3 <i>Contagem de macrófagos e vasos sanguíneos.....</i>	<i>35</i>
4.4 <i>Processamento Imuno-Histoquímico.....</i>	<i>35</i>
4.4.1 <i>Avaliação das imunomarcações.....</i>	<i>37</i>
4.5 <i>Análise estatística.....</i>	<i>37</i>
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>38</b>
5.1 <i>Avaliação da população estudada.....</i>	<i>38</i>
5.2 <i>Marcações Imuno-Histoquímicas.....</i>	<i>40</i>
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>50</b>
<b>7. CONCLUSÕES.....</b>	<b>55</b>
<b>8. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>56</b>
<b>9. ANEXOS.....</b>	<b>81</b>

Anexo A – Variações de protocolo utilizado para marcação de macrófagos polarizados em M2, anticorpo anti-CD163 (Abcam®, cód. ab182422) .....	81
Anexo B – Variações de protocolo utilizado para marcação de macrófagos polarizados em M1 para o anticorpo anti-iNOS (Abcam®, cód. ab3523) .....	82
Anexo C- Diluição do anticorpo, recuperação antigênica, bloqueio de proteínas inespecíficas, bloqueio da peroxidase endógena e tipo de tampão de lavagem do protocolo utilizado para marcação de macrófagos polarizados em M1 para o anticorpo anti-iNOS (Bioss®, cód. bs-2072R) .....	83
Anexo D - Diluição do anticorpo, recuperação antigênica, bloqueio de proteínas inespecíficas, bloqueio da peroxidase endógena e tipo de tampão de lavagem do protocolo utilizado para marcação de macrófagos polarizados em M2 para o anticorpo anti-CD163 (Bioss®, cód. bs-2527R) .....	83
Anexo E - Diluição do anticorpo, recuperação antigênica, bloqueio da peroxidase endógena e tipo de tampão de lavagem do protocolo utilizado para marcação de vasos sanguíneos para o anticorpo anti- vWF (Dako®, IR527) .....	83
Anexo F - Variações de protocolo utilizado para bloqueio de mastócito com Poli L- lisina. Anticorpo anti-iNOS (Bioss).....	84

## 1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

O câncer é uma doença multifatorial, crônica e complexa, com alta incidência de morbidade e mortalidade em todo o mundo (ARGYLE; BLACKING, 2008, DALECK et al., 2009; HANAHAN; WEINBERG, 2011). A ocorrência de câncer em cães e gatos tem sido cada vez mais significativa, sendo uma das principais causas de óbito em animais de companhia, ainda que diversos estudos sobre tratamento e características biológicas da doença tenham avançado (ARGYLE; BLACKING, 2008; PANG; ARGYLE, 2016; WITHROW et al., 2013).

O mastocitoma (MCT) representa o terceiro subtipo de neoplasia mais comum em cães, sendo a neoplasia que representa até 11% de todos os tumores cutâneos caninos (MACY, 1985; DE NARDI et al., 2018). É considerada a segunda neoplasia que mais acomete cães, depois dos tumores de mama malignos e sua incidência varia entre 20,9 e 22,4%. (DE NARDI et al., 2002; MEIRELLES et al., 2010) O diagnóstico e prognóstico estão baseados na avaliação histológica, entretanto, novos marcadores prognósticos complementares vêm sendo estudados (MELO et al., 2012; MELO, 2013; THOMPSON et al., 2011). Entre os principais, podemos destacar a localização tumoral, o estadiamento clínico, a contagem de figuras mitóticas, a expressão da proteína Ki67, a existência metástases linfonodais e a expressão de KIT (BLACKWOOD et al., 2012; DE NARDI et al., 2018).

Nem sempre há sucesso em ações terapêuticas antineoplásicas em humanos, tais como a quimioterapia, radioterapia e intervenção cirúrgica, acarretando o aumento no interesse científico em relação ao papel do sistema imunológico no comportamento biológico e progressão tumoral, com vistas à imunoterapia (HANAHAN; TORREZINI; ATHANAZIO, 2008; WEINBERG, 2011). Para os MCTs de grau intermediário e alto grau em cães, tais insucessos são bastante frequentes e pouco se sabe sobre o papel do sistema imune no desenvolvimento e progressão deste tumor canino (BLACKWOOD et al., 2012)

Células não-cancerosas participam ativamente em diferentes processos de progressão tumoral, tais como angiogênese, metástase e proliferação celular. Sendo assim, o tumor pode ser visto como um tecido complexo, com distorção da homeostasia tecidual original, onde células normais são cooptadas a funcionar de acordo com a dinâmica tumoral, ditada sobretudo pelas células cancerosas. Paul Ehrlich, no início do



século XX, propôs a importância do sistema imune na progressão neoplásica (TORREZINI; ATHANAZIO, 2008). As hipóteses de imunovigilância propostas por MacFarlane Burnet e Lewis Thomas, na década de 1950, sugeriam a capacidade do sistema imunológico em identificar células neoplásicas, assim, controlando sua proliferação, nos organismos multicelulares (ONUCHIC; CHAMMAS, 2010; TORREZINI; ATHANAZIO, 2008).

A imunovigilância é uma proposta de que o sistema imune tem a capacidade de reconhecer e de produzir anticorpos contra agentes infecciosos ou células tumorais. (TORREZINI; ATHANAZIO, 2008). Os primeiros estudos relacionando tumores e o sistema imunológico foram realizados a partir do século XIX. William Coley injetou resíduos bacterianos em determinados sítios tumorais e observou a regressão de um sarcoma. A partir de então, iniciaram-se, também, estudos de novas interações entre as estruturas imunológicas e a carcinogênese (McCARTHY, 2006)

Entre as células do sistema imunológico, as mais abundantes encontradas no microambiente tumoral são os macrófagos (MONTEIRO et al., 2018; ROY NOY, 2014), porém, ao invés de apresentarem ação tumoricida, os macrófagos podem adotar um fenótipo pró-tumoral, promovendo a invasão e migração de células tumorais, além de suprimir a ação antitumoral, tanto em sítios primários quanto em metastáticos (MONTEIRO et al., 2018; RAPOSO et al., 2014; ROY NOY, 2014).

Em Medicina Veterinária, são escassos os estudos descrevendo os padrões de infiltração de TAMs e sua relação com a progressão e prognóstico de tumores caninos, assim como sobre a polarização de macrófagos M1/M2. Os estudos disponíveis são relacionados com carcinomas de mama ou doenças infecciosas como esporotricose e leishmaniose (ALEGRANCI, 2013; BEIRÃO et al., 2015; KROL et al., 2012; MONTEIRO et al., 2018; MOREIRA et al., 2016; RAPOSO, et al., 2014).

A demonstração de possível relação entre TAMs e a malignidade de MCTs pode tornar os macrófagos um alvo terapêutico no futuro. A principal vantagem de tê-los nesta posição é que o alvo da terapia antineoplásica não seria uma célula cancerosa, que possui características estruturais e moleculares heterogêneas, e sim uma célula normal do organismo, em que as drogas utilizadas agiriam de forma mais específica e homogênea. Dessa forma o objetivo do presente estudo foi avaliar a frequência de macrófagos M1 e M2 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.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 O Mastócito

Os mastócitos foram descritos no final do século XIX, mais precisamente em 1877, por Paul Ehrlich (CRIVELLATO et al., 2003; MACY 1985). Ao estudar diversos tecidos notou a presença de um material abundante e compactado no citoplasma, por acreditar que esse material tivesse uma função de nutrição o denominou “*Mastzellen*”, que significa “células bem nutridas ou alimentadas” (CRIVELLATO et al., 2003; MACY 1985; MOTA, 1995).

Mastócitos são células pleomórficas, podendo ser encontradas de forma fusiforme, esférica ou estrelada. Possuem núcleo redondo ou ovoide e citoplasma repleto de grânulos que se dispõem de maneira homogênea (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2000; GARCIA et al., 1998). Seus grânulos citoplasmáticos se coram de maneira metacromática, quando corados em corantes catiônicos, como azul de toluidina, Giemsa e panótico. A metacromasia ocorre devido à presença de proteoglicanos ácidos, que se coram distintos em relação aos grânulos de DNA nuclear (HUNTLEY, 1992; KRISHNASWAMY et al., 2001; LEMARIÉ et al., 1995; MACY, 1985).

Desempenham papel fundamental na imunidade natural e adquirida, através da liberação de mediadores químicos, frente a um estímulo apropriado (BOYCE, 2003; DALECK, 2009; GALEI et al., 2005; KIRSHENBAUM, 2000; LONDON e SEGUIN, 2003; MARONE, 1997; MARSHALL, 2004; VOHHRINGER, 2013). Em seu citoplasma os mastócitos armazenam grânulos com papéis ativos biologicamente, como heparina, histamina, fator quimiotático para eosinófilos, citocinas e enzimas proteolíticas (JAIN, 1993, MACY, 1985; CROSS, MERCER. 1993).

## 2.2 O Mastocitoma

### 2.2.1 Incidência e Etiopatogenia

O mastocitoma é a neoplasia maligna mais frequente em cães, compreendendo uma incidência variando entre 20,9% e 22,4% das neoplasias que acometem esta espécie (DE NARDI et al., 2002; MEIRELLES et al., 2010). Estudos correlacionam a maior incidência de mastocitomas cutâneos aos processos inflamatórios, em locais onde lesões de pele preexistiam, bem como exposição constante a substâncias irritantes (DALECK et al., 2009; HAHN et al., 2000; THAMM et al., 2013). Acredita-se que a doença seja multifatorial (COUTO, 2007; DE NARDI et al., 2002; FURLANI, 2004; MEDLEAU, 2003; THAMM et al., 2013).

São agrupados na categoria de neoplasias de células redondas, juntamente com linfoma, histiocitoma, melanoma amelanótico e tumor venéreo transmissível, os quais devem ser considerados no diagnóstico diferencial (PALMA et al., 2009). Apresentam diferentes comportamentos biológicos, altas taxas de metástase e recidiva, além de prognóstico reservado e difícil tratamento (WELLE et al., 2008).

### 2.2.2 Fatores Predisponentes

O mastocitoma pode ocorrer em qualquer raça canina, inclusive em animais sem raça definida, entretanto, refere-se que raças como: Boxer, Boston terrier, Bullmastiff, Labrador, Golden Retriever, Cocker Spaniel, Schnauzer, Teckel e Shar-pei e Bulldog inglês têm maior predisposição a essa neoplasia (MEDLEAU, 2003; MOCHIZUKI et al., 2016; SMIECH et al., 2018; THAMM, 2013; WELLE et al., 2008).

Em seus estudos MOCHIZUKI et al. (2016) e SMIECH et al. (2018) demonstraram correlação de tumores com maior malignidade em animais da raça Shar-pei, enquanto cães das raças boxer e Pug demonstraram comportamento biológico tumoral menos agressivo.

Não há predisposição sexual para esta neoplasia, segundo a maioria dos autores (MEDLEAU, 2003; PATNAIK; EHLER; MACEWEN, 1984; THAMM; VAIL, 2007; WELLE et al., 2008). Entretanto, White et al. (2011) apontam que machos castrados apresentam maior probabilidade para o desenvolvimento da doença, assim como fêmeas castradas. Estudos que investigaram a presença de receptores de estrógeno e progesterona em MCTs se mostraram divergentes (ELLING; UNGEMACH, 1982; LARSEN; GRIER, 1989).

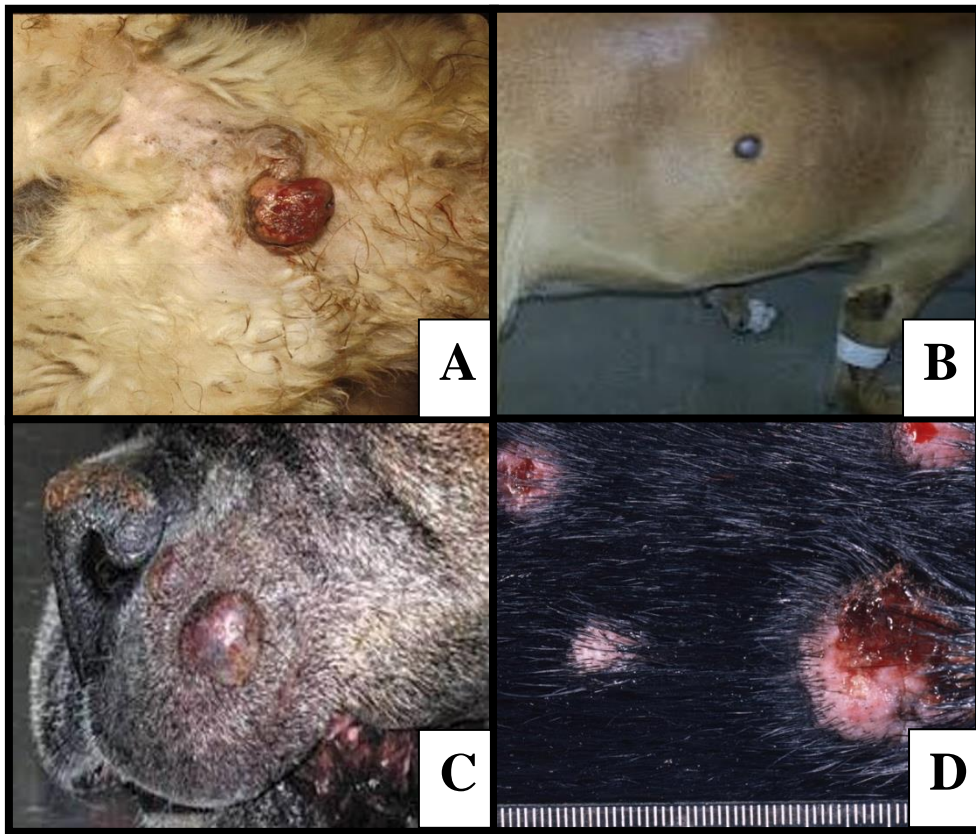
O MCT cutâneo já foi relatado em cães com idades entre um mês e 17 anos, mas sabe-se que a idade média dos animais ao diagnóstico está entre 8 e 9 anos (COUTO, 2007; DABSON; SCASE, 2007; DE NARDI et al., 2002; FURLANI, 2004; GOVIER, 2003; MEDLEAU, 2003; SIMOES; SCHONING; BUTINE, 1994).

### *2.2.3 Localização e Características Macroscópicas*

A pele é o local mais frequentemente afetado por mastocitomas, podendo também manifestar-se na forma subcutânea e visceral, esse último conhecido como sistêmico (PRADO et al., 2012; WITHROW et al.; 2013). A neoplasia tem maior ocorrência no tronco (50 a 60%), seguida pelas extremidades (25 a 40%), posteriormente cabeça e pescoço (10%). Múltiplos nódulos são observados em 3 a 14% dos casos (JOSELEVITCH et al., 2018; LONDON; SEGUIN, 2003; SIMOES et al., 1994; WELLE et al., 2008). Considera-se importante para a previsão do prognóstico a localização da neoplasia, sendo os tumores das regiões inguinal, perianal, focinho e cavidades oral e nasal considerados mais agressivos (GOVIER, 2003; KIUPEL, et al., 2011; LONDON; THAMM; VAIL, 2013; MULLINS et al., 2006; PALMA, et al., 2009; WITHROW et al., 2013).

A macroscopia típica é descrita como uma lesão alopecica, eritematosa, nodular, sem cápsula e dermoepidérmica, mas podem se assemelhar a vários outros tipos de lesões, neoplásicas ou não, diminuindo as chances de um diagnóstico precoce, bem como de prever seu comportamento. Muitas vezes são confundidos com lipomas, sobretudo os de consistência macia, sem eritema e prurido (BLACKWOOD et al. 2012; THAMM; VAIL, 2007).

**Figura 1.** A- Nódulo eritematoso em região de abdômen de cão. B- Nódulo único, bem circunscrito em região de tórax canino. C- Múltiplos nódulos em região de face de cão. D- Múltiplos nódulos ulcerados em região de flanco de cão.



**Fonte:** Harrington e Gold, Noah archive, University of California – Davis. Disponível em: <https://davisthompsonfoundation.org/noahs-arkive/> Acesso em 28/11/2022.

#### 2.2.4 Comportamento Biológico e Metástases

O mastocitoma apresenta comportamento biológico bastante variável, sendo classificados como tumores potencialmente malignos, podendo ocasionar metástases e eventualmente, a morte. Aproximadamente 50% dos casos apresentam comportamento agressivo, com taxas de recidiva e metástase entre 28 a 80% (BLACKWOOD et al. 2012; KIUPEL et al. 2004; MACY, 1985; YAGER; SCOTT, 1993; SIMÕES, 1994; O'KEEFE, 1990; PATNAIK et al. 1984).

As complicações relacionadas ao mastocitoma estão ligadas à desgranulação e liberação de histamina, heparina e serotonina, bem como fatores quimiotáticos de eosinófilos e enzimas proteolíticas, que por sua vez pode ocasionar síndrome paraneoplásicas, incluindo úlceras gastrointestinais, anorexia, êmese, hematoquezia, melena, anemia e até perfuração gástrica ou intestinal, e em casos extremos choque anafilático (BLACKWOOD et al., 2012; DOBSON; SCASE, 2007; GLEIXNER et al., 2007; WELLE et al., 2008).

As ulcerações ocorrem mais frequentemente no estômago, mais precisamente no piloro e com menor frequência em duodeno, e compreendem de 25 a 83% das lesões observadas durante a necrópsia, relacionadas como *causa mortis* o mastocitoma (GOLDSCHMIDT; HENDRICK, 2002, LONDON; SEGUIN, 2003; LEMARIE et al., 1995; YAGER; SCOTT, 1993). A possível causa pela qual ocorre a manifestação destas lesões está relacionada ao fato do aumento da secreção de ácido clorídrico, liberação de fibrolisina, lesionando a rede vascular, tendo como efeito a trombose e infarto dessa região (BLACKWOOD et al., 2012; MACY, 1985; O'KEEFE, 1990; ROGERS 1993; YAGER; SCOTT, 1993).

Distúrbios da coagulação e retardo na cicatrização são comumente observados. A liberação de enzimas proteolíticas e aminas vasoativas pelo tumor é considerado o principal mecanismo, além da diminuição da produção de muco nestas áreas (GOLDSCHMIDT; HENDRICK, 2002). A cicatrização se torna comprometida, uma vez que a histamina liberada se liga a receptores H1 e H2 de macrófagos, resultando na liberação de fator supressor de fibroblastos (GOLDSCHMIDT; HENDRICK, 2002; MACY, 1985).

A histamina plasmática pode se elevar de modo significativo em cães acometidos por mastocitoma cutâneo canino (FOX; ROSENTHAL; TWEDT, 1990). Quando comparados com mastócitos normais, mastócitos neoplásicos apresentam de 25 a 50% mais histamina (MACY, 1985). Não há correlação entre concentrações plasmáticas de histamina e/ou gastrina com grau ou estadiamento do tumor, sendo esses índices considerados de baixa importância ao diagnóstico e prognóstico da doença (FOX; ROSENTHAL; TWEDT, 1990; THAMM; VAIL, 2007).

A manipulação excessiva da massa tumoral durante o exame e/ou criocirurgia pode desencadear extensa de desgranulação de mastócitos neoplásicos e a histamina liberada dessas células podem desencadear eritema, urticária e edema no tecido lesionado,

bem como em sua extensão, sendo esse evento caracterizado como sinal de Darier (THAMM; VAIL, 2007). As complicações relacionadas a excessiva desgranulação dos mastócitos são hemorragias locais, devido a problemas de coagulação relacionados à heparina, que podem levar ao choque hipotensivo, além de reação anafilática aguda (BLACKWOOD et al., 2012; MACY, 1985; ROGERS, 1993; YAGER; SCOTT, 1993).

### *2.2.5 Diagnóstico e Fatores Prognósticos*

O diagnóstico citológico é um método vantajoso, de baixo custo, rápido e pouco invasivo. É amplamente utilizada no diagnóstico de neoplasias, principalmente as de células redondas (BLACKWOOD et al.; 2012; GOLDSCHMIDT; HENDRICK; 2002; WELLE et al.; 2008). Pode ser realizado por meio de citologia aspirativa por agulha fina (CAAF) ou imprint (decalque) das lesões (MACY, 1985; LONDON; SEGUIN, 2003; PALMA et al., 2009; RECH, 2003). Deve-se realizar o exame citológico previamente à excisão cirúrgica, afim de um melhor planejamento no que diz respeito à extensão da cirurgia. Entretanto, não se exclui o exame histopatológico para definição do diagnóstico definitivo, classificação e obtenção do prognóstico (GOVIER, 2003; LONDON et al.; 2009; LONDON; SEGUIN, 20013; THAMM; VAIL, 2007).

Diversos fatores prognósticos são considerados na tentativa de um melhor entendimento do comportamento biológico do tumor, bem como decisão de tratamento e compreensão do prognóstico. Todavia, a análise de fatores isolados não é suficiente para previsão do comportamento da neoplasia (TAKEUCHI et al., 2013; THAMM; VAIL, 2007; WELLE et al., 2008). A graduação histopatológica é o fator prognóstico mais utilizado para avaliar o comportamento tumoral, valor prognóstico e melhor terapia a ser instituída em casos de mastocitomas (FINORA et al., 2006; KIUPEL et al., 2011; MACY, 1985; STREFEZZI; XAVIER; CATAO DIAS, 2003).

A graduação histopatológica é realizada com base nos métodos de Patnaik et al. (1984), em três graus de malignidade, e Kiupel et al. (2011) em MCTs de baixo ou alto grau de malignidade. Na primeira, analisam-se características como formato e arranjo celular, relação núcleo/citoplasma, quantidade e coloração dos grânulos intracitoplasmáticos, condensação da cromatina, índice mitótico, número e característica das figuras mitóticas, bem como invasão de tecidos adjacentes (PATNAIK; EHLER;

MACEWEN, 1984). Na segunda proposta, os critérios são mais objetivos, como a quantificação de figuras de mitose, células multinucleadas, núcleos bizarros e cariomegalia em 10 campos de grande aumento (KIUPEL et al., 2011). Embora haja um refinamento nos parâmetros analisados na segunda proposta de graduação, a classificação histológica pode não ser suficiente para determinar o prognóstico de cada paciente com precisão (MELO et al., 2012; MELO, 2013; THOMPSON et al., 2011).

Para MCTs, foi proposta a graduação citológica (CAMUS et al., 2016) em que características como a presença de células multinucleadas, núcleos bizarros, cariomegalia, anisocariose e anisocitose, figuras de mitose e quantidade de grânulos citoplasmáticos são analisadas. A neoplasia é considerada de alto grau quando três ou mais destes critérios estão presentes (BRAZ et al., 2017; CAMUS et al., 2016; ROSOLEM et al., 2013; SCARPA et al., 2014; STREFEZZI, et al., 2010).

A morfometria nuclear é um marcador que associado ao exame citológico se torna mais objetivo, otimizando o diagnóstico (STREFEZZI; XAVIER; CATAO DIAS, 2003) Também foi aplicada na histopatologia com sucesso (MAIOLINO et al., 2005).

Com relação à proliferação celular, um dos principais marcadores é o índice mitótico, que foi correlacionado à graduação histopatológica, sobrevida e incidência de metástases (PREZIOSI et al. 2007; ROMANSIK et al., 2007; Strefezzi et al., 2010). Outro marcador importante é a proteína Ki67. Essa proteína se expressa em todas as fases do ciclo celular em que a célula esteja se replicando (KIUPEL et al., 2004; SAKAI et al., 2002). A proliferação de Ki67 apresenta alta correlação com o aumento na taxa de recorrência dos mastocitomas (WEBSTER et al., 2006). Outros indicadores foram testados, porém, caíram em desuso. Entre eles, destacam-se: a contagem de AgNORs (regiões organizadoras nucleolares com afinidade pela prata), que está associada a um pior prognóstico, correlacionando-se com aumentos de taxas de recidiva local, metástases e mortalidade (RECH et al., 2004; WEBSTER et al., 2007; WELLE et al., 2008); e a expressão imuno-histoquímica de PCNA (Antígeno Nuclear de Proliferação Celular) (WEBSTER et al., 2007; WELLE et al., 2008; STREFEZZI et al., 2009).

A expressão do oncogene CD117/KIT é considerado um importante fator prognóstico para MCT, pois está relacionada com o desenvolvimento e progressão da doença, uma vez que KIT interage com *Stem cell factor* (SCF), estimulando fatores de crescimento do tumor (LETARD et al., 2008; LONDON et al., 1999; WELLE et al., 2008). Foi caracterizada por meio de imuno-histoquímica por Kiupel et al. (2004), sendo



que os padrões de expressão KIT II e III (marcação focal citoplasmática e marcação forte difusa citoplasmática, respectivamente) são correlacionados a piores prognósticos.

O gene TP53 é um gene supressor de tumor que exerce importante atividade no controle do ciclo celular, inibindo o crescimento e a diferenciação das células. Sua expressão pode ser influenciada por diversos mecanismos, como a expressão do oncogene MDM2, que leva à ubiquitinação de TP53. A mutação desse gene quando analisada juntamente com MDM2 sugere aumento da carcinogênese nos mastocitomas caninos (GINN et al., 2000; GINN et al., 2007; NASIR et al., 2001; WU et al., 2006). Estudos demonstraram a expressão de TP53 correlacionada ao grau histopatológico, taxa de recorrência e tempo de sobrevida em diversos tumores humanos (GINN et al., 2000; JAFFE et al., 2000; WU et al., 2006).

A proteína BAX é uma proteína pro-apoptótica, regulada por TP53, cuja avaliação de seu potencial é um importante indicador prognóstico (STREFEZZI et al., 2012). Aumento da expressão de BAX em mastocitomas demonstrou correlação com a malignidade, progressão tumoral e morte em decorrência do tumor, além do aumento do risco de morte em até cinco vezes (STREFEZZI et al., 2012; BARRA et al., 2018).

#### *2.2.6 Tratamento*

A escolha do tratamento a ser instituído é pautada em fatores prognósticos, como apresentação de sinais clínicos, localização, tamanho do tumor e índices de proliferação (GRANT et al., 2008; THAMM; VAIL, 2007; WELLE et al., 2008). A compreensão das alterações nos proto-oncogenes, genes supressores de tumor e outros fatores que influenciam o desenvolvimento de MCTs de grau II e III poderão contribuir para melhores estratégias de diagnóstico precoce da doença e planejamento terapêutico (HARRIS; HOLLSTEIN, 1993).

O principal tratamento para mastocitomas cutâneos caninos solitários e não-metastáticos é a excisão cirúrgica (GOVIER, 2003; MISDORP, 2004; NORTHRUP et al., 2004; WELLE et al., 2008). Indica-se 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, sempre que possível (BLACKWOOD et al., 2012; SEGUIN et al., 2001; SIMPSON et al., 2004; WITHROW et al., 2013). É imprescindível considerar o grau histológico, de modo a avaliar os riscos de recidiva tumoral, mesmo com completa remoção das margens de segurança. Em casos de tumores de alto grau III, ou várias massas tumorais,

recomenda-se o tratamento multimodal, visto que esses apresentam uma maior taxa de recidiva e metástases (RISSELADA et al., 2015; THAMM, VAIL, 2007).

Michels et al. (2002) e Murphy et al. (2004) relataram que, em média, para cães com mastocitomas bem diferenciados ou classificados como intermediários, a ausência de margens cirúrgicas adequadas não afetou a sobrevida e, respectivamente o prognóstico da doença. Entretanto, a ressecção cirúrgica completa não é garantia de ausência de recidiva e/ou metástase, tendo uma taxa de recorrência de 5 a 23% dos casos (MICHELS et al., 2002; MURPHY et al.; 2004; SEGUIN et al., 2001; SEGUIN et al., 2005).

A radioterapia é um tratamento comumente utilizado como adjuvante quando a excisão cirúrgica não pode ser realizada de forma ampla e idealizada (BLACKWOOD et al., 2012; ROGER, 1993). Também pode ser empregada em casos onde não exista a possibilidade de realizar a excisão da massa tumoral por completo, entretanto, nesses casos preza-se pela qualidade de vida do paciente, uma vez que o prognóstico e sobrevida são ruins (BLACKWOOD et al., 2012; ROGERS, 1996; WITHROW et al., 2013). O método também pode ser utilizado de forma paliativa, no controle de metástases, metástases de linfonodos locais/regionais e em caso de tumores inoperáveis (BLACKWOOD et al., 2012; WELLE, et al., 2008).

Em mastocitomas de grau I e II com completa excisão, a radioterapia apresentou bons resultados como única terapêutica, em baixas doses (40 a 45 Gy). Em casos mais complicados indica-se aplicações de doses mais altas (48 a 57 Gy), em três ou quatro aplicações semanais. Em geral, 50% dos pacientes apresentam resultados positivos, com controle de 1 ano da neoplasia (THAMM; VAIL, 2007). Porém, em animais com mastocitomas de grau III, a radioterapia não se mostrou tão efetiva, pois embora a radioterapia possa prevenir a recorrência local, em geral há desenvolvimento de metástase (ROGERS, 1996).

A quimioterapia pode ser utilizada quando houver necessidade de terapia sistêmica, em tumores de alto grau e na presença de fatores que diminuem a sobrevida, como marcadores de proliferação celular elevados, no intuito de retardar ou impedir metástases (BLACKWOOD et al., 2012). Em tumores de baixo grau, pode ser utilizada como terapia neoadjuvante, com propósito de diminuir a massa tumoral (DOBSON; COHEN; GOULD, 2004).

As drogas mais utilizadas são vimblastina, prednisona e lomustina, seguido por ciclofosfamida e clorambucil (LONDON; SEGUIN, 2003; MCCAW et al., 1994; THAMM et al., 1999, THAMM et al., 2006). A lomustina pode ser utilizada de maneira

alternada com a vimblastina (MCCAWE et al., 1994). THAMM; TUREK; VAIL (2006) e Webster et al., 2008, relataram que animais que receberam o tratamento quimioterápico de vimblastina associada a prednisona, juntamente com a ressecção cirúrgica tiveram uma melhor prognóstico e aumento do tempo de sobrevida. Estudos escassos apresentam outros fármacos como agentes quimioterápicos para o tratamento de mastocitoma cutâneo canino, esses ainda não fundamentados (BLACKWOOD et al., 2012).

Os inibidores de tirosina-quinase (TKI) são moléculas pequenas, com capacidade de bloquear a atividade dos receptores celulares, inibindo o sítio de ligação do ATP e, conseqüentemente, bloqueando a sinalização bioquímica para proliferação, angiogênese e apoptose (BLACKWOOD et al., 2012; LEITE et al., 2012). Em Medicina Veterinária, os medicamentos aprovados pela agência Europeia de Medicamento (EMA) para o tratamento de mastocitomas são Fosfato de Toceranib e Masitinib (HAHN et al., 2008; HAHN et al., 2010; LONDON et al., 2009).

O Fosfato de Toceranib atua no bloqueio do receptor KIT, além de bloquear outros receptores do mesmo tipo, como do fator de crescimento endotelial vascular (VEGFR) e o derivado de plaquetas (PDGFR). É indicado em casos de mastocitomas com recidivas, de grau II e III, com ou sem comprometimento de linfonodos, e/ou em casos onde não seja possível a excisão completa do tumor. Já o Masitinib inibe de modo seletivo as proteínas quinases de KIT, PDGFR- $\alpha$  e PDGFR- $\beta$ . É indicado em MCTs de graus II e III quando não há possibilidade de ressecção cirúrgica e há mutação de *KIT*. (BLACKWOOD et al., 2012; BONKOBARA, 2015; HAHN et al., 2008; HAHN et al., 2010; LONDON et al., 2009).

O Masitinib apresentou boa eficácia em relação à sobrevida dos pacientes portadores de mastocitoma cutâneo, com aumento de 12 a 34 meses na sobrevida destes animais (HAHN et al., 2010). Animais com doença estável superior a 10 semanas apresentaram melhora de 59% com o uso de Fosfato de Toceranib. Essa resposta aumentou em pacientes sem comprometimento metastático em linfonodos regionais (HAHN et al., 2010; LONDON et al., 2009).

Receptores de tirosina quinase compreendem um grupo de receptores transmembrânicos que levam à ativação celular. A atividade da tirosina-quinase desencadeia proliferação, diferenciação e sobrevivência dos mastócitos quando ativados pelo seu ligante. Disfunções nesses receptores estão intimamente relacionadas a neoplasias malignas, angiogênese tumoral e metástases (BLACKWOOD et al., 2012; GALLI et al., 2005; LONDON et al., 1996; TAKEUCHI et al., 2013).

O proto-oncogene *KIT* é um bom exemplo. Em mastocitomas, as mutações desse gene são associadas ao desenvolvimento da doença em 15 a 40% dos casos, sobretudo em tumores pouco diferenciados (LETARD et al., 2008; TAKEUCHI et al., 2013). Em mastocitomas de grau II e III, essas mutações podem representar uma taxa de 30% (BLACKWOOD et al., 2012).

Outras modalidades de terapia como crioterapia, corticosteroides, eletroquimioterapia e imunoterapia foram propostas, embora ainda menos estabelecidas e/ou eficientes (BLACKWOOD et al., 2012). Os corticosteroides podem ser utilizados em aplicações intralesionais em tumores inoperáveis ou quando não há resposta a outros tratamentos (FAN; DE LORIMIER, 2005; ROGER, 1996). Não há estudos que correlacionem essa terapia com tratamentos sistêmicos. (BLACKWOOD et al., 2012).

A eletroquimioterapia envolve a associação de fármacos como a cisplatina ou bleomicina. Os medicamentos são aplicados, no local da lesão ou de modo sistêmico, concomitantemente a pulsos elétricos. O propósito é otimizar a absorção local do fármaco por meio da eletroporação celular (SUZUKI et al., 2015; SPUGNINI et al., 2011; TOZON; SERSA, 2001). Os resultados são variáveis, de acordo com a origem do tumor (CEMAZAR, 2001). Cemazar et al. (2016), demonstraram que a eletroquimioterapia associada à eletrotransferência de IL-12 peritumoral apresentou significativa resposta antitumoral e prevenção a metástase em cães com mastocitomas (CEMAZAR et al., 2016).

Grier et al. (1995) utilizou o método de terapia por hiposmolaridade, proposto por Paul Ehrlich. A terapia consiste na aplicação de água destilada por via subcutânea, com propósito de que as células se rompam, devido o meio hipo-osmótico, conseqüentemente levando à apoptose celular. Entretanto, os resultados não foram consideráveis para o intuito proposto, que era prevenir recidivas após a ressecção cirúrgica de mastocitomas, além de tratar pequenos tumores.

A crioterapia ou criocirurgia é uma modalidade terapêutica indicada para tumores de mastócitos tenham tamanho inferior a 1 cm ou tumores localizados em regiões em que a excisão cirúrgica seja difícil (LONDON; SEGUIN, 2003; BLACKWOOD et al., 2012). Entretanto, sua utilização não é muito empregada, visto que há grande risco de desgranulação de mastócitos (KRAHWINKEL, 1980)

## 2.3 O Macrófago

Em 1882, o biólogo russo Elie Metchnikoff descreveu o processo onde partículas eram engolfadas por células móveis, originando a compreensão do processo hoje conhecido como fagocitose. Metchnikoff, juntamente com Paul Ehrlich, ganharam o prêmio Nobel em fisiologia e medicina, no ano de 1908, pela teoria da imunidade humoral (GORDON, 2016).

Macrófagos são células consideradas de primeira linhagem na defesa imunológica, de origem hematopoiética, multifuncionais, pertencem ao sistema mononuclear fagocítico (BANKS, 1991; GORDON; TAYLOR, 2005; GOMEZ, PERDIGUERO; 2014; HASHITOMO et al., 2013; ZHANG et al., 2008). Macrófagos presentes nos tecidos são originados de monócitos sanguíneos (GINHOUX; JUNG, 2014, VAN FURTH, 1970; VAN FURTH, DIESELHOLF-DEN DULK, 1970).

### 2.3.1 Subtipos de Macrófagos

Os macrófagos podem ser divididos em dois subgrupos e/ou vias principais de ativação: macrófagos M1, ou ativados pela via clássica, e macrófagos M2, ou ativados alternativamente (BARBOSA et al., 2015; DERLINDATI et al., 2015; FAGONE et al; 2012; KRAUSGRUBER, 2011; MANTOVANI et al., 2004; MARTINEZI; GORDON, 2014; SICA A; MANTOVANI, 2012; TAKEYA; KOMOHARA, 2016).

Macrófagos M1 são ativados a partir de sinais considerados clássicos, como IFN- $\gamma$  e LPS. IFN- $\gamma$  controla programas específicos de expressão gênica envolvendo receptores de citocinas (receptores de CSF2RB, IL15- $\alpha$  [RA], IL2RA e IL6R) e têm como marcadores de ativação celular CD36, CD38, CD69 e CD97, levando à produção de mediadores envolvidos na resposta pró-inflamatória. Estas células secretam óxido nítrico, fatores inflamatórios e quimiocinas, como IL-12, IL-23, MHC-II e membros da família B7 como B7-1 (CD80) e B7-2 (CD86), cuja função primária é ativar a resposta imune Th1 para exercer efeito antitumoral (DERLINDATI et al., 2015; FAGONE et al; 2012; KRAUSGRUBER, 2011; MANTOVANI et al., 2004; MARTINEZI; SICA A; MANTOVANI, 2012).

Macrófagos M2 são ativados por meio de interleucinas IL-4, IL-10, IL-13, complexos imunes, entre outros, sendo sua principal característica a produção de altos níveis de IL-10, que atua inibindo a inflamação e promovendo a reparação e remodelação

tecidual. Este último tem como marcadores de ativação celular as moléculas CD163, CD204 e CD206 (ALEGRANCI, 2013; BARBOSA et al., 2015; BEIRÃO et al., 2015; KRAUSGRUBER,2011; MANTOVANI et al., 2004; MARTINEZI; GORDON, 2014; ONG et al., 2011; SICA A; MANTOVANI, 2012; TAKEYA; KOMOHARA, 2016; ZHANG et al., 2018).

A via M2 requer dois tipos de moléculas de sinalizadoras: a citocina Th2 e o indutor do fator de necrose tumoral endógeno ou exógeno (SICA et al., 2012; HAIXIA et al., 2014). Citocinas como IL-4 e IL-13, vitamina D3, TGF- $\beta$ , PGE2 e glicocorticoides são os principais fatores para induzir a ativação de macrófagos M2 (JOSEPHS; BAX; KARAGIANNIS,2015). Uma vez polarizado, os macrófagos M2 secretarão antagonistas do receptor de quimiocinas, IL-1, metaloproteinases de matriz (MMP) e regularão positivamente a expressão de MHC, restringindo a resposta imune e estimulando a invasão tumoral, crescimento e metástase pela secreção de IL-10, TGF- $\beta$ , evitando que as células T exerçam efetivamente o efeito antitumoral (MIRA et al., 2013).

Macrófagos polarizados em M2 são divididos em quatro subtipos: M2a, M2b, M2c e M2d, cada macrófago polarizado exibe um perfil de expressão diferencial de citocinas, enzimas e marcadores de superfície celular, conforme Quadro 1. (MANTOVANI, 2004; CHANMEE, 2014).

A polarização dos macrófagos ocorre por meio de complexa atividade e estratégia, envolvendo células T e diversas citocinas (FUNES et al., 2018). As citocinas Th2, como IL-4 e IL-13, podem estimular a conversão de macrófagos em fenótipo M2a. Essas citocinas ativam a atividade anti-inflamatórias, limitando mediadores inflamatórios.

**Quadro 1.** Fenótipos de Macrófagos classicamente ativados (M1) e ativados alternativamente (M2)

	<b>M1</b>	<b>M2A</b>	<b>M2B</b>	<b>M2C</b>	<b>M2D</b>
<b>ESTIMULAÇÃO/ATIVAÇÃO</b>	IFN- gamma LPS GM-CSF	IL4 IL-13 Infecção fúngica e helmíntica	ICs IL-1R	IL-10 TGF-beta GCs	IL-6 LIF Adenosina
<b>MARCADORES DE SUPERFÍCIE</b>	CD68 CD86 CD80 MHC II IL-1R TLR2 TLR4 iNOS SOCS3	<i>CD163</i> <i>MHC II</i> <i>SR</i> <i>MMR/CD206</i> <i>CD200R</i> <i>TGM2</i> <i>DecoyR</i> <i>IL-1R II</i> Apenas para rato: Ym1/2 Fizz1 Arg-1	CD86 MHC II	CD163 TLR1 TLR8	
<b>SECREÇÃO DE CITOCINA</b>	TNF IL-1beta IL-6 IL-12 IL-23	IL-10 TGF-beta IL-1ra	IL-1 IL-6 IL-10 TNF-alfa	IL-10 TGF-beta beta	IL-10 IL-12 TNF-alfa TGF-beta
<b>SECREÇÃO DE QUIMIOCINA</b>	CCL10 CCL11 CCL5 CCL8 CCL9 CCL2 CCL3 CCL4	CCL17 CCL22 CCL24	CCL1	CCR2	CCL5 CXCL10 CXCL16

Fonte: BIORAD, 2020

Já os macrófagos M2b são ativados por TLRs, LPS, além de complexos imunes. Sabe-se que M2b são células contrárias a M1, devido a elevada produção de IL-10, IL- $\beta$ , IL-6 e TNF $\alpha$  e baixa produção de IL-12, o que favorece a resposta de TH2 e os diferenciam como células anti-inflamatórias. Macrófagos M2c recebem estímulos de IL-10, TGF  $\beta$  e glicocorticoides. São conhecidos como macrófagos desativados, por suprimirem citocinas pró inflamatórias, como iNOS. Macrófagos M2d são ativados por fatores de crescimento, induzidos por TLR, através de receptor de adenosina e desempenham importante papel imunossupressor (BARROS et al., 2013; CHISTIYAKOV

et al., 2015; HAO et al., 2012; MATOVANI et al., 2002; SICA, MATOVANI, 2012; VALLEDOR, RICOTE, 2004).

Com grande plasticidade, macrófagos podem assumir diferentes fenótipos e respostas, de acordo com os estímulos recebidos do microambiente tecidual. Através de estímulos específicos de citocinas, em resposta a interleucinas, podem assumir diferentes papéis, agindo a favor da defesa do organismo ou ainda adotar capacidade pró-tumoral, estimulando a angiogênese, remodelação de tecidos e conseqüentemente contribuindo com a progressão do tumor e metástases (BINGLE et al., 2002; GORDON; TAYLOR, 2005; HAGEMANN et al., 2009; LIPPITZ, 2013; MANTOVANI et al., 2012; MOSSER; EDWARDS, 2008; MOVAHEDI et al.; 2010; NGAMBENJAWONG et al., 2017, ONUCHIC; CHAMMAS, 2010; POLLARD, 2004; REICHRATH, 2016; SICA, MANTOVANI, 2012).

### 2.3.2 *Macrófagos Associados ao Tumor (TAMs)*

O microambiente tumoral é um ambiente complexo onde células do sistema imune inato e adaptativo interagem com diferentes células neoplásicas, por meio de sinalizadores químicos (HANAHAN; COUSSENS, 2012; LORUSSO; RUEGG, 2008). Macrófagos constituem grande população celular dentro do microambiente tumoral e suas interações implicam significativamente no comportamento biológico e prognóstico dos tumores (HANAHAN; WEINBERG, 2011; LIPPITZ, 2013; NGAMBENJAWONG et al., 2017; ONUCHIC; CHAMMAS, 2010; POLLARD, 2004). Tais macrófagos são denominados macrófagos associados ao tumor (TAMs) (HAO et al., 2012, NGAMBENJAWONG et al., 2017, ONUCHIC; CHAMMAS, 2010; POLLARD, 2004).

A presença de macrófagos periféricos ao tumor tem forte correlação com a invasão local e angiogênese tumoral, por produzirem VEGF, angiogenina e TNF-alfa, uma vez que esses são capazes de realizar degradação de matriz extracelular por meio de proteases e metaloproteinases (BINGLE et al., 2004; HANAHAN et al., 2011 MURDOCH et al., 2004; RIABOV et al., 2014).

Macrófagos associados ao tumor produzem metaloproteinases que modulam o microambiente tumoral. As metaloproteinases exercem um papel pró-oncogênico, devido à sua capacidade de degradação da matriz extracelular, favorecendo a formação de novos vasos sanguíneos (BINGLE et al., 2002).



Em muitos tipos de tumores humanos malignos a presença de TAMs M2 está associada a um mau prognóstico clínico. Esta associação foi detectada em melanoma, linfoma, leiomiossarcoma, tumores pancreáticos, carcinoma de células renais, glioma de alto grau (KOMOHARA et al., 2012), carcinoma oral de células escamosas (BARBOSA, 2015), colangiocarcinomas (HASITA et al., 2010), adenocarcinoma endometrial (KUBLER et al., 2014), tumores ovarianos (ORRE; ROGERS, 1999), câncer de mama (BINGLE et al., 2006; YUAN et al., 2014), linfoma de Hodgkin, câncer cervical uterino e câncer esofágico (TAKEYA; KOMOHARA, 2016). Para os carcinomas colorretais, há fortes evidências de que os TAMs facilitam a progressão tumoral, bem como crescimento e agressividade (ONG et al; 2012; ZHONG et al., 2018).

Em contraste, outros estudos com câncer de colón e mama a expressão de TAM não foi correlacionada a um pior prognóstico (ZHOU et al., 2010; MAHMOUD et al., 2012), assim como a alta relação M1/M2 foi associada à sobrevida prolongada em pacientes com câncer de ovário (ZHANG et al., 2014). Yuri et al (2015) relatou que, a densidade de TAM não teve correlação com prognóstico em câncer de próstata (YURI et al., 2015).

Poucos estudos em oncologia veterinária demonstram que a densidade de TAMs é correlacionada com piores prognósticos. Em cães com linfoma e câncer de mama, os TAMs são fontes de MMP-9, uma protease que exerce um papel pró-tumoral por degradar a matriz extracelular e favorecer a angiogênese, graças à sua capacidade de liberar fatores de crescimento como o VEGF (ARESU et al., 2014; ARICO et al., 2013; RAPOSO, et al. 2014). Em adenocarcinomas mamários caninos de diferentes graus de malignidade, com ou sem metástase à distância, a infiltração de TAMs, assim como a expressão de MCSF-R (receptor para o fator de crescimento estimulador de colônias estimulantes de macrófagos) foi relacionada com pior prognóstico (KROL et al., 2012; RAPOSO et al., 2012).

HUETE (2016) não encontrou diferenças significantes na incidência de TAMs em animais com mastocitoma cutâneo entre os graus histopatológicos, bem como relação à sobrevida pós-cirúrgica. Porém, o marcador utilizado neste estudo não era capaz de distinguir entre macrófagos M1 e M2.

Não há relatos de trabalhos quantificando subtipos de TAMs em mastocitomas cutâneo canino. Macrófagos são importantes células presentes no microambiente tumoral, tanto em tumores humanos como em cães, por isso a importância de se estudar essas

células, sobretudo em mastocitomas, que são tumores de grande prevalência na espécie canina

### **3.OBJETIVOS**

Os objetivos gerais do presente estudo são:

- Identificar e quantificar os macrófagos M1 e M2 em MCTs cutâneos caninos;

*Objetivos específicos:*

- Verificar sua relação com a taxa de proliferação celular, número de vasos sanguíneos intratumorais e graduação histopatológica do tumor;
- Verificar suas utilidades como indicadores prognósticos, individualmente ou combinados, para mortalidade em função da doença e tempo de sobrevida pós-cirúrgica.

### **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### *4.1 Origem dos Materiais e Critérios de Inclusão e Exclusão*

Os mastocitomas cutâneos caninos utilizados no presente projeto, aprovado pela CEUA (protocolo nº 7606111019) da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo (FZEA - USP) foram obtidos no banco de tumores do Laboratório de Patologia do Departamento de Medicina Veterinária da FZEA-USP, bem como de casos provenientes da casuística do Hospital Veterinário da FZEA-USP. Foram utilizadas 34 amostras de MCTs de diferentes graus histopatológicos, tratados por cirurgia com margens amplas visando a cura da doença como única forma de tratamento, e com acompanhamento clínico pós-cirúrgico mínimo de 180 dias, para casos censurados. Para inclusão nesse estudo, as amostras deveriam conter histórico retrospectivo completo, tais como nome, idade ao diagnóstico, sexo, raça, localização do tumor, presença ou não de metástases, data da primeira consulta, data da cirurgia, tempo de sobrevida pós-cirúrgica se houve uso de quimioterápicos, recidiva e *causa mortis*. As informações foram obtidas

por meio de consulta de prontuários e entrevista com proprietários e/ou médicos veterinários por telefone ou e-mail. O acompanhamento clínico foi realizado por um período mínimo de 180 dias para os casos censurados na análise estatística. Casos de animais que vieram a óbito por causas não relacionadas ao MCT e vivos ao final desse estudo foram censurados para a análise de sobrevida.

#### *4.2 Processamento Histopatológico*

As amostras de MCTs cutâneos caninos foram fixadas em formol a 10% por 48 horas e processadas conforme as técnicas rotineiras de inclusão em parafina. Cortes de aproximadamente 3  $\mu$ m de espessura foram corados pela técnica da Hematoxilina & Eosina para diagnóstico e graduação histológica das lesões, segundo os critérios estabelecidos por Patnaik et. al. (1984) e Kiupel et al. (2011) e por Azul de Toluidina, quando necessário, para evidenciação dos grânulos citoplasmáticos (PROPHET et al., 1992). A graduação histológica foi realizada seguindo os critérios propostos por Kiupel et al. (2011).

#### *4.3 Contagem de macrófagos e vasos sanguíneos.*

Para a contagem de macrófagos, bem como de vasos sanguíneos, foram selecionados cinco campos não-sobrepostos com alta frequência (“*hot spots*”) de macrófagos e vasos em cada amostra, utilizando a objetiva de 40x. Uma imagem foi digitalizada ao centro da área ocupada pelo tumor e as outras 4 ao redor desta, a cada 45° (0, 3, 6, 9h). 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 macrófagos e vasos, para cada caso. Em animais com mais de uma lesão, utilizou-se o valor mais alto para cada parâmetro.

#### *4.4 Processamento Imuno-Histoquímico*

O processamento imuno-histoquímico foi realizado no Laboratório de Histopatologia do Departamento de Medicina Veterinária da FZEA-USP. A técnica foi

realizada com base no método descrito por Hsu et al. (1981), com modificações, a fim de se obter protocolos imuno-histoquímicos padronizados individuais para os anticorpos primários policlonais de coelho anti-iNOS de camundongo (Abcam®, cód. ab3523; Bioss®, cód. bs-2072R), para marcação de macrófagos M1; e anti-CD163 humano (Abcam®, cód. ab182422; Bioss®, cód. bs-2527R) para marcação de macrófagos M2, bem como o anticorpo policlonal de coelho anti-vWF humana (Dako®, IR527) para marcação de vasos sanguíneos e, monoclonal de camundongo anti-Ki67 humana (MIB-1, Dako®), para avaliação da proliferação celular, de acordo com as orientações do fabricante. Os cortes histológicos de MCTs, de aproximadamente 3 µm de espessura, aderidos a lâminas de vidro silanizadas (Starfrost®), foram desparafinados em estufa por 50 minutos a 65°C, seguidos de imersão em xilol 100%, 2 banhos de 15 minutos cada. A hidratação foi realizada em concentrações decrescentes de etanol (etanol absoluto, 95% e 70%), com banhos de 5 minutos e, finalmente, banho em água destilada.

A recuperação antigênica, bloqueio de proteínas inespecíficas, bloqueio da peroxidase endógena, bem como tampão de lavagem foi específico para cada anticorpo, conforme anexos A, B, C, D e E.

Os cortes histológicos foram delimitados com caneta hidrofóbica e, posteriormente, as amostras foram submetidas à incubação com anticorpo primário. A incubação do anticorpo primário foi realizada *overnight* à temperatura de 4°C, por 18 horas, com as diluições descritas. As lâminas de controle negativo foram incubadas com tampão PBS com BSA, sob as mesmas condições que as amostras positivas, a fim de confirmar a especificidade do anticorpo e desconsiderar interações inespecíficas. No dia seguinte, as amostras eram novamente lavadas três vezes em solução tampão por 5 minutos cada, em seguida incubadas com anticorpo secundário (EasyLink ONE, EP-12-20502, EasyPath®) por 30 minutos em temperatura ambiente. A revelação foi realizada com o cromógeno Diaminobenzidina (Cromógeno DAB, EP-12-20542, EasyPath®), por 20 segundos, seguido de banho em água destilada. A contracoloração foi realizada com Hematoxilina por 30 segundos, seguida de lavagem em água corrente. Em seguida foi realizada a desidratação da lâmina e montagem da lamínula.

Para as lâminas controle do anticorpo anti-iNOS (Bioss®, cód. bs-2072R), foi utilizada pele de cão com abscesso; do anticorpo anti-CD163 (Abcam®, cód. ab182422), linfonodo de coelho; do anticorpo anti-CD163 (Bioss®, cód. bs-2527R), linfonodo canino; e do anticorpo anti-vWF (Dako®, IR527), o próprio mastocitoma canino.

#### 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 CD163 foi realizada, inicialmente, em positiva ou negativa, e de forma semiquantitativa, utilizando escores para o número de macrófagos M2 marcados (0 para negativo, 1+ para macrófagos isolados e 2+ para grupos de macrófagos).

A avaliação de vWF foi realizada na região intratumoral, por meio de 5 imagens em campos não-sobrepostos, à objetiva de 40x (uma imagem ao centro da lesão e as outras 4 ao redor da primeira, a cada 45°). Foram contados microvasos (0,500 µm) e a média de vasos por imagem foi considerada como a densidade microvascular (MVD).

Para análise do marcador ki67 (MIB-1, DAKO) foram utilizados dados do banco de tumores do Laboratório de Patologia, do Departamento de Medicina Veterinária da FZEA-USP, de estudos anteriores de JOSELEVITCH et al (2018), onde realizaram a quantificação de ki67 na região intratumoral de MCTs por meio de análise de cinco campos microscópicos de 400x considerados de maior frequência de imunomarcação (“*hot spots*”). As imagens dos campos (0,08mm cada) foram salvas e os mastócitos positivos e negativos foram contados usando um software de análise de imagem (ImageJ, NIH, USA).

#### 4.5 Análise estatística

Os dados foram testados para normalidade pelos testes de Anderson-Darling e Komolgorov-Smirnov e, como não apresentaram distribuição normal, as análises foram realizadas por testes não-paramétricos. O teste de Mann-Whitney foi utilizado para comparação da positividade de imunomarcação entre os graus histopatológicos estabelecido segundo Kiupel et al. (2011). As correlações entre os parâmetros estudados foram verificadas por testes de correlação de Spearman. A análise de sobrevida foi

realizada pelo método de Kaplan-Meier seguido de pós-teste de Mantel-Cox (*logrank*). A análise estatística foi realizada com o auxílio dos softwares GraphPad Prism® (versão 8 para MacOS, GraphPad Software Inc.), com nível de significância de 5%.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Avaliação da população estudada

Foram incluídos neste estudo 34 cães diagnosticados com MCTs, sendo dezesseis machos (47,1 %) e dezoito fêmeas (52,9 %). A maior incidência foi em cães sem raça definida (9/34, 26,5%), seguida por animais das raças Labrador retriever e Golden retriever, (5/34, 14,7%). As demais raças foram, em ordem decrescente de frequência: Boxer e Pitbull (4/34, 11,8%), Dachshund (2/34, 6%); Fila brasileiro, Doberman pinscher, São Bernardo, Schnauzer e Blue Heeler com um exemplar de cada (1/34, 2,9%).

A média de idade dos cães com MCT neste estudo foi de 9 anos, variando de 3 a 16 anos. Os dados estão resumidos no Quadro 3. Quanto à localização dos tumores a maior incidência foi na região de extremidades e membros, acometendo 41,2% (14/34) dos casos, seguida da região de tórax e inguinal (7/34, 20,6%), região abdominal (5/34, 14,6%), e cabeça e pescoço (1/34, 3%). A maioria dos animais apresentava múltiplas lesões (21/34, 61,8%) e treze animais apresentavam uma única lesão (13/34, 38,2%).

**Quadro 2** – Distribuição dos dados dos animais incluídos no estudo, incluindo sexo, raça, idade, localização de lesão, grau histopatológico conforme Kiupel et al (2011), score de ki67, CD163 e MVD.

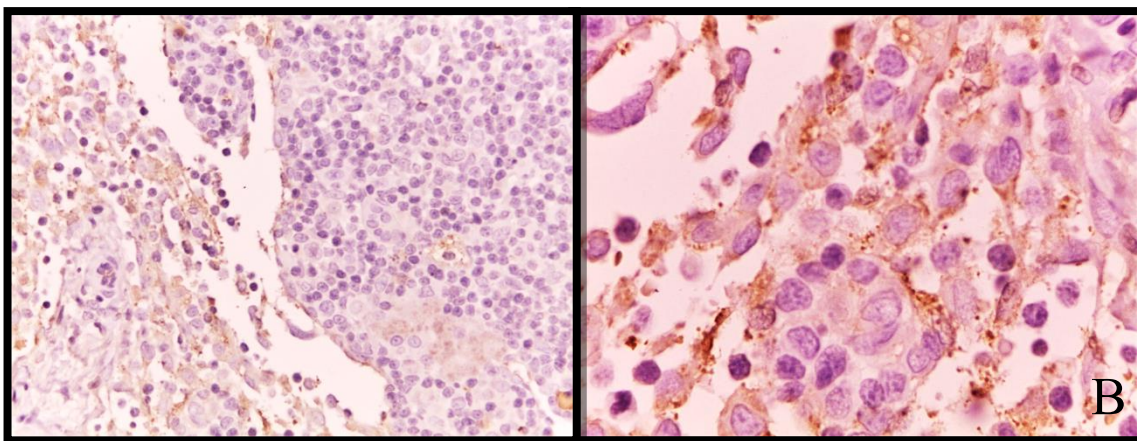
Identificação do tumor	Definição Racial	Sexo	Idade	Localização da lesão	Kiupel	ki67	CD163	MVD
RS-26	Fila	M	10	Tórax	1	12,73%	0	1,2
474	Boxer	F	4	Extremidade	1	2,00%	0	5,6
H198-14	Golden	F	9	Extremidade	1	8,75%	0	5,6
H431-21	Labrador	M	10	Inguinal	1		1	4,8
H129-14	Pit Bull	F	12	Inguinal	1	4,80%	1	5,6
H493-19	SRD	F	6	Extremidade	1		1	7
H525-15	Boxer	M	7	Extremidade	1		2	0
37543C	SRD	M	9	Inguinal	1	3,97%	2	5,4
H39-14	Labrador	M	9	Extremidade	1	3,80%	2	7,8
H78-12	Boxer	M	12	Tórax	2	4,59%	1	7,2
H22-14	Pit Bull	F	7	Tórax	2	13,12%	2	4,4
RS-02	Dachshund	M	12	Abdômen	2	2,27%	2	2,4
H04-16	SRD	M	13	Abdômen	2		2	5,2
<b>LESÃO MULTIPLA</b>								
H02-21	SRD	F	14	Extremidade	1		2	1,8
37800-C2	Dachshund	M	10	Extremidade	2		2	3,2
H71-12	Labrador	F	8	Tórax	2	8,53%	0	1,4
H74-12	Labrador	F	8	Tórax	2	10,05%	0	4,6
H73-12	Labrador	F	8	Tórax	2		0	5,4
H73-15	Pitbull	M	10	Inguinal	2		2	4,6
H74-15	Pitbull	M	10	Inguinal	2		0	4,8
H069/21	SRD	F	4	Abdômen	2		2	5,8
H510/21	SRD	F	8	Extremidade	2		1	5,4
37104-C2	Boxer	F	8	Extremidade	2	2,86%	1	3,2
36513-C	Doberman	M	9	Extremidade	2	6,59%	1	5
H65-21	São Bernardo	F	8	Abdômen	2		1	2,8
H1249-18	Blue Heeler	F	8	Cabeça/pescoço	2		0	4
H432-21	Schnauzer	M	16	Extremidade	2		1	5,4
H1058/19	SRD	F	10	Inguinal	2		2	4,6
H1059-19	SRD	F	12	Extremidade	2		2	4,6
H171-19	SRD	M	5	Extremidade	2		0	10,2
H430-21	Golden	F	10	Inguinal	2		0	6,2
H439-21	Golden	M	11	Extremidade	1		2	10,2
<b>CASOS COM QT</b>								
H497-15	Golden	F	3	Abdômen	1		1	5,2
H978/19	Golden	M	6	Tórax	1		1	10

Legenda – M: macho, F: fêmea, SRD: sem raça definida

## 5.2 Marcações Imuno-Histoquímicas

Inicialmente, foram adquiridos dois anticorpos, selecionados com auxílio da ferramenta BLAST (NCBI-NIH) e alinhamento de proteínas da espécie do anticorpo primário com a proteína de cão. O anticorpo anti-CD163 (Abcam®, cód. ab182422), utilizado para marcação de macrófagos polarizados em M2 foi testado em diversas variações de protocolo, conforme ANEXO A. Apesar de possuir indicação para tecidos caninos e de apresentar marcação específica e esperada em tecidos de coelho (Fig. 1), não houve marcação alguma em tecidos caninos.

**Figura 2** - Fotomicrografias de linfonodo de coelho mostrando padrões de imunomarcação para CD163



FONTE: LEITE, 2021.

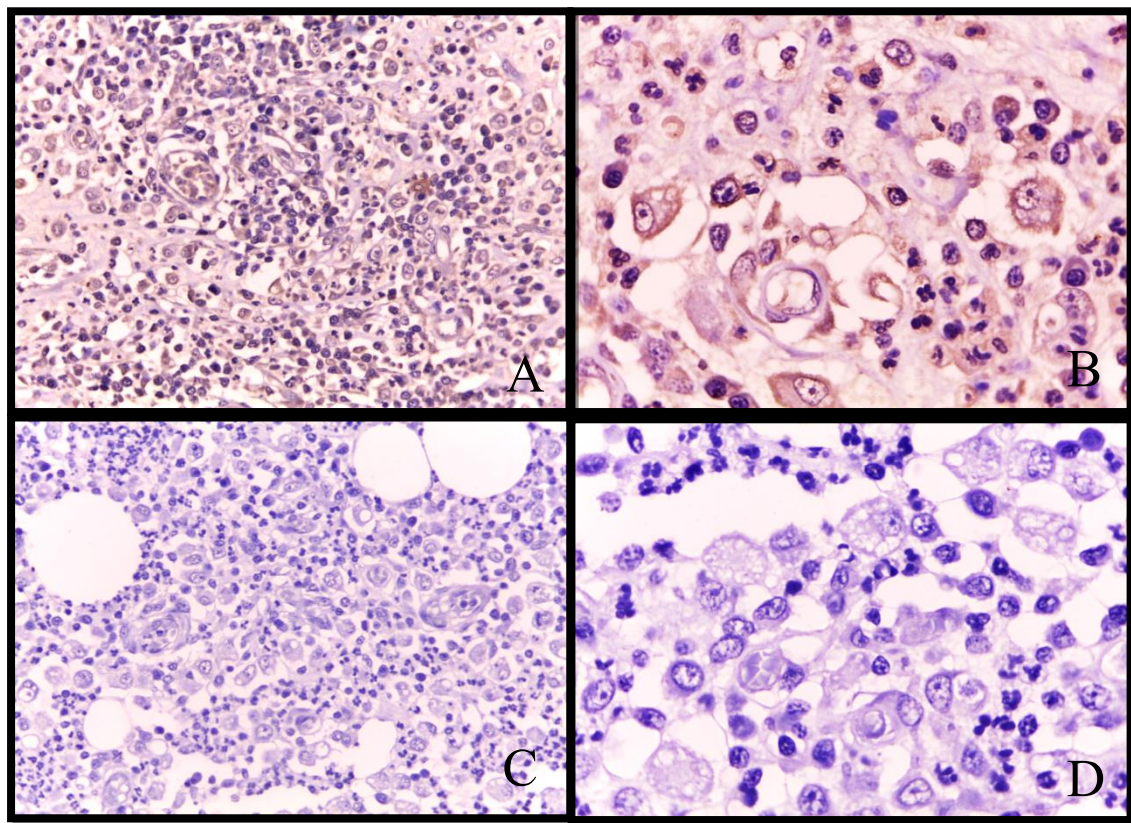
Legenda: Imunomarcação para CD163. Nota-se a marcação citoplasmática granular em macrófagos na região de seios medulares do linfonodo de coelho em (A) Obj. 40x e (B) Obj. 100x. Imuno-histoquímica, DAB, contracoloração com Hematoxilina de Harris.

Para avaliação dos macrófagos M1 utilizamos o anticorpo anti-iNOS (Abcam®, cód. ab3523), cujo fabricante atestava em *datasheet* a reatividade para tecido canino. O anticorpo foi testado por diversas vezes e variações de protocolos, conforme descrito no ANEXO B. Embora tenha indicação para tecido de cão pelo fabricante, não obtivemos resultados satisfatórios em nenhum dos testes. Adquirimos, então, um novo anticorpo para marcação de macrófagos M1, Anti-iNOS (Bioss®, cód. bs-2072R), cujo fabricante



também atestava em *datasheet* a reatividade para tecido canino. Para esse Anticorpo obtivemos resultados satisfatórios com imunomarcção positiva em tecido controle (abscesso cutâneo de cão, Figura 3). Os controles negativos foram realizados com IgG de coelho, onde obtivemos o resultado esperado. Porém, observamos marcações em grânulos mastocitários (Figuras 3 e 4).

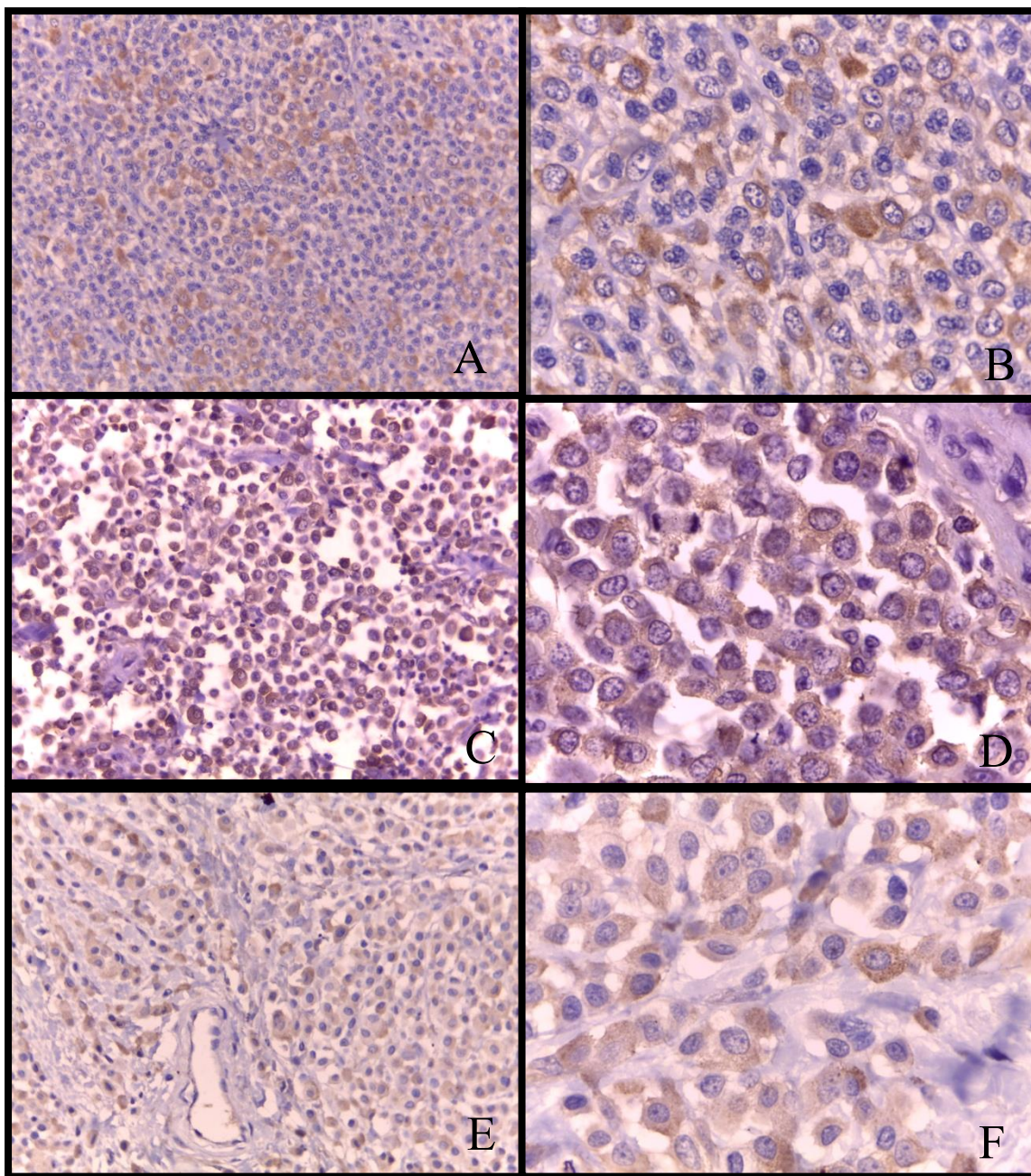
**Figura 3** - Fotomicrografias de abscesso cutâneo canino mostrando padrões de imunomarcção para iNOS.



FONTE: LEITE, 2021.

Legenda: Imunomarcção para iNOS. Nota-se a marcação citoplasmática granular em macrófagos (A) Obj. 40x e (B) Obj. 100x; Controles negativos para iNOS com IgG normal de coelho em substituição ao anticorpo primário (C) Obj. 40x e (D) Obj. 100x. Imuno-histoquímica, DAB, contracoloração com Hematoxilina de Harris.

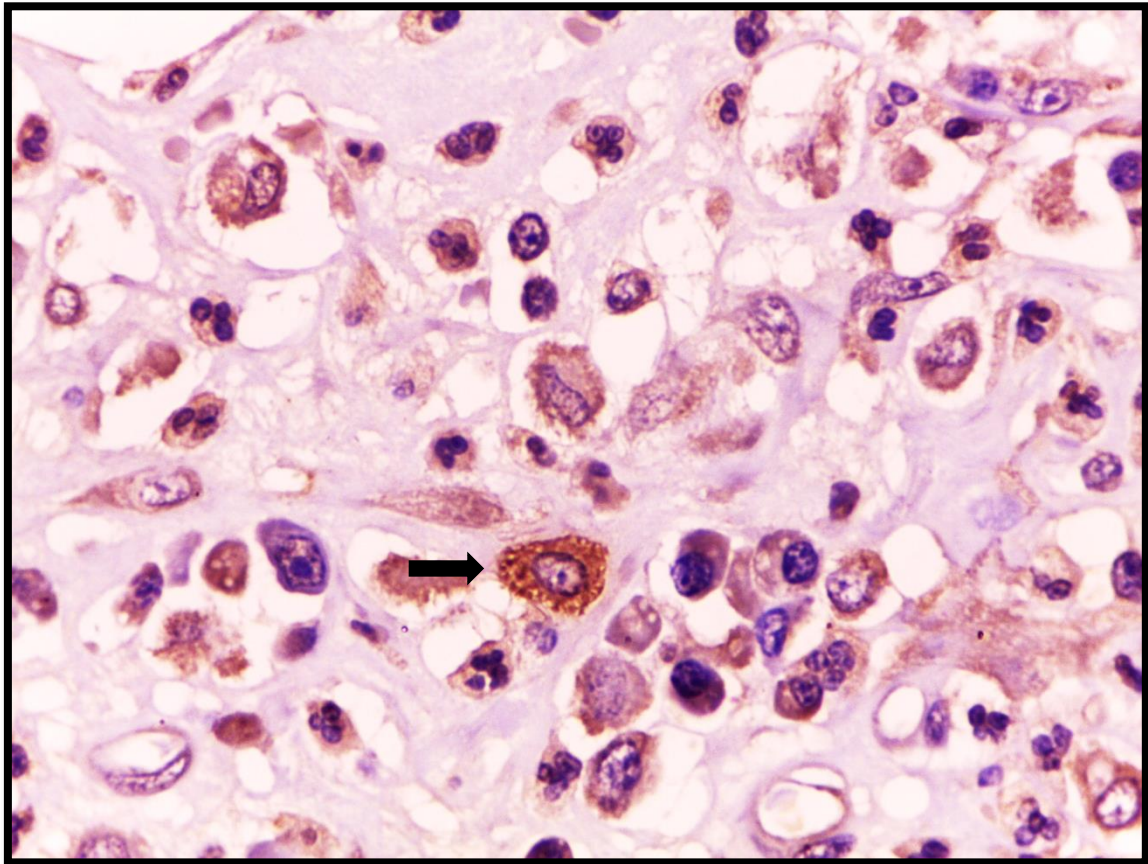
**Figura 4** - Fotomicrografias de MCTs caninos mostrando padrões de imunomarcacão para iNOS.



FONTE: LEITE, 2021.

Legenda: Imunomarcacão para iNOS em MCTs cutâneos caninos. Notam-se marcações citoplasmáticas granulares em mastócitos e macrófagos (A, C e E) Obj. 40x (B, D e F) Obj. 100x. Imuno-histoquímica, DAB, contracoloração com Hematoxilina de Harris.

**Figura 5** - Fotomicrografia de tecido cutâneo canino mostrando padrões de imunomarcacão de iNOS em mastócito.



FONTE: LEITE, 2021.

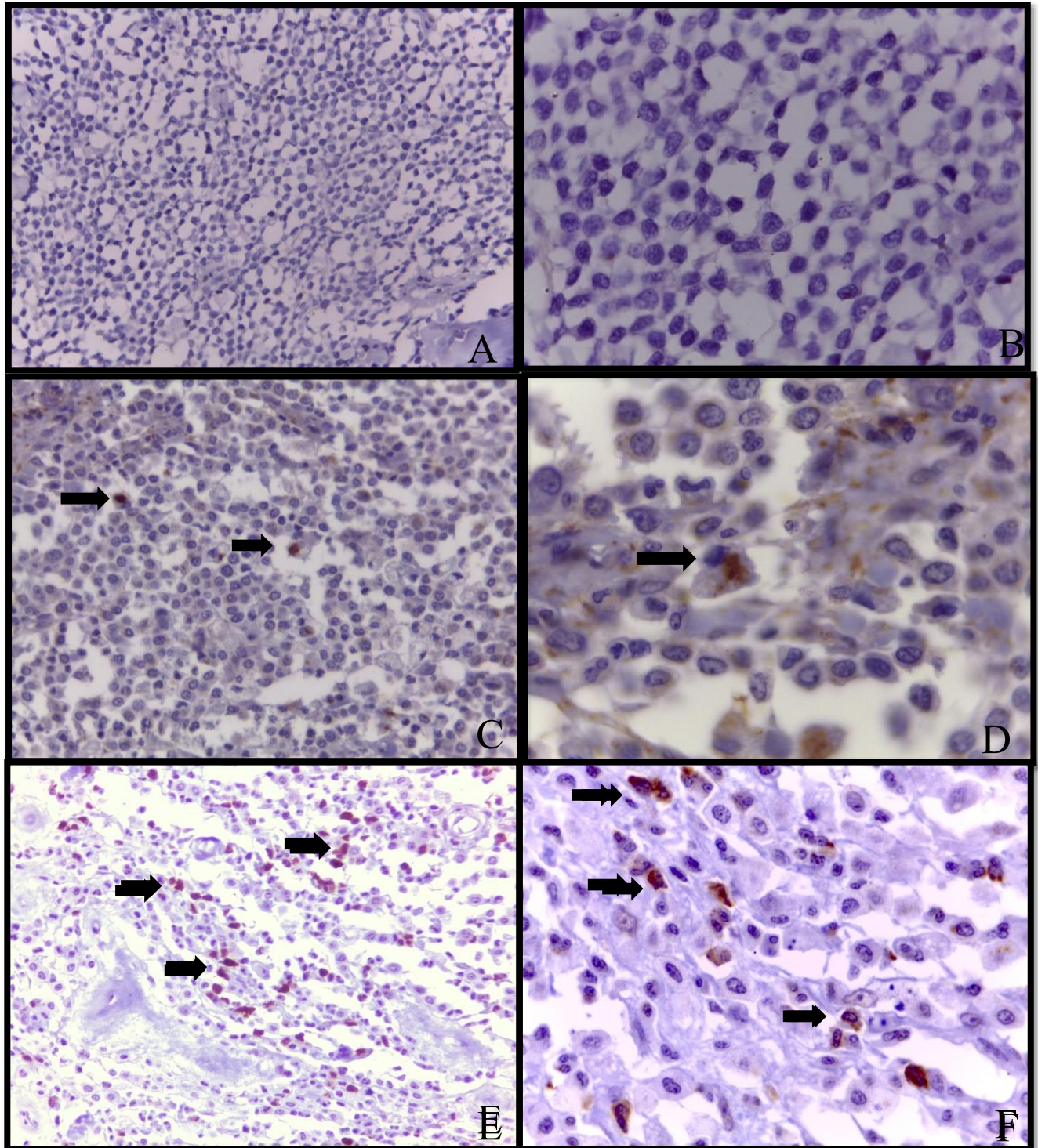
Legenda: Imunomarcacão para iNOS. Nota-se a marcação citoplasmática granular inespecífica em mastócito (seta). Obj. 100x. Imuno-histoquímica, DAB, contracoloração com Hematoxilina de Harris.

O anticorpo para avaliação dos macrófagos M2, anti-CD163 (Bioss®, cód. bs-2527R), foi eficiente e possível de se determinar um protocolo de marcação imuno-histoquímica para o em tecido canino descrito (ANEXO D). Obtivemos resultados satisfatórios com imunomarcacão (Figura 6), restrita a células mononucleares compatíveis com macrófagos.

A imunomarcacão para CD163 foi positiva em 70,6% dos casos (24/34) e negativa em 29,14% dos casos (10/34), sendo que o padrão de imunomarcacão encontrado foi citoplasmático granular

A imunomarcação para anti-vWF foi positiva em 97% dos casos (33/34), e em 3% dos casos não houve marcação (1/34), sendo que o padrão de imunomarcação encontrado de células endoteliais, (Figura 7)

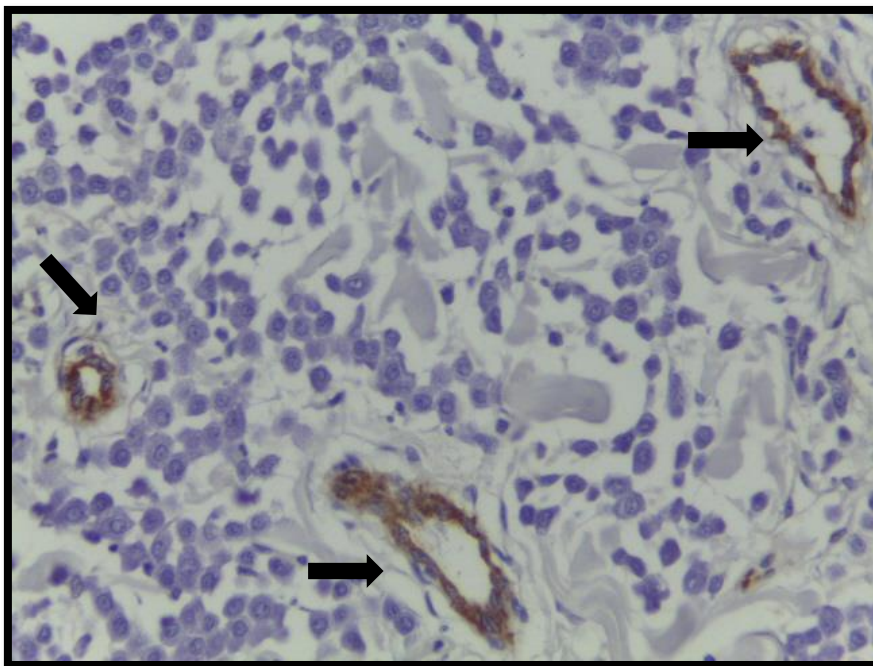
**Figura 6** - Fotomicrografia de tecido cutâneo canino (mastocitoma) mostrando scores para o número de macrófagos M2, bem como padrões de imunomarcação de CD163 em macrófago.



FONTE: ~~LEITE, 2022.~~

Legenda: Fotomicrografia de imunomarcção de CD163 em mastocitoma cutâneo canino, bem como escore para o número de macrófagos. A e B – Fotomicrografia de mastocitoma cutâneo canino, escore 0 (0 = negativo, nenhum macrófago encontrado). Objetiva 40x e 100x, respectivamente. C e D - Nota-se marcação citoplasmática em macrófagos (setas), escore 1 (1= macrófagos isolados). Objetiva 40x e 100x respectivamente. E e F - Nota-se marcação citoplasmática em macrófagos (setas), escore 2 (2 = grupos de macrófagos) Objetiva 40x e 100x, respectivamente. Cromógeno DAB, contracoloração em Hematoxilina de Meyer

**Figura 7** - Fotomicrografia de MCT mostrando padrões de imunomarcção de vWF em células endoteliais.

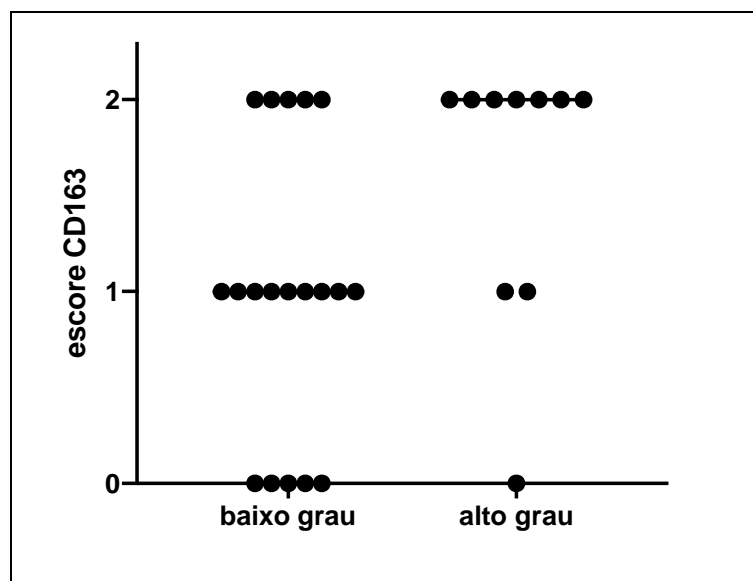


FONTE: LEITE, 2022.

Legenda: Fotomicrografia de imunomarcção de vWF em mastocitoma cutâneo canino. Nota-se marcação de células endoteliais (setas). Objetiva 40x, cromógeno DAB, contracoloração em Hematoxilina de Meyer

A comparação das imunomarcações de CD163 entre os graus histopatológicos classificados pelo método de Kiupel et al. (2011) apresentou diferenças estatisticamente significantes para positividade das amostras em relação ao escore, com maior quantidade de macrófagos nos MCTs de alto grau ( $p=0,0386$ , Figura 8)

**Figura 8** – Distribuição dos escores de macrófagos em função da graduação de Kiupel et al. (2011).

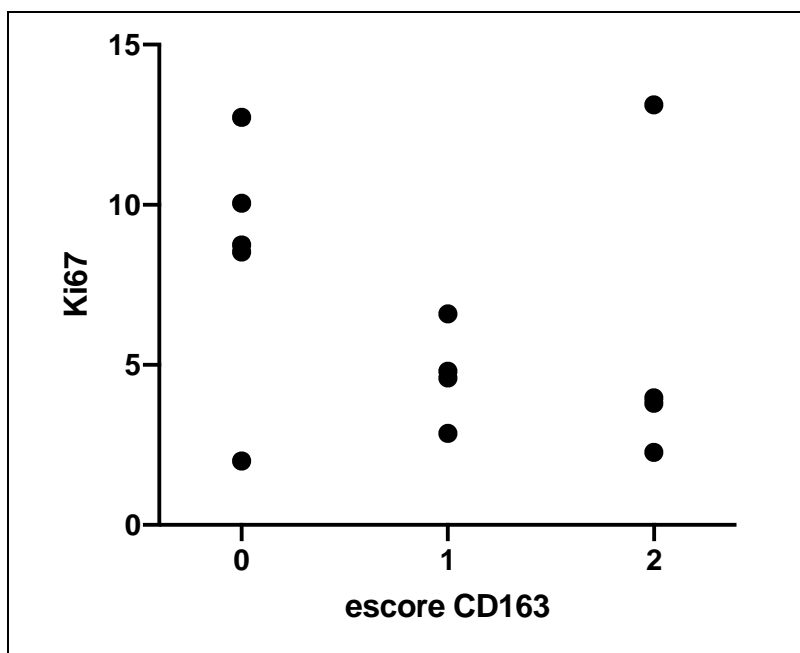


Legenda: Observa-se que nos MCTs de alto grau os macrófagos são mais numerosos. Teste de Mann-Whitney ( $p=0,0386$ ).

A densidade de vasos sanguíneos em relação a graduação de Kiupel et al (2011) não apresentou valores estatisticamente diferentes ( $p=0,6026$ ). Para esta análise foram comparadas 19 lesões de baixo grau a 11 lesões de alto grau (Figura 9).

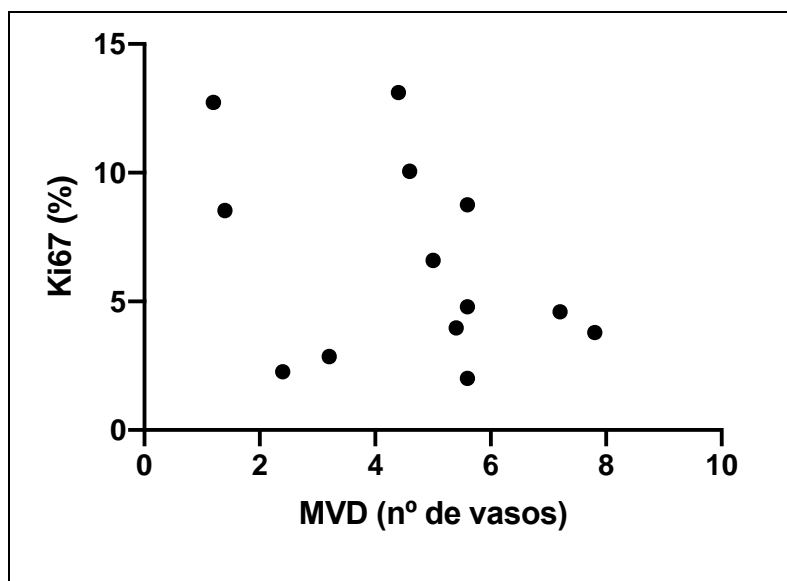


**Figura 11** – Teste Spearman de correlação para 13 lesões disponíveis para análise de ki67 e score CD163.



Legenda: Teste de correlação de Spearman ( $p = 0,3101$ )

**Figura 12** – Teste Spearman de correlação para 13 lesões disponíveis para análise de ki67 (proliferação celular) e MDV (microdensidade vascular).

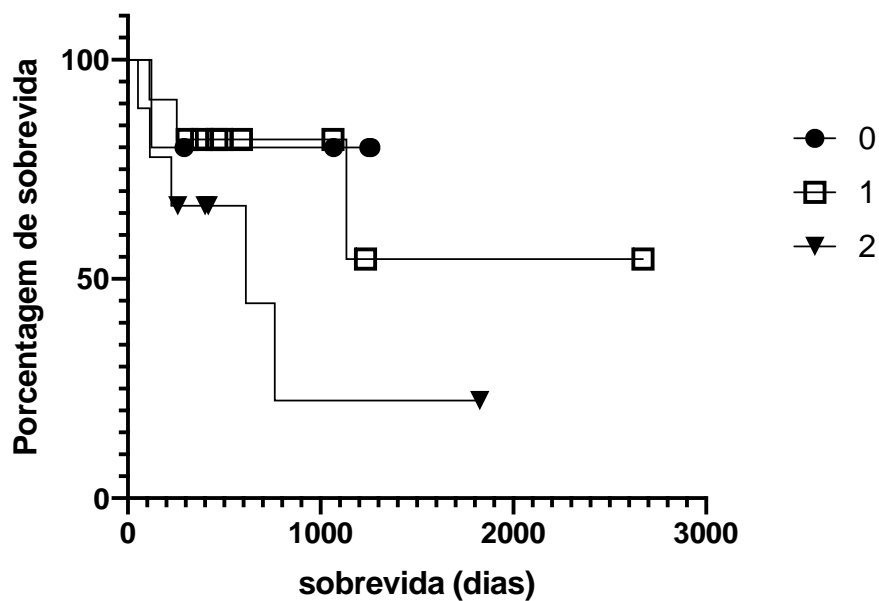


Legenda: Teste de correlação de Spearman ( $p = 0,2859$ )



A sobrevida dos animais estudados em função da imunomarcção para CD163 foi não apresentou diferenças significantes entre os grupos (escores) estudados ( $p=0,2201$ , mediana de sobrevida foi de 612 dias para escore 2, Fig.13).

**Figura 13** - Curva de sobrevida de Kaplan Meier para os pacientes estudados, em função da expressão imuno-histoquímica para CD163.



Legenda: Kaplan Meier ( $p=0,2201$ ), mediana de sobrevida = 612 dias.

## 6. DISCUSSÃO

Mastocitomas cutâneos caninos (MCTs) são tumores com alta incidência na clínica médica de pequenos animais, sendo o tumor de pele de maior malignidade, correspondendo a 11% dos casos de neoplasias cutâneas em cães (DE NARDI et al., 2022). A graduação histológica ainda é a ferramenta prognóstica mais utilizada para determinar tratamento e prognóstico, entretanto, sabe-se que ela não consegue prever o comportamento de todos MCTs, sendo assim, necessário o estudo de marcadores adicionais, visando prever o comportamento desses tumores. (STREFEZZI et al, 2009; STREFEZZI et al, 2010; KIUPEL et al, 2011).

No presente estudo, encontramos porcentagens semelhantes de acometimento pelos MCTs em fêmeas e machos, em concordância com vários autores que relatam não haver predisposição sexual para acometimento dessa neoplasia (LONDON, SEGUIN, 2003; PATNAIK; EHLER; MACEWEN, 1984; SMIECH et al, 2018; THAMM; VAIL, 2007; WELLE et al., 2008). Apenas o estudo de Simões et al. (1994) indicou maior incidência em fêmeas. A idade média dos animais ao diagnóstico também corroborou dados da literatura, ou seja, cães idosos são mais acometidos. (BLACKWOOD et al, 2012; SMIECH et al, 2018; STREFEZZI et al, 2010; THAMM, 2013).

Com relação às raças dos cães obtivemos 26,5% dos casos representados por animais sem raça definida e 73,5% dos casos por animais de raça. Entre os últimos as raças Labrador Retriever e Golden Retriever foram as mais prevalentes, cada uma representando 14,7%, seguida de Boxer e Pitbull, representando 11,8% cada, o que corrobora com a maior parte dos estudos os quais relatam maior incidência nas raças Labrador Retriever, Golden Retriever e Boxer como as mais prevalentes (DE NARDI et al, 2002; KIUPEL et al, 2011; MOCHIZUKI et al, 2016; SMIECH et al, 2018). Nossa casuística provavelmente não reflete adequadamente a população canina no Brasil, uma vez que os casos selecionados vieram de hospitais específicos (hospitais escola e clínicas especializadas em oncologia).

Em relação à localização das lesões, 41,2% foram em extremidade/membros, seguida por tórax e região inguinal, cada uma representando 20,6%. A literatura descreve taxas semelhantes a estas (BOSTOCK, 1973; BLACKWOOD et al, 2012; WELLE et al, 2008). No que diz respeito à presença de múltiplos nódulos, 61,8% dos animais inseridos

neste estudo apresentaram lesões múltiplas. Entretanto, é sabido que os MCTs se apresentam como lesões únicas na maioria dos casos (MURPHY et al, 2006). O'Connell e Thompson (2013) sugerem em seus estudos que múltiplas lesões não tiveram significância na sobrevida global de pacientes com MCTs. Em contrapartida, Kiupel et al. (2005) referem um pior prognóstico para esses pacientes.

A graduação histopatológica dos MCTs ainda é uma questão que gera bastante discussão, principalmente em tumores que são classificados em situações limítrofes entre os graus. A classificação de Patnaik et al. (1984) é a mais utilizada, porém, em nosso estudo, classificamos os tumores pela proposta de Kiupel et al. (2011), uma vez que só estava disponível uma lesão de grau I, insuficiente para análises estatísticas. Os MCTs de baixo grau foram a maioria, resultado semelhantemente ao observado por outros pesquisadores (KIUPEL et al, 2004; WELLE et al, 2008; TAKEUCHI et al, 2013).

Nas últimas duas décadas, estudos evidenciaram a importância da compreensão do microambiente tumoral, sendo este determinante no comportamento e desenvolvimento do câncer (KIM; BAES, 2016). O microambiente tumoral é apontado também como potencial alvo terapêutico, uma vez que células tumorais interagem com células do próprio organismo e desempenham papéis decisivos na progressão do tumoral, metástase e respostas terapêuticas (XIAO; YU, 2021).

Sabe-se que macrófagos compreendem grande parte do infiltrado tumoral. Porém, ao invés de desempenharem ação antitumoral, podem favorecer a progressão, liberando fatores de crescimento, remodelando a matriz extracelular, facilitando a angiogênese e formação de metástases (MONTEIRO et al., 2018; KIM; BAES, 2016). Macrófagos associados ao tumor têm sido amplamente estudados em diversos cânceres humanos, uma vez que estão intimamente ligados a angiogênese e metástase (LEEK et al., 2006; MANTOVANI et al., 2012; YURI et al., 2015). HANAHAN e WENBERG (2011) sugerem que macrófagos na margem do tumor têm habilidade de promover a invasão local, ativando enzimas que degradam a matriz extracelular, como metaloproteinases e proteases.

Os macrófagos podem se polarizar em dois perfis: M1, ativados pela via clássica; e M2, ativados por via alternativa. Macrófagos M1 possuem atividade antitumoral, devido às citocinas liberadas, e os M2 são considerados pró-tumorais, uma vez que têm a capacidade de suprimir a função dos primeiros, além de atuar diretamente na angiogênese

e no reparo tecidual. São relacionados a pior prognóstico em diversos cânceres (BARBOSA et al., 2015; DERLINDATI et al., 2015; FAGONE et al; 2012: KRAUSGRUBER 2011, MANTOVANI et al., 2004; MARTINEZI; GORDON, 2014; TAKEYA; KOMOHARA, 2016).

Utilizamos o marcador CD163 para identificação dos macrófagos M2. Embora tenhamos comparado as proteínas CD163 humana e de coelho com a CD163 de cão por alinhamento de proteínas para escolha dos anticorpos a serem adquiridos, bem como nos apoiados em recomendações dos fabricantes dos anticorpos primários, a marcação dos macrófagos M2 com o anticorpo anti-CD163 da marca Abcam® (cód. ab182422) não rendeu resultados satisfatórios. Acreditamos que o CD163 canino apresente pequenas variações moleculares que dificultaram as ligações específicas nos sítios de ligação. Em um segundo momento, utilizando o anticorpo CD163 da marca Bioss® (cód. bs-2527R), atingimos um resultado positivo.

A contagem das células positivas para CD163 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 relação ao anticorpo iNOS, apesar de alcançarmos os resultados esperados na marcação de macrófagos M1 nos tecidos controle, ainda verificamos a marcação de mastócitos, mesmo após diversas variações de protocolo para recuperação antigênica, bloqueio de proteínas e de peroxidase endógena. Inicialmente, acreditávamos que mastócitos não produzem iNOS, uma vez que este é considerado um marcador confiável para macrófagos M1. Entretanto, percebemos que os mastócitos caninos reagem de modo variável a esse marcador, tanto em processos inflamatórios como nos MCTs. Uma das possibilidades para explicar este fato pode ser a ligação iônica inespecífica entre o anticorpo anti-iNOS e os grânulos de mastócitos (HARLEY et al., 2002). Tal ligação inespecífica ocorre pelo fato de os grânulos dos mastócitos possuírem sulfatos e grupos carboxila (BUSSOLATI; GUGLIOTTA, 1983). Bussolati e Gugliotta (1983), relataram que um pré-tratamento das lâminas com polipeptídeo sintético de poli-L-lisina, de carga positiva, pode impedir a ligação iônica inespecífica do anticorpo aos grânulos dos mastócitos. Entretanto, não obtivemos resultados satisfatórios utilizando esta técnica, mesmo após diversas alterações de protocolo descritos no ANEXO F.

É importante ressaltar que, dentre as dificuldades encontradas durante o processo da imuno-histoquímica, a maior delas ocorreu pela falta de anticorpos específicos para tecidos de cão. Na falta de anticorpos específicos para a espécie canina adaptamos anticorpos que apresentaram reatividade cruzada entre antígeno do anticorpo adquirido e antígeno canino, ou seja, proteínas similares.

Analisamos a correlação entre a densidade microvascular e a quantidade de macrófagos M2 por meio da imunomarcagem de vWF, mas não encontramos resultados significantes entre os parâmetros ( $p = 0,5601$ ). Sabe-se que a presença de macrófagos no sítio tumoral tem alta correlação com a invasão e angiogênese tumoral, pelo fato destas células produzirem VEGF, angiogenina e TNF-alfa, realizar degradação de matriz extracelular por meio de proteases e metaloproteinases, além de suprimirem a função antitumoral das células T, o que favorece a angiogênese e a progressão neoplásica (BINGLE et al., 2004; HANAHAN; WENBERG, 2011; RIABOV et al., 2014). A presença de macrófagos M2 em diversos cânceres humanos e sua capacidade de favorecer a angiogênese e, conseqüentemente, promover metástases tem sido estudada amplamente (BINGLE et al., 2006; BARBOSA, 2015; KOMOHARA et al., 2012; TAKEYA; KOMOHARA, 2016; KUBLER et al., 2014; YUAN, 2014; ZHONG et al., 2018). RIABOV et al. (2014) sugerem que a presença de TAMs em áreas menos vascularizadas do tumor e estarem associados a uma expressão pró-angiogênica, com alta expressão de VEGF-A. KOMOHARA et al (2012) relata essa associação a um mau prognóstico clínico em tumores pancreáticos, linfoma, melanoma, leiomiossarcoma, carcinoma de células renais e glioma de alto grau.

Na oncologia veterinária, poucos trabalhos relatam sobre a densidade de TAMs associados ao prognóstico em cães. Em adenocarcinomas mamários caninos de diferentes graus de malignidade, com ou sem metástase à distância, a infiltração de TAMs, assim como a expressão de MCSF-R (receptor para o fator de crescimento estimulador de colônias de macrófagos) foi relacionada com pior prognóstico, com resultados similares aos estudos em humanos (KROL et al., 2012; RAPOSO et al., 2012).

HUETE (2016) não encontrou diferenças significantes na incidência de TAMs em animais com MCTs entre os graus histopatológicos, bem como a relação à sobrevida pós-cirúrgica. Cabe destacar que o marcador utilizado neste estudo, CD68, não distinguia entre macrófagos M1 e M2.

Não foram encontrados trabalhos avaliando a quantidade de macrófagos M2 em MCTS cutâneos caninos, nem buscando relacioná-los ao prognóstico desta doença. Nossos resultados não apontam diferenças significantes na incidência de macrófagos M2 em animais com MCT e na densidade microvascular (MDV).

Para contagem de macrófagos M2 intratumorais, não foi possível detectar diferenças entre as sobrevividas dos animais analisados quando divididos pelos escores propostos para avaliação da marcação de CD163. Resultados semelhantes foram obtidos na comparação aos graus histopatológicos seguindo a classificação proposta por Kiupel et al. (2011). Foi analisada, ainda, a correlação entre Ki67 e vWF, no intuito de verificar se o número de vasos sanguíneos facilitaria a proliferação celular, mas sem resultados significantes. Nossos resultados discordam dos estudos em cânceres humanos (KÜBLER et al., 2014; YUAN et al., 2014).

Entretanto, pudemos observar que a densidade de macrófagos M2 correlaciona-se positivamente com os graus histopatológicos de Kiupel et al. (2011), ou seja, maior número de macrófagos é encontrado em MCTs de alto grau. Novos estudos devem ser realizados afim de confirmar nossas observações e elucidar o papel dos macrófagos M2 em MCTs, visto que o reduzido número de amostras, bem como a dificuldade de acompanhamentos clínicos podem resultar em um viés de análise.

## 7. CONCLUSÕES

- A densidade de macrófagos M2, identificados pela positividade para CD163, é maior nos MCTs de alto grau histopatológico;
- Não há correlação entre a quantidade de macrófagos marcados por CD163 e o número de vasos sanguíneos marcados por vWF ou o índice de Ki67;
- A densidade de macrófagos M2 não é um indicador prognóstico para mortalidade em função do MCT, nem para o tempo de sobrevida pós-cirúrgica;
- Estudos complementares, com maior número de casos analisados, são necessários para a confirmação de nossas observações.

## 8. REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K, LICHTMAN, A. H., POBER J. S. **Cellular and molecular Immunology**. 4 ed. London: W.B. Saunders, 2000, 553 p.

ALEGRANCI, P. Análise dos macrófagos M1 e M2 durante a infecção por *Sporothrix schenckii* em modelo murino. 2013. 97 f. **Tese de doutorado** - UNESP, 2013.

ARGYLE, D. J.; BLACKING, T. From viruses to cancer stem cells: Dissecting the pathways to malignancy. v. 177, p. 311–323, 2008.

ARESU, L., ARICO, A., COMAZZI, S., GELAIN, M. E., RIONDATO, F., MORTARINO, M., CASTAGNARO, M. VEGF and MMP-9: biomarkers for canine lymphoma. **Vet Comp Oncol**, v. 12(1), p. 29-36, 2014.

ARICO, A., GIANTIN, M., GELAIN, M. E., RIONDATO, F., COMAZZI, S., RUTGEN, B. C., ARESU, L. The role of vascular endothelial growth factor and matrix metalloproteinases in canine lymphoma: in vivo and in vitro study. **BMC Vet Res**, v. 9, p. 94, 2013.

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

BARBOSA, N. G. et al., Immunohistochemical study of macrophages subpopulations associated with squamous cell carcinoma of the tongue, with and without metastasis, v.51, n.6, p 415-421, 2015

BARRA, C.N.; MACEDO, B.M.; CADROBBI, K.G, et al. Apoptotic intrinsic pathway pro-teins predict survival in canine cutaneous mast cell tumours. **Veterinary and Comparative Oncology**.2018



BARROS, M.H.; HAUCK, F.; DREYER, J.H.; KEMPKE, B.; NIEDOBITEK, G. Macrophage polarisation: an immunohistochemical approach for identifying M1 and M2 macrophages. **PLOS One**. 2013

BEIRÃO et al., Canine mammary cancer cells direct macrophages toward an intermediate activation state between M1/M2. **BMC Veterinary Research**, 11: 151, 2015

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.

BEYER, M.; MALLMANN, M.R.; XUE, J. STARATSCHEK-JOX, A.; VORHOLT, D.; KREBS W, et al. High-resolution transcriptome of human macrophages. **Plos one**, v.7, p.454,466, 2012

BLACKWOOD L, et al. European consensus document on mast cell tumours in dogs and cats. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 10, n.3, e1-e29, 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.

BOYCE, J.A Mast cells: beyond IgE. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v 111, p. 24-32, 2003

BRAZ, P. H., et al. Classificação citológica do grau de malignidade de mastocitomas em cães. *Pesquisa veterinária Brasileira* **PUBVET**. v.11, n.11, p.1114-1118, 2017

BINGLE, L.; BROWN, N. J.; LEWIS, C. E. The role of tumour-associated macrophages in tumour progression Implications for new anticancer therapies. **Journal of Pathology**, v. 196, n. 3, 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.

CAMUS, et al. 2016. Cytologic Criteria for Mast cell tumor grading in dogs with evaluation of clinical outcome. **Veterinary Pathology**, 1-7, 2016.

CEMAZAR, M; MIKLAVCIC, D; MIR, L.M; BELEHRADEK JR, J; BONNAY, M; FOURCAULT, D; SERSA, G. Electrochemotherapy of tumours resistant to cisplatin: a study in a murine tumour model. **European Journal of Cancer**, v.37, p. 1166–1172, 2001.

CEMAZAR, M., AMBROZIC, J., PAVLIN, D. Efficacy and safety of electrochemotherapy combined with peritumoral IL-12 gene electrotransfer of canine mast cell tumours. **Veterinary and Comparative Oncology**, 2016.

CHANMEE, T.; ONTONG, P.; KONNO, K.; ITANO, N. Tumor-Associated Macrophages as Major Players in the Tumor Microenvironment. **Cancers**. 6, 1670–1690, 2014

CHISTIAKOV, D.A; BOBRY SHEV, Y.V; NIKIFOROV, N.G, ELIZOVA, N.V; SOBENIN, I.A; OREKHOV, A.N. Macrophage phenotypic plasticity in atherosclerosis: The associated features and the peculiarities of the expression of inflammatory genes. **Int J Cardiol**, v.184, p.436-45, 2015.

COUTO, G.C. Mast cell tumour destruction in dogs. In: **56° Congresso Internazionale Multisala Scivac**, 2007, Rimini, Italy. Prague: SCIVAC, p.193-195, 2007

CRIVELLATO, E.; BELTRAMI, C.; MALLARDIE, F; RIBATTI, D. Paul Ehrlich's doctoral thesis: a milestone in the study of mast cells. **British Journal of Haematology**, v. 123, p. 19-21, 2003.

CROSS, P. C. MERCER, K. L. **Cell and tissue ultrastructure: a functional perspective** New York: W. H. Freeman, 420, 1993.

DALECK, C. R., ROCHA, N. S., FURLANI, J. M. et al. Mastocitoma. In: DALEK, C. R., DE NARDI, A. B., RODASKI, S. **Oncologia em cães e gatos**. 1.ed. São Paulo: Roca, 2009. cap.16. p.281-292.

DALECK, C. R., ROCHA, N. S., FURLANI, J. M. et al. Mastocitoma. In: DALEK, C. R., DE NARDI, A. B., RODASKI, S. **Oncologia em cães e gatos**. 2. Ed. Rio de Janeiro: Roca, 2016.

DE NARDI, et al. Prevalências de neoplasias e modalidades de tratamentos em cães, atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal do Paraná. **Archives of Veterinary Science**; 7(2):15-26, 2002.

DE NARDI B. A, et al. Brazilian consensus for the diagnosis, treatment and prognosis of cutaneous mast cell tumors in dog. **Investigação. Small Animal Practice**. Colégio Brasileiro de Cirurgia e Anestesiologia veterinária, v.17, n 1: 01-15,2018.

DE NARDI, A. B. et al. Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine Cutaneous and Subcutaneous Mast Cell Tumors. **Cells**. V. 11, p. 618, 2022

DERLINDATI, E.; DEI C.A.; MONTANINI, B.; SPIGONI, V.; CURELLA, V.; ALDIGERI.; K, et al. Transcriptomic analysis of human polarized macrophages: more than one role of alternative activation? **Plos one**, 2015.

DOBSON J. M. & SCASE T. J. Advances in the diagnosis and management of cutaneous mast cell tumours in dog. **J. Small Animal Practice**. 48:424–431, 2007.

ELLING, H.; UNGEMACH, F. R. Sexual hormone receptors in canine mast cell tumour cytosol. **Journal of Comparative Pathology**, v. 92, p. 629-30, 1982.

FAGONE, P.; ROSA, MD, PALUMBO, M.; GREGORIO, CD.; NICOLETTI, F.; MALAGUARNERA, L. Modulation of heat shock proteins during macrophage differentiation. **Inflamm Res**, v.61,1131- 1139, 2012.

FAN, T. M. DE LORIMIER, LP. Treatment options for canine cutaneous mast cell tumours. **Veterinary Medicine**, v. 100 p.272. 2005.

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.

FOX L E, ROSENTHAL, R. C, TWEDT, D. C. Plasma histamine and gastrin concentrations in 17 dogs with mast cell tumors. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.4, p.242-6, 1990.

FUNES, S. C., RIOS, M., ESCOBAR-VERA, J. & KALERGIS, A. M. Implications of macrophage polarization in autoimmunity. **Immunology** 154, 186–195, 2018.

FURLANI, J.M. Estudo retrospectivo dos casos de mastocitoma canino atendidos junto ao serviço de oncologia do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” da FCAV/UNESP/Campus de Jaboticabal, no período de janeiro de 2001 a junho de 2004. 2004. 103p. **Dissertação de Mestrado**

GALLI, S. L, KALESNIKOFF, J., GRIMBALDESTON, M. A: PILIPONSKY, A. M.; WILLIAMS, C. M.; TSAI, M. Mast cells as "tunable" effector and immunoregulatory cells: recent advances. **Annual Review of Immunology**, v.23, p.749-786, 2005.

GARCIA, G., BRAZIS, P, MAJO, N. et al. Comparative morphofunctional study of dispersed mature canine cutaneous mast cells and BR cells, a poorly differentiated mast cell line from a dog subcutaneous mastocytoma. **Veterinary Immunology and Immunopathology** v.62, p.323-371, 1998.

GINN, P. E; FOX, L. E, BROWER, J. C, GASKIN, A, KURZMAN, I D. KUBILS, P. S. Immunohistochemical detection of p53 tumor-suppressor protein is a poor indicator of

prognosis for canine cutaneous mast cell tumors. **Veterinary Pathology**, v. 37, n. 1, p. 33-39, 2000

GINN, P. E., MENSETT, J. E.K.L.; RUKICH, P. M. The skin and appendages. In: MAXIE, M. G., JUBB, K. (Ed.). **Palmer's Pathology of Domestic animals**. 5. ed. California: Elsevier, v. 1, p. 553-781, 2007.

GRIER, R. L; DI GUARDO, G. MYERS, R, MERKLEY, D. F. Mast cell tumour destruction in dogs by hipotonic solution. **Journal of Small Animal Practice**, V. 36, p. 385-388, 1995.

GLEIXNER, K. V, REBUZZI, L, MAYERHOFER, M., GRUZE, A, HADZIJUSUFOVIC, E, SONNECK, K. VALES, A: KNEIDINGER, M.; SAMORAPOOMPICHIT, P, THAWONG, T., PICKL, W. F., YUZHASIYAN-GURKAN, V, SILLABER, C, WILLMANN, M, VALENT, P. Synergistic antiproliferative effects of KIT tyrosine kinase inhibitors on neoplastic canine mast cells. **Experimental Hematology**, v. 35, n. 10, p. 1510-1521, 2007.

GOH, C.Y; PATMORE, S; SMOLENSKI, A; HOWARD, J; EVANS, S; O'SULLIVANS, J; MCCANN, A. The role of von Willebrand factor in breast cancer metastasis. **Transl Oncol**. V.14, P.101-133, 2021.

GOLDSCHIMIDT, M. H.; HENDRICK, M. J. Tumors of the skin and soft tissues. **Tumors in Domestic animals**. 4. Ed. Iowa: Iowa State Press. P. 105-107, 2002

GOMEZ PERDIGUERO, E. et al. Tissue-resident macrophages originate from yolk-sac-derived erythro-myeloid progenitors. **Nature**, v. 518, n. 7540, p. 547-551, 2014.

GORDON S., TAYLOR P.R. Monocyte and macrophage heterogeneity. **Nat Rev Immunology**, v.5, p. 953-964, 2005

GORDON, S. Phagocytosis: The Legacy of Metchnikoff. **Cell**, 166: 1065–1068, 2016.,

GOVIER, S. M. Principles of treatment for mast cell tumors. **Clinical techniques in Small animal Practice**. V.18. p. 103-106, 2003.

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.

GROSS, T.L; IHRKE, P, WALDER, E 1; AFFOLTER, V. K. (eds) Mast cell tumors. In Skin Diseases of the Dog and Cat. **Clinical and Histopathologic Diagnosis**, 2. ed. Oxford: Blackwell Science Ltd, p. 853-65, 2005.

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

HAHN, K. A., KING, G. K., HARRIS, F. D., et al. The usefulness of hepatic and splenic fine needle aspiration cytology in the clinical staging of canine cutaneous mast cell tumors. An evaluation of 88 dogs (1987–1998). **Proceedings of the Mid-Year Conference of the Veterinary Cancer Society**, p. 23, 2000.

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.

HAHN, K. A.; LEGENDRE, A. M.; SHAW N. G.; PHILIPS, B.; OGILVE, G. K.; PRESCOTT, D. M.; ATWATER, S. W.; CARRERAS, J. K.; LANA, S.E.; LADUE, T.; RUSK, A.; KINET, J. P.; DUBREUIL, P.; MOUSSY, A.; HERMINE, O. Evaluation of 12- and 24-month survival rates after treatment with Masitinib in dogs with nonresectable mast cell tumors, **American Journal of Veterinary Research**, v. 71, p. 1354-1361, 2010.

HAIXIA, Z.; XINHUA, Z.; XUEWEI, C.; YING, L.; ZUNGIIONG, K.; TIAN T, et al. Isoliquiritigenin, a flavonoid from licorice, blocks M2 macrophage polarization in colitis-associated tumorigenesis through down-regulating PGE2 and IL-6. **Toxicol Appl Pharmacol**, V. 279, p.311-321, 2014.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, 144(5), p.646-74, 2011.

HANAHAN, D.; COUSSENS, L. M. Accessories to the crime functions of cells recruited to the tumor microenvironment. **Cancer Cell**. 20 21(3), 309-22, 2012

HAO, N.; LU, M.; FAN, Y.; CAO, Y.; ZHANG, Z.; YANG, S. Macrophages in tumor microenvironments and the progression of tumors. **Clin Development Immunol.**, 2012,

HARRIS, C.; HOLLSTEIN, M. Clinical implications of the p53 tumor suppressor gene. **The New England Journal of Medicine**, v. 329 (18), p.1318- 1327, 1993.

HASHIMOTO, D. et al. Tissue-resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes. **Immunity**, v. 38, n. 4, p. 792-804, 2013.

HASITA H. et al. Significance of alternatively activated macrophages in patients with intrahepatic cholangiocarcinoma. **Cancer Sci**; 101:1913–19, 2010

HSU, M. K.; RAINE, L.; FANGER, H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 29, p. 577-580, 1981.

HUETE, G.C. **Avaliação de macrófagos e eosinófilos associados ao tumor como fatores prognósticos em mastocitomas cutâneos caninos**. 2016. Dissertação (Mestrado

em Biociência Animal) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2016.

HUNTLEY, J. F. Mast cells and basophils: a review of their heterogeneity and function. **Journal of Comparative Pathology**, v 107 p 349-372 1992.

JAFFE, M. H; HOSGOOD, G, TAYLOR HW-di al Immunohistochemical and clinical Evaluation of p53 in canine cutaneous mast cell tumors, **Veterinary Pathology**, v 37 p.40-46.2000

JAIN, N. C. The Basophilis and Mast Cell. In: JAIN, N.C. **Essentials of Veterinary Hematology**, 1 ed. Philadelphia: Lea & Febiger. cap. 15, p.258-365, 1993.

JOSELEVITCH, J.A. et al. Nanog Expression and Proliferation Indices in Canine Cutaneous Mast Cell Tumors. **Veterinary Pathology**, p. 1-4, 2018

JOSEPHS, DH, BAX, J.; KARAGIANNIES, S.N. Tumour-associated macrophage polarisation and re-education with immunotherapy. **Front Biosci**, v.7, p. 334-351, 2015

KIM, J; BAES, JS. Tumor-Associated Macrophages and Neutrophils in Tumor Microenvironment. **Mediators Inflamm.** 2016;2016:6058147. doi: 10.1155/2016/6058147. Epub 2016 Feb 4. PMID: 26966341; PMCID: PMC4757693.

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

KIUPEL, J. D. M., WEBSTER, J. B., KANEENE, J.B, et al. The Use of KIT and Tryptase Expression Patterns as Prognostic Tools for Canine Cutaneous Mast Cell Tumors. **Veterinary Pathology**, p.371-377, 2004.

KIUPEL, J. D. M., WEBSTER, J. B., KANEENE, J.B. Impact of Tumour Depth, Tumour Location and Multiple Synchronous Masses on the Prognosis of Canine Cutaneous Mast Cell Tumours. **J. Vet. Med. Ser.V.** 52, p.280-286, 2005.



KIUPEL, M. et al. Proposal of a 2-Tier Histologic Grading System for Canine Cutaneous Mast Cell Tumors to More Accurately Predict Biological Behavior. **Veterinary Pathology**, v. 48, n. 1, p. 147-155, 2011.

KOMOHARA, Y. et.al. Importance of direct macrophage - Tumor cell interaction on progression of human glioma. **Cancer Science**. v 193, n 12, p. 2165-2172, 2012

KRAUSGRUBER T, BLAZEK K, SMALLIE T, ALZABIN S. LOCKSTONE H, SAHGAL N, et al. IRF5 Promotes Inflammatory macrophage polarization and TH1-TH17 responses. **Nat Immunol**. 12,3:231-8, 2011

KRISHNASWAMY, G., KELLEY, J., JOHNSON, D., YOUNGBERG, G., STONE, W., HUANG, S-K., BIEBER, J. and CHI, D.S. The human mast cell: functions in physiology and disease. **Frontiers in Bioscience**. 1; 6: 1109-27, 2001

KROL M, et.al. Global gene expression profiles of canine macrophages and canine mammary cancer cells grown as a co-culture in vitro. **BMC Veterinary Research** 8: 16. IF 2012 – 1,861; 2012

KUBLER, 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.

LADUE, T., PRICE, G. S.; DODGE, R; PAGE, R. L.; THRALL, D. E. Radiation therapy for incompletely resected canine mast cell tumors. **Veterinary Radiology and Ultrasound**, Raleigh, v. 39, p. 57-62, 1998.

LARSEN, A. E, GRIER, R. L. Evaluation of canine mast cell tumors for presence of estrogen receptors. **American Journal of Veterinary Research**, v. 50(10), p. 1779-1780, 1989.

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.

LEEK R.D, et.al. Association of macrophage infiltration with angiogenesis and prognosis in invasive breast carcinoma. **Cancer Res**, v.56, p. 4625–4629, 1996.

LEHERE, S; RHEINSTEIN, P.H; GREEN, S; ROSENZWEIG, K.E. Von Willebrand Factor Gene Expression in Primary Lower Grade Glioma: Mutually Co-Occurring Mutations in von Willebrand Factor, ATRX, and TP53. **Brain Tumor Res Treat**. V.7, n.1, p. 33-38, 2019.

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.

LEMARIÉ, R. J., LEMARIÉ, S. L., HEDLUND, C. S. Mast cell tumours: Clinical management. **Small Animal Oncology**, v.17, n.9, p.1085-1099, 1995.

LETARD, S.; YAN, Y.; HANSSENS, K.; PALMERINI, F. LEVENTHAL, S. P.; GUERY, S.; MOUSSY, A.; KINET, J; HERMINE, O., DUBREUIL, P. Gain-of-function Mutations in the extracellular domain of KIT are common in canine mast cell tumors. **Molecular Cancer Research: MCR**, Philadelphia, v. 6, n. 7, p. 1137-1145, 2008.

LIPPITZ, B. E.; Cytokine patterns in patients with cancer: a systematic review **Lancet Oncol**. 218- 228,14(6), 2013.

LONDON, C. A.; KISSEBERTH, W. C.; GALLI, S. J.; GEISLER, E. N.; HELFAND, S. C. Expression of stem cell factor receptor (c-kit) by the malignant mast cell from spontaneous canine mast cell tumors. **Journal of Comparative Pathology**, v. 115, n. 4, p. 399-414, 1996.

LONDON, C. GALLI, S J; YUUKI, T., HU, Z., HELFAND, S. C GEISSLER, E. N. Spontaneous canine mast cell tumors express tandem duplications in the proto oncogene c-kit. **Experimental Hematology**, London, v. 27, p. 589-597, 1999.

LONDON, C.A.; MALPAS, B. P.; WOOD-FOLLISS, S.L; BOUCHER, F. J; RUSK, W. A.; ROSENBERG, P. M.; HENRY, J. C.; MITCHENER, K. L; KLEIN, M. K.; HINTERMEISTER, J. G.; BERGMAN, P. J.; COUTO, G. C.; MAUL DIN, G. N.; MICHELS, G. M. 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.

LONDON, C. A., THAMM, D.H. VAIL, D.M. Mast cell tumors. In: WITHROW, S.J.; MACEWEN, E.G **Small Animal Clinical Oncology**, p 335-355 2013.

LONDON, C.A.; SEGUIN, B. Mast cell tumors in the dog. **Vet Clin North Am Small Animal Pract**, v. 33(3): p.473-489, 2003.

LOPES, Y. M. Modalidades terapêuticas empregadas no tratamento do mastocitoma cutâneo canino. Porto Alegre: UFRGS, 2014.

LORUSSO, G.; RUEGG, C. The tumor microenvironment and its contribution to tumor evolution toward metastasis. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 130, n. 6, p. 1091-1103, 2008.

MACY, D. W. Canine mast cell tumors. **Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice**, v. 15, n. 4, p. 783-803, July. 1985

MAHMOUD, S M. LEE, AH, PAISH, E. C MACMILLAN, R. D, ELLIS, LO, GREEN, A. R. Tumour infiltrating macrophages and clinical outcome in breast cancer. **Journal of Clinical Pathology**. London, v. 65, p. 169-163, 2012.

MAIOLINO, P.; CATALDI, M., PACIELLO, O., RESTUCCI, B.; DE VICO, G. Nucleomorphometric analysis of canine cutaneous mast cell tumours. *Journal of Comparative Pathology*, v.133, n. 2-3, p. 209-211, 2005

MANTOVANI, A.; SOZZANI, S.; LOCATI, o M.; ALLAVENA, P.; SICA, A. Macrophage polarization: tumor- associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol*, v.23, p. 549-55, 2002

MANTOVANI, A. et al. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *TRENDS in Immunology* v.25 n.12, p. 677-686, 2004

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

MARSHALL, J. S. Mast-cell responses to pathogens. *Nat Rev. Immunol*, v. 4, p. 787-799, 2004.

MARTINEZI, F.O., GORDON S., The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000 Prime Reports*, 6:13, 2014.

MCCARTHY, E. F. The toxins of William B. Coley and the treatment of bone and soft-tissue sarcomas. *Iowa Orthop*, v 26, p. 154-158,2006

MCCAWE, D. L; MILLER, M. A., OLGILVIE, G. K.; WITHDROW, S. J.; BREWER JUNIOR, W.G.; 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*, V. 8, n. 6. p. 406- 408, 1994.

MEDLEAU, L. Dermatologia de pequenos animais: atlas colorido e guia terapêutico. São Paulo: Roca, p. 353, 2003.

MEIRELLES, A.E.W.B.; OLIVEIRA, E.C.; RODRIGUES, B.A.; COSTA, G.R.; SONNE, L.; TESSER, E.S.; DRIEMEIER, D. Prevalência de neoplasmas cutâneos em cães da região metropolitana de Porto Alegre, RS: 1.017 casos (2002-2007). **Pesqui. Vet. Bras.** V. 30, p. 968-973, 2010.

MELO S.R, et al. Evaluation of collection and distribution of samples for histological, stereological analysis and cell culture of canine mast cell tumors. **Open Journal of Veterinary Medicine**, v.2, p. 216-224, 2012

MELO S.R. Fatores prognósticos em mastocitoma canino: correlação entre parâmetros clínicos, histológicos, marcadores de proliferação e análise termográfica. **Dissertação de Mestrado em ciências** - Faculdade Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade de São Paulo. 95f, 2013

MICHELS, G. M., KNAPP, D. W.; DENICOLA, D. B. et al. Prognosis following surgical excision of canine cutaneous mast cell tumors with histo-pathologically tumor-free versus non tumor-free margins: a retrospective study of 31 cases **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 38(5), p. 458- 466, 2002

MIRA, E.; CARMONA RODRIGUEZ, L.; TARDAGUILA, M.; AZCOITIA, I.; CONZALEZ- MARTIN, A.; ALMONACID L, et al. A lovastatin-elicited genetic program inhibits M2 macrophage polarization and enhances T cells infiltration into spontaneous mouse mammary tumors. **Oncotarget**, v.4, p. 2288- 2301, 2013.

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

MOCHIZUKI, H; MOTSINGER-REIF, A; BETTINI, C; MOROFF, S.; BRERREEN, M. Association of breed and histopathological grade in canine mast cell tumours. **Vet. Comp. Oncol.**, v. 15, p. 829-839, 2016.

MONTEIRO, L.N. et al. Tumor-associated macrophages: relation with progression and invasiveness, and assessment of M1/M2 macrophages in canine mammary tumours. **The Veterinary Journal** 234, 119-125, 2018

MOREIRA, PRR et al., Polarized M2 macrophages in dogs with visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 226, p. 69–73, 2016.

MOSSER, D.M.; EDWARDS, J.P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. **Nat Rev Immunol**, v.8, n.12, p. 958-68, 2008.

MOTA, I. The mast cell revisited. **Braz. Jour. Med. Biol. Res.** 28:895-901, 1995

MOVAHEDI, K.; LAOUI, D.; GYSEMANS, C.; BAETEN, M.; STANGÉ, G.; VAN DEN BOSSCHE, J, et al. Different tumor microenvironments contain functionally distinct subsets of macrophages derived from Ly6C (high) monocytes. **Cancer Res**, v. 70, p. 5728-39, 2010.

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

MURPHY, S.; SPARKES, A. H.; SMITH, K. C.; BLUNDEN, A. S.; BREARLEY, M. J. Relationships between the histological grade of cutaneous mast cell tumours in dogs, their survival and the efficacy of surgical resection. **Veterinary Record**, v. 154, p.743-746, 2004.

MURPHY, S.; SPARKES, A. H.; SMITH, K. C; BLUNDEN, A. S.; BREARLEY, M. J. Effects of stage and number of tumours on prognosis of dogs with cutaneous mast cell tumours. **Veterinary Record**. V. 158, p. 287–291, 2006.

MULLINS, M. N, DERNELL, W. S; WITHROW, S. J, EHRHART, E. J; THAMM, D. H, LANA, S. E. Evaluation of prognostic factors associated with outcome in dogs with multiple cutaneous mast cell tumors treated with surgery with and without adjuvant

treatment 54 cases (1998-2004). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.228, p. 91-95, 2006.

NASIR, L.; RUTTERMAN, G.R., REID, S W.J., SCHULZE, C.H.; ARGYLE, D.J. Analysis of P53 mutational events and mdm2 amplification in canine soft-tissue sarcomas. **Cancer Letters**, v.174, n.1, p. 83-89, 2001.

NGAMBENJAWONG C, GUSTAFSON H.H, PUN SH. Progress in tumor-associated macrophage (TAM)-targeted therapeutics. **Advanced Drug Delivery Reviews** 15, 114: 206-221, 2017

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.

O'CONNELL, K.; THOMSON, M. Evaluation of prognostic indicators in dogs with multiple, simultaneously occurring cutaneous mast cell tumours: 63 cases. **Vet. Comp. Oncol.** V. 11, p. 51-62, 2013.

ONG S.M, TAN Y.C, BERETTA O, JIANG D, YEAP WH, TAI J.J. et al. Macrophages in human colorectal cancer are pro-inflammatory and prime T cells towards an anti-tumour type-1 Inflammatory response. **Eur. J Immunol.** 42,1: 89-100.2012

ONUCHIC A. C., CHAMMAS R. Câncer e o microambiente tumoral. **Rev Med (São Paulo)**. 89:1, p.21-31, 2010.

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.

PALMA, H. E. et al. Mastocitoma cutâneo canino – **Medvep - Revista Científica de Medicina Veterinária - Pequenos Animais e Animais de Estimação**, 7(23); p.523-528, 2009.

PANG, L. Y.; ARGYLE, D. J. Veterinary oncology: Biology, big data and precision medicine. **The Veterinary Journal**, v. 213, p. 38–45, 2016.

PATNAIK, A. K.; EHLER, W. J.; MACEWEN, E. G. Canine Cutaneous Mast Cell Tumor: Morphologic Grading and Survival Time in 83 Dogs. **Veterinary Pathology**, v. 21, p. 469-474, 1984.

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.

PRADO, A. A. F.; LEÃO, D. A.; FERREIRA, A. O.; MACHADO, C.; MARIA, D. A. Mastocitoma em cães: aspectos clínicos, histopatológicos e tratamento. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer, Goiânia, v. 8, n. 14, p. 2151-2167, 2012.

PREZIOSI R., SARLI G., PALTRINIERI M. Multivariate survival analysis of histological parameters and clinical presentation in canine cutaneous mast cell tumours. **Vet. Res. Commun.**, 2007, 31, 287-296, 2007

POLLARD, J.W. Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. **Nat. Rev. Cancer** 4, 71–78, 2004.

PROPHET, E. B.; MILLS, B; ARRINGTON, J. B.; SOBIN L. H. Laboratory methods in histotechnology. Washington: Armed Forces Institute of Pathology, p. 279, 1992

RANDI, A.M, LAFFAN, M.A. Von Willebrand factor and angiogenesis: basic and applied issues. **J Thromb Haemost.** V.15, p.13-20, 2017.

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. et al. Prognostic value of tumour-associated macrophages in canine mammary tumours. **Veterinary and comparative oncology**, v.12, p. 10-19, 2014

REICHRATH, S. et al. Targeting the non-neuronal cholinergic system in macrophages for the management of infectious diseases and cancer: challenge and promise. **Cell death discovery**, v. 2, p. 16063, 2016

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. **Arquivos Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 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, 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.

ROGERS, K. S. Common questions about diagnosing and treating canine mast cell tumors **Veterinary Medicine**, V. 88.n 3. p 246-250,1993.

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

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. **Vet. Pathol.** 44:335-341, 2007.

RECH, R. R. Mastocitomas em condições normais e patológicas com ênfase em mastocitomas de cães. **Dissertação de Mestrado Santa Maria, RS, Brasil.** 2003.

ROSOLEM, M. C., et al. Estudo retrospectivo de exames citológicos realizados em um Hospital Veterinário Escola em um período de cinco anos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 65, 735-741, 2013.

ROY NOY and Jeffrey W. Pollard Tumor-Associated Macrophages: From Mechanisms to Therapy, **Immunity**, V. 41, Issue 5, p. 866, 2014.

SAKAI, H.; NODA, A. SHIRAI N.; IIDAKA T. YANAI. T MASEGI T. Proliferative active of canine mast cell tumors evaluated by bromodeoxyuridine incorporation and KI-67 expression. **Journal of Comparative Pathology**, v. 127. n. 4, p. 233-238. 2002

SCARPA et al. 2014 Cytological grading of canine cutaneous mast cell tumours. **Veterinary and Comparative Oncology**. 1-7, 2014

SCHILTZ, P.M, LIEBER, J, GIORNO, R.C, CLAMAN, H. N. **Immunological immunostaining mediated by non-specific F(ab')<sub>2</sub>-mast cell secretory granule interaction**. Histochemical Journal, v.25, p. 642-647, 1993.

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.

SEGUIN, B; LEIBMAN, N. F.; BREGAZZI, V. S, et al., Clinical outcome of dogs with grade-II mast cell tumors treated with surgery alone. 55 cases (1996-99) **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 218, p. 1120–1123, 2001.

SEGUIN, B; MCDONALD, D. E; KENT, M. S; WALSH, P. J. and TH EON, A. P, Tolerance of cutaneous or mucosal flaps placed into a radiation therapy field in dogs **Veterinary Surgery**, v. 34, p. 214-222, 2005

SHAPOURI-MOGHADDA, A. et al. Macrophage plasticity, polarization, and function in Health and disease. **J. Cell. Physiol.** 233, 6425–6440, 2018.

SICA, A.; MANTOVANI, A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. **Clin Invest**, v.122, p. 787-795, 2012.

SICA, A.; ERRENI, M.; ALLAVENA, P.; PORTA, C. Macrophage polarization in pathology. **Cell Mol Life Sci**, v. 72, 4111-26, 2015.

SIMOES, J.P.; SCHONING, P.; BUTINE, M. Prognosis of canine mast cell tumors: a comparison of three methods. **Vet Pathol**, 31(6): 637-647, 1994

SIMPSON, A. M.; LUDWIG, L.L.; NEWMAN, S. J.; BERGMAN P.J.; HOTTINGER, H.A. and PATNAIK, A.K. Evaluation of surgical margins requerer for complete excision of cutaneous mast cell tumors in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association** v. 224, p. 236-240, 2004.

ŚMIECH, A; ŚLASKA, B; ŁOPUSZYNSKI, W; JASIK, A; BOCHYNSKA, D; DABROWSKI, R. Epidemiological assessment of the risk of canine mast cell tumours based on the Kiupel two-grade malignancy classification. **Acta Vet. Scand.** v. 60, p. 1-9, 2018.

SPUGNINI, E. P; VINCENZI, B. CITRO, G, DOTSINSKY, MUDROV T. BALD A. Evaluation of Cisplatin as an electrochemotherapy agent for the treatment of incompletely excised mast cell tumors in dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine** v. 25, p.407-4011, 2011.

STREFEZZI, R.F. Indicadores prognósticos para mastocitomas: estudo morfométrico 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. et al. Prognostic indicators for mast cell tumors. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, 2(2), p.110 – 121, 2009.

STREFEZZI, D. R. F.; KLEEB, S. R.; XAVIER, J. G.; CATÃO-DIAS, J. L. Avaliação da proliferação celular como indicador prognóstico para mastocitomas cutâneos caninos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 7, p. 559–656, 2010.

STREFEZZI R.F, KLEEB, S.R.; XAVIER, J.G.; FUKUMASU, H.; CATÃO-DIAS, J.L. The Value of Immunohistochemical Expression of BAX in Formulating a Prognosis for Canine Cutaneous Mast Cell Tumours. **Journal of Comparative Pathology**, v. 146, p. 314-319, 2012.

STREFEZZI, R. D. F.; XAVIER, J. G.; CATAO-DIAS, J. L Morphometry of canine cutaneous mast cell tumors. **Veterinary Pathology**, v. 40, p. 268-275, 2003

STREFEZZI, R. F.; KLEEB, S. R. XAVIER. J. G. CATAO-DIAS, J L BAX Immunohistochemical expression in canine cutaneous mast cell tumors. Anais do XIV **ENAPAVE** - Encontro Nacional de Patologia Veterinária, Águas de Lindóia - SP. São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, 2009.

STREFEZZI, R. F; XAVIER, J. G., KLEEB, S. R; CATAO-DIAS, J, L Nuclear morphometry in cytopathology: a prognostic indicator for canine cutaneous mast cell tumors. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, V. 21, n. 6, p. 821-825, 2009.

STREFEZZI, R. F. S. Morfometria nuclear de mastocitomas cutâneos caninos e sua relação com a graduação histopatológica. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental e Comparada) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo 2001,82 p.

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

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

TAKEUCHI, Y.; FUJINO, Y, WATANABE, M.; TAKAHASHI 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 cutaneous mast cell tumors: a retrospective cohort study. **Chemical Journal**, v.196(3), p. 492- 498, 2013.

TAKEYA, M.; KOMOHARA Y. Role of tumor-associated macrophages in human malignancies: friend or foe? **Pathology international**, v.6, p.491-505, 2016.

THAMM, D. H, MAULDIN, E. A., VAIL D.M. Prednisone and vinblastine chemotherapy for canine mast cell tumor 41 cases (1992-97) **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 13, p. 491-497, 1999

THAMM D. H., VAIL D. M. Mast cell tumors In: Withrow, S. J., MacEwen, E.G (eds) **Small Animal Clinical Oncology**. 3 ed. Philadelphia: WB Saunders, p. 261-282, 2001.

THAMM D. H., Miscellaneous tumors: Hemangiosarcoma. In Withrow and MacEwen's **Small Animal Clinical Oncology**, 5th ed.; Withrow, S.J., Vail, D.M., Page, R.L., Eds.; Elsevier Saunders: St. Louis, MI, USA, p. 679-688, 2013.

THAMM, D.H., VAIL D. M. Mast cell tumors in: WITHROW, S.J., VAIL, D. M (eds.) **Small Animal Clinical Oncology** 4.ed. St Louis: Saunders - Elsevier, p.402- 424, 2007.

THOMPSON J.J, et al. Canine subcutaneous mast cell tumor: characterization and prognostic indices. **Veterinary Pathology**, v 48, p.156-168, 2011

TORREZINI, T.; ATHANAZIO D. A. Imunovigilância e Imunoedição de Neoplasias: Implicações Clínicas e Potencial Terapêutico. **Revisão de Literatura. Revista Brasileira de Cancerologia**, 54(1), p.63-77, 2008.

TOZON, N, SERSA, G AND CEMAZAR, M. Electrochemotherapy potentiation of local antitumour effectiveness of cisplatin in dogs and cats. **Anti cancer Research**, v. 21, p. 2483-2488, 2001.

VAIL, D. M. Mast cell tumors. Small animal clinical oncology. 2.ed. Philadelphia: WB Saunders, 589 p. Cap.16, p.192-210, 1996.

VALLEDOR, A.F; RICOTE, M. Nuclear receptor signaling in macrophages. **Biochem Pharmacol**, v.67, p. 201-212, 2004.

VALENT, P., HORNY, H. P. I, CY LONGLEY, B. J MEICALFE, D. D. PARWARESCH, R. M., BENNETT, J. M Mastocytosis. In JAFFE, E S. HARRIS N. L. STEIN, H.; VARDIMAN, J. W. (eds.) World Health Organization classification of tumors: Pathology and genetics of tumors of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon, França: IARC Press.p. 293-302, 2001

VAN FURTH, R. Origin and kinetics of monocytes and macrophages. **Semin Hematol**, v. 7(2), p. 125-141, 1970.

VAN FURTH, R. The mononuclear phagocyte system. **Verh Dtsch Ges Pathol**, v. 64, p.1-11, 1980.

VITALE, I.; MANIC, G.; COUSSENS, L.; KROEMER, G.; GALLUZZI, L. Macrophages and metabolism in the tumor microenvironment. **Cell Metabol**, v.30, p.36-50, 2019.

VOGEL, D. Y et al. Macrophages in inflammatory multiple sclerosis lesion have an intermediate de ativação intermediário. **Journal of Neuroinflammation**, v. 10, n. 1, p.10-35, 2013.

YANG, C., ZHANG, J., DING, M. et al. Ki67 targeted strategies for cancer therapy. **Clin Transl Oncol**. V. 20, p. 570–575, 2018.

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.

XIAO, Y; YU, D. Tumor microenvironment as a therapeutics target in cancer. **Pharmacol. Ther.** doi:10.1016/j.pharmthera.2020.107753 (2021).

WEBSTER, J. D., YUZBASIYAN-GURKAN, V., KANEENE, J. B., et al. The Role of c-KIT in Tumorigenesis: Canine Cutaneous Mast Cell Tumors. **Neoplasia**, V. 8, No. 2, p. 104 – 111, 2006.

WEBSTER, J. D., YUZBASIYAN-GURKAN, V MILLER, R. A. KANEFE, B.; KIUPEL, M. Celular proliferation in canine cutaneous mast cell tumors associations with c-KIT and its role in prognostication. **Veterinary Pathology**, v. 44, n. 3, p. 298- 308, 2007.

WELLE, M.M. et. al. Canine mast cell tumours: a review of the pathogenesis, clinical features, pathology and treatment. **Veterinary Dermatology**, v. 19, n.6, p. 321-339, 2008.

WITHROW, S.J.; VAIL, D.M.; LAGE, R.L. **Small animal clinical Oncology**, 5. Ed. Missouri: Elsevier Saunders, 2013.

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.

WU, H., HAYASHI, T., INOUE, M. Immunohistochemical expression. Of Mom2 and p53 in canine cutaneous mast cell tumours. **Journal of Veterinary Medicine**, San. Diego, v. 53, p. 53-68, 2006.

YAGER, J.A.; SCOTT, D. W. The Skin and appendages. In: JUBB, K.V.F.; KENNEDY, P.C.; PALMER, N.C. (Ed). **Pathology of domestic animals**. 4. Ed. California: Academic Press, v.1, p. 531-738, 1993.

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

ZHANG, X; GONÇALVES, R.: MOSSER, D.M, The Isolation and Characterization of Murine Macrophage. **Current Protocols in immunology**. c.14, u.14.1, 2008.

ZHANG M, He Y, Sun X et al. A High M1/M2 ratio of tumor associated macrophages is associated with extended survival in ovarian cancer patients. **J Ovarian Res**, p.7-19, 2014.

ZHANG, L, et al. Macrophages: friend or foe in idiopathic pulmonary fibrosis? **Respiratory Research**, 19:170, 2018.

ZHONG, X. et al. The Role of Tumor-Associated Macrophages in Colorectal Carcinoma Progression. **Cell Physiol Biochem**, 45, 356-365, 2018.

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.



**ANEXO A – Variações de protocolo utilizado para marcação de macrófagos polarizados em M2, anticorpo anti-CD163 (Abcam®, cód. ab182422)**

<b>Diluição do anticorpo</b>	<b>Recuperação antigênica</b>	<b>Bloqueio de proteínas Inespecíficas</b>	<b>Bloqueio da peroxidase endógena</b>	<b>Tampão de Lavagem</b>
1:50	Citrato pH 6,0; 92 °C panela de pressão; 3 min	Leite molico 5%, 30 minutos	Peroxido de hidrogênio a 3%	TBS pH 9,0
1:100	Citrato pH 6,0; 92 °C panela de pressão; 3 min	Leite molico 5%, 30 minutos	Peroxido de hidrogênio a 3%	TBS pH 9,0
1:100	Citrato pH 6,0; 92 °C panela de pressão; 3 min	Leite molico 5%, 30 minutos	Peroxido de hidrogênio a 5%	TBS pH 9,0
1:100	Citrato pH 6,0; 92 °C panela de pressão; 3 min	Solução de bloqueio Dako (Protein Block Serum-Free Ready-to-use, código: X090930-2)	Peroxido de hidrogênio a 5%	TBS pH 9,0
1:100	Citrato pH 6,0; 92 °C panela de pressão; 3 min	Leite molico 5%, 30 minutos	Peroxido de hidrogênio a 5%	TBS pH 9,0 com Tween 1%
1:100	Citrato pH 6,0; 92 °C panela de pressão; 3 min	Sem bloqueio	Peroxido de hidrogênio a 5%	TBS pH 9,00 Com Tween 1%
1:100	Citrato pH 6,0; 92 °C panela de pressão; 3 min	Sem bloqueio	Peroxido de hidrogênio a 5%	TBS pH 9,0
1:100	Citrato pH 6,0; 95 °C steamer; 20 min	Leite molico 5%, 30 minutos	Peroxido de hidrogênio a 5%	TBS pH 9,0
1:100	TRIS EDTA pH 9,0; 92 °C steamer; 20 min	Leite molico 5%, 30 minutos	Peroxido de hidrogênio a 5%	TBS pH 9,0
1:100	TRIS EDTA pH 9,0; 92 °C panela de pressão; 3 min	Leite molico 5%, 30 minutos	Peroxido de hidrogênio a 5%	TBS pH 9,0
1:100	Citrato pH 6,0; 92 °C panela de pressão; 3 min	Leite molico 5%, 30 minutos	Peroxido de hidrogênio a 5%	PBS pH 7,4 Com Tween 1%
1:100	Citrato pH 6,0; 92 °C panela de pressão; 3 min	Sem bloqueio	Peroxido de hidrogênio a 5%	PBS pH 7,4 Com Tween 1%
1:200	Citrato pH 6,0; 92 °C panela de pressão; 3 min	Leite molico 5%, 30 minutos	Peroxido de hidrogênio a 3%	TBS pH 9,0

**ANEXO B** – Variações de protocolo utilizado para marcação de macrófagos polarizados em M1 para o anticorpo anti-iNOS (Abcam®, cód. ab3523)

<b>Diluição do anticorpo</b>	<b>Recuperação antigênica</b>	<b>Bloqueio de proteínas inespecíficas</b>	<b>Bloqueio da peroxidase endógena</b>	<b>Tampão de lavagem</b>
1:50	Citrato pH 6,0; 92 °C panela de pressão; 3 min	Leite molico 5%, 30 minutos	Peroxido de hidrogênio a 3%	PBS pH 7,4 Com Tween 1%
1:100	Citrato pH 6,0; 92 °C panela de pressão; 3 min	Leite molico 5%, 30 minutos	Peroxido de hidrogênio a 3%	PBS pH 7,4 Com Tween 1%
1:100	Citrato pH 6,0; 92 °C panela de pressão; 3 min	Sem bloqueio	Peroxido de hidrogênio a 3%	PBS pH 7,4 Com Tween 1%
1:100	Citrato pH 6,0; 92 °C panela de pressão; 3 min	Solução de bloqueio Dako (Protein Block Serum-Free Ready-to-use, código: X090930-2)	Peroxido de hidrogênio a 3%	PBS pH 7,4 Com Tween 1%
1:100	Citrato pH 6,0; 92 °C panela de pressão; 3 min	Leite molico 5%, 30 minutos	Peroxido de hidrogênio a 3% com metanol	PBS pH 7,4 Com Tween 1%
1:100	Citrato pH 6,0; 92 °C panela de pressão; 3 min	Leite molico 5%, 30 minutos	Peroxido de hidrogênio a 5% com metanol	PBS pH 7,4 Com Tween 1%
1:100	Citrato pH 6,0; 92 °C panela de pressão; 3 min	Sem bloqueio	Peroxido de hidrogênio a 5% com metanol	PBS pH 7,4 Com Tween 1%
1:100	Citrato pH 6,0; 92 °C panela de pressão; 3 min	Sem bloqueio	Peroxido de hidrogênio a 5% com metanol	PBS pH 7,4 Com Tween 1%
1:100	Citrato pH 6,0; 92 °C panela de pressão; 3 min	Sem bloqueio	Peroxido de hidrogênio a 5% com metanol	PBS pH 7,4 Triton X- 100
1:100	TRIS EDTA pH 9,0; 92 °C panela de pressão; 3 min	Leite molico 5%, 30 minutos	Peroxido de hidrogênio a 3%	PBS pH 7,4 Com Tween 1%
1:100	TRIS EDTA pH 9,0; 92 °C steamer; 20 min	Leite molico 5%, 30 minutos	Peroxido de hidrogênio a 3%	PBS pH 7,4 Com Tween 1%

**ANEXO C** - Diluição do anticorpo, recuperação antigênica, bloqueio de proteínas inespecíficas, bloqueio da peroxidase endógena e tipo de tampão de lavagem do protocolo utilizado para marcação de macrófagos polarizados em M1 para o anticorpo anti-iNOS (Bioss®, cód. bs-2072R)

<b>Diluição do anticorpo</b>	<b>Recuperação antigênica</b>	<b>Bloqueio de proteínas inespecíficas</b>	<b>Bloqueio da peroxidase endógena</b>	<b>Tampão de lavagem</b>
1:100	TrisEDTA pH 9.0, panela de pressão, 3 minutos	Soro de cabra a 10%, diluído em PBS com BSA, 40 minutos.	Peroxido de hidrogênio a 7%, 30 minutos	PBS pH 7,4 Com Tween 1%

**ANEXO D** - Diluição do anticorpo, recuperação antigênica, bloqueio de proteínas inespecíficas, bloqueio da peroxidase endógena e tipo de tampão de lavagem do protocolo utilizado para marcação de macrófagos polarizados em M2 para o anticorpo anti-CD163 (Bioss®, cód. bs-2527R)

<b>Diluição do anticorpo</b>	<b>Recuperação antigênica</b>	<b>Bloqueio de proteínas inespecíficas</b>	<b>Bloqueio da peroxidase endógena</b>	<b>Tampão de lavagem</b>
1:400	Citrato pH 6.0, Steamer, 20 minutos	Solução de bloqueio Dako (Protein Block Serum-Free Ready-to-use, código: X090930-2)	Peroxido de hidrogênio a 9%, 30 minutos	PBS pH 7,4 Com Tween 1%

**ANEXO E** - Diluição do anticorpo, recuperação antigênica, bloqueio da peroxidase endógena e tipo de tampão de lavagem do protocolo utilizado para marcação de vasos sanguíneos para o anticorpo anti- vWF (Dako®, IR527)

<b>Diluição do anticorpo</b>	<b>Recuperação antigênica</b>	<b>Bloqueio de proteínas inespecíficas</b>	<b>Bloqueio da peroxidase endógena</b>	<b>Tampão de lavagem</b>
Anticorpo Dako pronto para uso	Tampão de recuperação Kit Dako High pH, panela de pressão, 2 minutos	Sem bloqueio	Bloqueio Easy Path - Erviegas, 10 minutos	TBS pH 7,4 Com Tween 1%

**ANEXO F** - Variações de protocolo utilizado para bloqueio de mastócito com Poli L-lisina. Anticorpo anti-iNOS (Bioss)

<b>Diluição do anticorpo</b>	<b>Recuperação antigênica</b>	<b>Bloqueio poli l lisina (sigma)</b>	<b>Bloqueio da peroxidase endógena</b>	<b>Tampão de Lavagem</b>
<b>1:150</b>	Citrato pH 6,0; 90 °C panela de pressão; 3 min	30 minutos, temp. ambiente	Peroxido de hidrogênio a 5%	TBS pH 7,6
<b>1:150</b>	Citrato pH 6,0; 90 °C panela de pressão; 3 min	60 minutos, temp. ambiente.	Peroxido de hidrogênio a 5%	TBS pH 7,6
<b>1:150</b>	Citrato pH 6,0; 90 °C panela de pressão; 3 min	90 minutos, temp. ambiente	Peroxido de hidrogênio a 5%	TBS pH 7,6
<b>1:150</b>	TRIS EDTA pH 9,0; 92 °C steamer; 20 min	60 minutos, temp. ambiente	Peroxido de hidrogênio a 5%	TBS pH 9,0
<b>1:150</b>	TRIS EDTA pH 9,0; 92 °C steamer; 20 min	90 minutos, temp. ambiente.	Peroxido de hidrogênio a 5%	TBS pH 7,6
<b>1:150</b>	Citrato pH 6,0; 90 °C panela de pressão; 3 min	60 minutos, temp. ambiente	Peroxido de hidrogênio a 9%	TBS pH 7,6
<b>1:150</b>	Citrato pH 6,0; 90 °C panela de pressão; 3 min	90 minutos, temp. ambiente	Peroxido de hidrogênio a 9%	TBS pH 7,6