

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

LÍGIA FERNANDES GUNDIM

**VALOR PROGNÓSTICO DE MARCADORES IMUNO-HISTOQUÍMICOS E
VARIÁVEIS HISTOMORFOLÓGICAS EM MASTOCITOMAS CUTÂNEOS
CANINOS**

UBERLÂNDIA
2022

LÍGIA FERNANDES GUNDIM

**VALOR PROGNÓSTICO DE MARCADORES IMUNO-HISTOQUÍMICOS E
VARIÁVEIS HISTOMORFOLÓGICAS EM MASTOCITOMAS CUTÂNEOS
CANINOS**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, da Faculdade de Medicina Veterinária, da Universidade Federal de Uberlândia, como exigência parcial para obtenção de título de doutora em Ciências Veterinárias.

Área de Concentração: Saúde Animal

Orientador (a): Prof^ª. Dra. Alessandra Aparecida Medeiros- Ronchi

**UBERLÂNDIA
2022**

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

G975 2022	Gundim, Lígia Fernandes, 1987- VALOR PROGNÓSTICO DE MARCADORES IMUNO-HISTOQUÍMICOS E VARIÁVEIS HISTOMORFOLÓGICAS EM MASTOCITOMAS CUTÂNEOS CANINOS [recurso eletrônico] / Lígia Fernandes Gundim. - 2022. Orientador: Alessandra Aparecida Medeiros-Ronchi. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-graduação em Ciências Veterinárias. Modo de acesso: Internet. Disponível em: http://doi.org/10.14393/ufu.te.2022.123 Inclui bibliografia. 1. Veterinária. I. Medeiros-Ronchi, Alessandra Aparecida, 1971-, (Orient.). II. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Ciências Veterinárias. III. Título. CDU: 619
--------------	---

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:

Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Secretaria da Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências
Veterinárias
BR 050, Km 78, Campus Glória, Uberlândia-MG, CEP 38400-902
Telefone: (34) 2512-6811 - www.ppgcv.famev.ufu.br - mesvet@ufu.br

**ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO**

Programa de Pós-Graduação em:	CIÊNCIAS VETERINÁRIAS				
Defesa de:	TESE DE DOUTORADO Nº PPGCVET/002/2022				
Data:	24 de fevereiro de 2022	Hora de início:	8:10	Hora de encerramento:	12:11
Matrícula do Discente:	11713VET005				
Nome do Discente:	LÍGIA FERNANDES GUNDIM				
Título do Trabalho:	Valor prognóstico de marcadores imuno-histoquímicos e variáveis histomorfológicas em mastocitomas cutâneos caninos				
Área de concentração:	Saúde Animal				
Linha de pesquisa:	Investigação etiológica				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Patologia Oncológica e epidemiologia das neoplasias dos animais domésticos				

Reuniu-se por Videoconferência (meio eletrônico), da Universidade Federal de Uberlândia, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, assim composta: Professores Doutores: **Leandro Zuccolotto Crivellenti - UFU; Matias Pablo Juan Szabó - UFU; Geórgia Modé Magalhães - IF Sul de Minas; Talita Mariana Morata Raposo Ferreira-UNIRP; Alessandra Aparecida Medeiros-Ronchi** orientador(a) do(a) candidato(a).

Iniciando os trabalhos o(a) presidente da mesa, Dra. Alessandra Aparecida Medeiros-Ronchi apresentou a Comissão Examinadora e o candidato(a), agradeceu a presença do público, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(as) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

Aprovado(a).

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Alessandra Aparecida Medeiros Ronchi, Professor(a) do Magistério Superior**, em 24/02/2022, às 12:15, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Leandro Zuccolotto Crivellenti, Membro de Comissão**, em 24/02/2022, às 12:15, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Matias Pablo Juan Szabo, Professor(a) do Magistério Superior**, em 24/02/2022, às 12:17, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Talita Mariana Morata Raposo Ferreira, Usuário Externo**, em 25/02/2022, às 06:19, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Georgia Modé Magalhães, Usuário Externo**, em 25/02/2022, às 15:51, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3392880** e o código CRC **6ED4A07D**.

**VALOR PROGNÓSTICO DE MARCADORES IMUNO-HISTOQUÍMICOS E
VARIÁVEIS HISTOMORFOLÓGICAS EM MASTOCITOMAS CUTÂNEOS
CANINOS**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora no
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da
Universidade Federal de Uberlândia – MG, pela banca
examinadora formada por:

Uberlândia, 24 de fevereiro de 2022.

Prof^a. Dr^a. Alessandra Aparecida Medeiros-Ronchi, UFU/MG

Orientadora

Prof. Dr. Matias Pablo Juan Szabó, UFU/MG

Prof. Dr. Leandro Zuccolotto Crivellenti, UFU/MG

Prof^a. Dr^a. Geórgia Modé Magalhães, IFSULDEMINAS/MG

Prof^a. Dr^a. Talita Mariana Morata Raposo, UNIRP/SP

UBERLÂNDIA

2022

AGRADECIMENTOS

Durante muitos momentos no doutorado me questioneei a respeito da minha fé, hoje, mais do que nunca, sei que foi Deus quem me manteve firme, não me deixando desistir mesmo diante de tantas tribulações. A ele toda honra e toda glória.

Aos meus pais, Célia e Joaquim Odilon, me faltam palavras para agradecer tudo que fizeram e fazem por mim. Desde pequena, vocês me ensinaram que a estrada do conhecimento é sempre o melhor caminho e foi por isso que me apaixonei pelos estudos e pela ciência. Vocês são meu maior exemplo de fé, amor e dedicação. Obrigada por cada palavra de incentivo quando eu não tinha mais forças para continuar, pelo suporte, mesmo que à distância, pelas constantes orações, pelos fins de semana repletos de boa comida, boas conversas e bons abraços. Amo vocês.

À professora Alessandra Aparecida Medeiros-Ronchi, minha orientadora, por compartilhar seu conhecimento comigo. Foram longos anos nessa caminhada, foi o seu entusiasmo em ensinar que me influenciou na escolha da patologia, foi com você que escrevi o primeiro banner, os primeiros artigos, minha dissertação e agora a tese. Obrigada por me apoiar e compreender minha ausência quando precisei assumir várias disciplinas, por me incentivar a participar de congressos e eventos científicos e, principalmente, obrigada por me entender, mesmo não concordando comigo.

Ao meu amigo Igor, a pessoa que mais convivi durante esses anos e com certeza a que mais sentirei falta. Obrigada por me ouvir, mesmo quando era um monólogo, por me alertar que imuno-histoquímica não era fácil, por ser meu confidente, prescritor de fitoterápicos pesados, marido de aluguel, cortador oficial de bloquinhos e companheiro de tours ao centro. Continuarei te visitando mesmo depois do fim do doutorado.

À minha amiga Talita, com toda sua doçura e paciência, por me equilibrar com minha objetividade e realismo. Ter sua companhia nessa etapa final foi essencial, uma vez que compartilhamos das mesmas angústias. Obrigada também pelo auxílio na execução do estudo, pelo contato direto com os tutores e pelas tabelas compartilhadas.

À minha amiga Lígia Assunção, não só pelo auxílio com a grade quadriculada e com a análise de imagens, mas também por todas as trocas sobre as aflições da pandemia e da vida, pelos congressos e pós-congressos e pelas muitas festas mexicanas que renderam muitas histórias e boas risadas.

Aos meus primos e fiéis escudeiros Laura e Misael, pela insistência em me ajudar mesmo quando eu não queria aceitar, pelas viagens e passeios, sempre repletos de muitas risadas, me enchendo de energia para continuar. Obrigada por seccionar núcleos mesmo não sendo da área e não sabendo manusear o Photoshop e por serem meus consultores e corretores das normas da ABNT.

Aos meus alunos Danilo e Leonardo, pelo auxílio no Photoshop com os mais de 10 000 núcleos que não foram utilizados nessa tese, mas com certeza renderão bons frutos no futuro.

Ao Gabriel, por tornar meus dias mais leves, por insistir em me fazer companhia quando eu não queria ver ninguém, por me socorrer com as tabelas e figuras, mesmo eu querendo fazer da forma mais difícil possível e pelo apoio constante na reta final.

À UFU, ao Hospital Veterinário, a todos os funcionários, residentes e laboratórios que possibilitaram a realização deste projeto.

À CAPES e a FAPEMIG pelo auxílio financeiro.

RESUMO

O mastocitoma é dos tumores cutâneos mais comuns em cães e caracteriza-se pela proliferação de mastócitos neoplásicos, normalmente em derme e epiderme. Seu comportamento é variável, dificultando o estabelecimento do tratamento e tornando imprescindível a investigação de fatores prognóstico que possam auxiliar na previsão do comportamento destes tumores. Objetivou-se avaliar: alterações histomorfológicas em mastocitomas caninos, a expressão imuno-histoquímica de c-KIT e Ki-67, a marcação para AgNOR, a correlação entre estas variáveis e sua influência na evolução clínica de cães com mastocitoma, assim como características epidemiológicas e clínicas do tumor e sua relação com a morte do animal. Observou-se relação entre arquitetura e grau segundo Kiupel ($p=2,907 \times 10^{-6}$), mitose e grau segundo Patnaik ($p=0,003$). Animais SRD apresentaram mais neoplasias grau II ($p=0,045$), e a morte dos animais esteve relacionada com ulceração do tumor ($p=0,006$) e idade do animal ($p=0,001$). Houve associação entre quantidade de eosinófilos e extensão tumoral ($p=0,221$) e arquitetura ($0,338$); arquitetura e quantidade de mitoses ($0,339$); hemorragia e graduação segundo Patnaik ($p=0,190$). Já no teste de log-rank, arquitetura ($p=0,006$), número de mitoses ($p=0,000$), graduação de Patnaik ($p=0,045$) e graduação de Kiupel ($p<0,01$), contagem de AgNORs ($p=0,39$), Ki67 ($p=0,03$), índice Ag67 ($p=0,06$) e padrão KIT ($p=0,17$), influenciaram na sobrevida dos animais. Concluiu-se que ulceração do tumor, arquitetura, número de mitoses, graduação histológica, Ki67, índice Ag67 e padrão KIT podem ser utilizadas como fatores prognósticos de mastocitomas em cães.

Palavras- chave: cão. histopatologia. mastócitos. neoplasia.

ABSTRACT

Mast cell tumors are one of the most common tumors in dogs. Due to the variable behavior of this neoplasm, the investigation of prognostic factors that can help in predicting the behavior of these tumors is essential. The objective was to evaluate: histomorphological alterations in canine mast cell tumors, the immunohistochemical expression of c-KIT and Ki-67, the expression of AgNOR, the correlation between these variables and their influence on the clinical evolution of dogs with mast cell tumors, as well as epidemiological characteristics and clinics of the tumor and its relationship with the death of the animal. In the chi-square test, there was a relationship between architecture and degree according to Kiupel ($p=2.907 \times 10^{-6}$), mitosis and degree according to Patnaik ($p=0.003$). SRD animals had more grade II neoplasms ($p=0.045$), and animal death was related to tumor ulceration ($p=0.006$) and animal age ($p=0.001$). In the correlation matrix, there was an association between the number of eosinophils and tumor extension ($p=0.221$) and architecture ($p=0.338$); architecture and number of mitoses ($p=0.339$); bleeding and grading according to Patnaik ($p=0.190$). In the log-rank test, architecture ($p=0.006$), number of mitoses ($p=0.000$), Patnaik grading ($p=0.045$) and Kiupel grading ($p=0.000$), AgNORs count ($p=0.39$), Ki67 ($p=0.03$), Ag67 index ($p=0.06$) and KIT pattern ($p=0.17$), influenced the survival of the animals. It was concluded that tumor ulceration, architecture, number of mitoses, histological grading, Ki67, Ag67 index and KIT pattern can be used as prognostic factors for mast cell tumors in dogs.

Keywords: dog. histopathology. mast cells. neoplasm.

SUMÁRIO

1. Introdução.....	12
2. Revisão de literatura.....	14
2.1 Mastócitos.. ..	14
2.2 Mastocitoma cutâneo canino.. ..	15
2.2.1 Epidemiologia.....	15
2.2.2 Etiologia.....	16
2.2.3 Diagnóstico	17
2.3 Fatores de prognóstico.....	20
2.3.1 Graduação.....	20
2.3.2 Margens cirúrgicas.....	22
2.3.3 Marcadores de proliferação.....	23
2.3.4 Estadiamento clínico.....	26
2.3.5 Localização.....	28
2.3.6 Angiogênese tumoral.....	29
2.3.7 C-kit.....	29
2.3.8 Alterações histomorfológicas.....	30
3. Referências.....	32
4. Capítulo 2. Artigo: Validation of the prognostic value of histomorphological variables in canine cutaneous mast cell tumour	49
5. Capítulo 3. Artigo: Tamanho e localização tumorais, grau histológico, agnor e expressão de c-kit e ki67 como ferramentas para determinação do prognóstico em mastocitomas cutâneos caninos.....	66

CAPÍTULO 1 – Considerações gerais

1. INTRODUÇÃO

O mastocitoma (MCT) é uma das doenças neoplásicas mais comuns em cães, sendo responsável por 20% de todos os tumores de pele (KIUPEL; CAMUS, 2019; BERLATO et al., 2021; GRAF et al., 2018).

O MCT apresenta comportamento biológico variável e imprevisível, apresentando-se como massas localizadas, que podem ser excisadas cirurgicamente com sucesso, ou como tumores metastáticos muitas vezes fatais (KIUPEL et al., 2011; SABATTINI et al., 2015, BROCKS et al., 2021).

A determinação do protocolo terapêutico é baseada, na maioria das vezes, na apresentação clínica e presença de fatores prognósticos (MELO et al., 2021) e, apesar dos avanços em oncologia, ainda hoje o grau histológico é o elemento essencial para determinar o prognóstico de MCTs cutâneos caninos (PATNAIK; EHLER; MACEWEN, 1984; KIUPEL et al., 2011; BERLATO et al., 2021). Porém, a determinação do grau histológico apresenta como limitações a subjetividade de sua aplicação por diferentes patologistas, o que leva à discordância principalmente para MCTs de grau I e II (KIUPEL et al., 2011, VASCELLARI et al., 2013). A subjetividade pode estar associada a falta de diretrizes para atribuição de grau em um MCT onde coexistam características histológicas típicas de diferentes graus (BERLATO et al., 2021).

Apesar do grau histológico ser amplamente utilizado como fator prognóstico, isoladamente nenhum parâmetro pode com precisão prever o comportamento biológico dos MCTs em cães (CASANOVA et al., 2021). Vários métodos para determinação do comportamento dos MCTs têm sido estudados para melhorar o prognóstico, incluindo grau citológico (SCARPA; SABATTINI; BETTINI, 2014; CAMUS et al., 2016), padrão de expressão da proteína KIT (KIUPEL et al., 2004), detecção de mutações da proteína tirosina-quinase (c-KIT) (WEBSTER et al., 2006, TAKEUCHI et al., 2013), marcadores de proliferação (WEBSTER et al., 2006, VASCELLARI et al., 2012), avaliação de margem (S'EGUIN et al., 2001; FULCHER et al., 2006; SCARPA; SABATTINI; BETTINI, 2014), localização do tumor (THOMPSON et al., 2011; KIUPEL et al., 2005), atividade mitótica (ROMANSIK et al., 2007, ELSTON et al., 2009), morfometria nuclear (STREFEZZI; XAVIER; CATÃO-DIAS, 2003, MARCONATO et al., 2008), densidade vascular (PREZIOSI; SARLI; PALTRINIERI, 2004) e, mais recentemente, medidas estereológicas de tamanho nuclear (CASANOVA et al., 2021).

Porém, mesmo com diversos fatores de prognóstico identificados para o MCT, a tomada de decisão quanto às medidas terapêuticas para o paciente permanece desafiadora para o profissional de pequenos animais (WARLAND et al., 2015). Assim, a complementação da graduação histológica com ferramentas para diagnóstico que sejam acessíveis financeiramente

e gerem resultados objetivos é recomendada. Com ferramentas combinadas, há uma maior probabilidade de identificar MCT de comportamento agressivo e de se estabelecer o melhor plano de tratamento (SLEDGE; WEBSTER; KIUPEL, 2016).

O diagnóstico citológico (CAMUS et al., 2016) e o sistema de classificação histológica de Kiupel et al. (2011), apesar de apresentarem baixo custo, possuem como limitação não levar em consideração o padrão de crescimento ou extensão do MCT (infiltrativo ou não). Não se sabe se a falta de avaliação do padrão de crescimento pode levar à subestimação da agressividade local do tumor em alguns casos (BERLATO et al., 2021). Consequentemente, o estudo de variáveis histomorfológicas que possam auxiliar na determinação do prognóstico é necessário, principalmente porque estas podem ser obtidas a partir de lâminas coradas com hematoxilina-eosina utilizadas rotineiramente para diagnóstico histopatológico, evitando outras técnicas de alto custo e complexidade.

Tendo em vista o exposto, o presente estudo tem como objetivos:

- realizar estudo retrospectivo dos casos de mastocitoma cutâneo canino, atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia (HOVET-UFU);
- avaliar dados epidemiológicos (raça, idade e sexo) de cães portadores de MCTs;
- graduar histologicamente os MCTs segundo Patnaik, Ehler e Macewen (1984) e Kiupel et al. (2011);
- avaliar alterações histomorfológicas em MCTs;
- avaliar a expressão imunohistoquímica de c-KIT e Ki-67 nestes tumores;
- avaliar a expressão do marcador de proliferação celular AgNOR;
- determinar o valor prognóstico das variáveis: tamanho e localização dos MCT, grau histológico, alterações histomorfológicas, expressão imunohistoquímica de c-KIT e Ki-67 e expressão do marcador de proliferação celular AgNOR, correlacionando-as com a sobrevida dos cães portadores de MCT.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Mastócitos

Os mastócitos são células derivadas de células tronco hematopoiéticas que circulam no sangue na forma imatura e atingem sua forma madura nos tecidos por influência de fatores de crescimento locais (FCT e IL-3). São encontrados principalmente em pele e mucosas (WERNERSSON e PEJLER, 2014).

São células ovais medindo de 20 a 30 micrômetros com grânulos basofílicos no citoplasma (PINHEIRO, 2007), todavia estes grânulos não se coram devidamente à coloração rotineira de Hematoxilina e eosina, sendo necessária coloração especial de Azul de Toluidina (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1990).

A primeira descrição de mastócitos foi realizada por Paul Erlich no século XVIII, que presença de grânulos estaria relacionada à nutrição celular (ERLICH, 1878). Os mastócitos desempenham um papel importante nos mecanismos de defesa do organismo, principalmente a inflamação, sendo que cada mastócito contém grânulos que, quando liberados, eliminam enzimas proteolíticas, histamina, heparina e fator quimiotático eosinofílico (MISDORP, 2004).

Em geral, os mastócitos se encontram próximos de locais onde o corpo entra em contato com o ambiente externo, que é um local privilegiado para a iniciação e modulação das respostas imunes inatas. Nestes locais, os mastócitos podem tanto recrutar neutrófilos para o local da infecção, quanto iniciar e modular a inflamação associada à resposta imune inata, além de limitar a toxicidade de certos produtos gerados pelo hospedeiro (KALESNIKOFF e Galli, 2008).

Além disso, há relatos de atuação de mastócitos na degradação do fator de necrose tumoral (FNT); na fibrose renal, degradando a fibronectina e formando angiotensina II e na infecção parasitária por *Trichinella spiralis* realizando a expulsão do parasita e recrutamento de eosinófilos (WERNERSON e PEJLER, 2014). Apesar de os mastócitos serem constantemente considerados como problemáticos, devido à sua função proeminente como células efectoras em reações de hipersensibilidade alérgica dependente de IgE, as proteases dos mastócitos parecem ter funções benéficas durante os distúrbios alérgicos, a exemplo da triptase β , uma protease que pode clivar IgE.

Em humanos, as doenças que envolvem diretamente mastócitos são: mastocitose cutânea e sistêmica, leucemia de mastócitos e sarcoma de mastócitos, sendo estas incomuns (WEILER e BUTTERFIELD, 2014). Já em animais, a neoplasia de mastócitos é conhecida

como mastocitoma e é um dos tumores cutâneos mais comuns em cães, correspondendo a 15,30% das neoplasias de pele na cidade de Uberlândia (FERNANDES et al., 2015).

2.2 Mastocitoma cutâneo canino

Mastocitoma é caracterizado pela proliferação neoplásica de mastócitos, que pode ocorrer em qualquer parte do corpo e usualmente é cutânea ou subcutânea (BLACKWOOD et al., 2012). São classificados como tumores de células redondas, assim como melanomas, linfomas, histiocitomas, plasmocitomas e tumores venéreos transmissíveis. Estes tumores recebem esta classificação apenas por sua morfologia, não abrangendo sua origem (NICOLA, 2009).

2.2.1 Epidemiologia

A influência do sexo na ocorrência do mastocitoma é bastante discutida. Embora alguns autores não relatem predisposição sexual (PIERENI et al., 2019; COSTA et al., 2017), outros estudos verificaram que a maioria dos cães acometidos por mastocitoma eram fêmeas (SOUZA et al., 2018), ou ainda, que a maior ocorrência se dava em fêmeas castradas (GRAF et al., 2018). Já Smiech et al. (2018) descreveram que as fêmeas apresentam maior risco de desenvolver tumores de baixo grau.

As diferenças na apresentação clínica de MCT entre cães de raças predispostas sugerem um fundo genético no desenvolvimento de MCT (ŚMIECH et al., 2019). As raças modernas de cães foram criadas através de seleção de características fenotípicas específicas e práticas de endogamia e uso de reprodutores populares reduzem a variação genética, o que resulta no desenvolvimento de várias doenças hereditárias, incluindo neoplasia (ŚMIECH et al., 2019).

As raças mais acometidas pelo MCT são Boxer, Labrador, Golden Retriever (WARLAND e DOBSON, 2013; PIERINI, et al., 2019), Bull terriers e Staffordshire Bullterrier (WARLAND e DOBSON, 2013). Na Polônia, Śmiech et al. (2018) relataram as raças Boxer e Labrador como as mais acometidas e as raças Shar Pei e Weimaraner como aquelas com mais chances de desenvolver tumores de alto grau. Estes mesmos autores indicaram ainda as raças Boxer, Labrador Retriever, American Staffordshire Terrier, Golden Retriever, Buldogue Francês, Dachshund e Shar-Pei como as mais acometidas em estudo conduzido em 2019 (ŚMIECH et al., 2019). Diversos estudos indicam a raça Shar Pei como susceptível, como Reynolds et al. (2019) que verificaram que cães desta raça têm mais chance de desenvolver mastocitomas de alto grau e Miller (1995) que descreveu a alta incidência de MCTs em Shar

Peis com menos de dois anos de idade. Por outro lado, estudos realizados no Brasil revelam que a maioria dos animais com mastocitomas são sem raça definida (HORTA et al., 2018; KLUTHCOVSKY et al., 2020)

Mc Niel et al. (2006) observaram um aumento significativo na frequência de MCTs em Pugs em comparação com outros cães. White et al. (2011) também descreveram a raça Pug com mais chances de desenvolver mastocitoma, além das raças Boxer, Labrador e Golden Retriever.

Quanto à idade, cães de meia idade são mais acometidos (THAMM e VAIL, 2008). Cães com mais de dez anos apresentam 41,3 vezes mais chances de desenvolver mastocitomas que aqueles com menos de 2 anos de idade (SHOOP et al., 2015) e o risco de ocorrência de tumores de alto grau é maior em cães com idade entre 11 e 16 anos (ŚMIECH et al., 2019)

2.2.2 Etiologia

A etiologia do mastocitoma ainda não está bem elucidada. Lester et al. (1981) sugeriram uma possível associação entre infecções virais e a ocorrência da neoplasia. Entretanto, Madewell et al. (1984) analisando a ultraestrutura de mastocitomas em diversas espécies não encontraram partículas semelhantes a vírus. Vail and Withrow (1996) sugeriram ainda que inflamação crônica poderia induzir a ocorrência de mastocitoma.

Wakshlag et al. (2011) observaram que cães da raça Labrador com mastocitoma apresentam concentração sérica de vitamina D menor que animais não acometidos pela neoplasia, sugerindo que os níveis baixos desta vitamina podem ser um fator de risco para desenvolvimento de MCT. Semelhantemente, Russel et al. (2010) avaliaram a presença de receptor de vitamina D em mastócitos normais e neoplásicos e observaram maior imunomarcagem em tumores grau 3, podendo assim ser útil para identificar pacientes para ensaios terapêuticos de vitamina D.

O proto-oncogene c-KIT está envolvido na patogênese do mastocitoma. Zemke et al. (2002) demonstraram duplicações e deleções no domínio justamembrana do gene c-KIT e observaram associação significativa entre a presença de uma mutação e ocorrência de tumor de alto grau. Webster et al. (2006) demonstraram que o aumento da expressão de c-KIT apresenta associação com recidiva da doença e morte. Do mesmo modo, Kiupel et al. (2016) demonstraram que mutações no c-KIT desempenham um papel central na oncogênese de aproximadamente 20 a 30% dos caninos.

Anormalidades citogenéticas tem sido exploradas na tentativa de elucidar a etiologia dos mastocitomas. Jark et al. (2017) analisaram o DNA genômico em mastócitos de MCT utilizando hibridização genômica comparativa de matriz e observaram média de 55 variações

do número de cópias genômicas, incluindo ganho e deleções, principalmente nos cromossomos 6 e 11. Vozdoka et al. (2018), utilizando hibridização *in situ* fluorescente, notaram ganho clonal do cromossomo 11 em 81% dos mastocitomas, entretanto sugerem a realização de mais estudos para avaliar a relação desta mutação com prognóstico, sobrevida e recorrência dos mastocitomas.

2.2.3 Diagnóstico

Diagnóstico citológico

Coletto et al. (2016) relataram que o diagnóstico citológico apresenta 77% de sensibilidade no diagnóstico de neoplasias. No caso dos mastocitomas cutâneos caninos, o diagnóstico citológico é um exame de triagem que permite um diagnóstico minimamente invasivo, no qual as amostras são coletadas por aspiração por agulha fina (DENICOLA, 2009). Este exame é fundamental para o planejamento cirúrgico, uma vez que os mastocitomas apresentam alta propensão a sangramentos, devido à presença de heparina e histamina nos grânulos dos mastócitos, e a biópsia incisional não é recomendada nesses tumores (WELLMAN e LONDON 2020).

Segundo Jackson et al. (2012), nas lâminas citológicas de mastocitoma são observadas células redondas com grânulos no citoplasma. DeNicola (2009) descreve que os núcleos dos mastocitomas são redondos a ovais, por vezes encobertos pela grande quantidade de grânulos. Todavia, alerta para o fato de que, caso seja utilizada o corante Diff-Quik, um dos mais utilizados na rotina clínica, os grânulos dos mastócitos podem não se corar, dificultando o diagnóstico.

Além da presença de mastócitos, eosinófilos podem ser visualizados de entremeio e não possuem relação com o comportamento biológico dos tumores. Jackson et al. (2012) sugerem que caso não forem observados grânulos, mas houver presença de eosinófilos, pode-se suspeitar de mastocitoma. Além de mastócitos e eosinófilos, o exame citológico pode apresentar ainda grande quantidade de fibroblastos, devido à fibroplasia, podendo levar à um diagnóstico errôneo de neoplasia mesenquimal associada à infiltração de mastócitos (DENICOLA, 2009).

Outro diagnóstico diferencial que deve ser considerado quando são observados mastócitos e eosinófilos na citologia é a dirofilariose. Mazaki-Tovi et al. (2016) descrevem quatro casos de dirofilariose por *Dirofilaria repens* na pele de cães em que os achados citológicos eram muito semelhantes aos de mastocitoma, com presença de grande quantidade

de mastócitos e eosinófilos, e alertam para a inclusão desta infecção como diagnóstico diferencial em áreas endêmicas.

A citologia tem como limitação a impossibilidade de análise da arquitetura tumoral, um dos parâmetros utilizados na graduação histológica. Não obstante, Scarpa, Sabattini e Bettini (2014) propuseram um sistema de classificação dos mastocitomas na citologia, utilizando os mesmos parâmetros propostos por Kiupel (ocorrência de mitose, células multinucleadas, núcleos bizarros, cariomegalia e células binucleadas). Foram analisados 50 casos no período pré-cirúrgico e os resultados comparados à graduação histológica no pós-cirúrgico, obtendo 84,6% de sensibilidade e 97,3% de especificidade.

De modo semelhante, Camus et al. (2016) sugeriram um método para avaliação citológica, sendo que o tumor que apresentasse pouca quantidade de grânulos e presença de duas ou mais das demais características (pleomorfismo nuclear, fibrilas de colágeno, figuras de mitose, binucleação, multinucleação e anisocariose) atribuíam-se alto grau e aos demais, baixo grau. Todavia a análise é limitada por não ser possível visualizar a localização do tumor, bem como sua arquitetura tecidual, sendo para isso necessária a realização de exame histopatológico.

Shaw et al. (2018) compararam a graduação de biópsias pré-cirúrgicas realizadas por meio de punch, biópsia incisional e biópsia por agulha fina com o resultado do exame histopatológico da biópsia excisional e descreveram 100% de precisão na punção por agulha fina. Entretanto, os autores chamam atenção para o fato de que a presença de grande quantidade de grânulos na amostra pode dificultar a visualização de detalhes nucleares, dificultando o estabelecimento do grau e subestimando o mesmo.

Strefezzi et al. (2009) no intuito de reduzir a subjetividade e aumentar a reprodutibilidade da análise citológica, propuseram uma análise computadorizada da morfometria nuclear dos esfregaços de mastocitoma e concluíram que esta análise pode prever o comportamento biológico dos MCTs de forma independente. Barbosa et al. (2014) relataram que a análise morfométrica nuclear de mastócitos por meio de esfregaços citológicos é um método reproduzível para graduar os mastocitomas.

Marcos et al. (2021) propuseram a análise morfológica e estereológica da área nuclear e verificaram que através da verificação da área nuclear dos mastócitos na citologia é possível diferenciar neoplasias de grau III de neoplasias de grau I e II, indicando que estas técnicas complementares podem ser úteis na avaliação citológica de mastocitomas cutâneos caninos.

Kiupel e Camus (2019) afirmaram que a graduação citológica auxilia na tomada de decisão inicial, porém a graduação histológica em 2 graus, proposta por Kiupel et al. (2011) ainda é a melhor forma de identificar neoplasias de alto grau.

Diagnóstico histológico

A maioria dos tumores são cutâneos, ou seja, se localizam na derme ou epiderme, mas podem ser subcutâneos, quando se apresentam abaixo dessas localizações. Microscopicamente, as células são redondas a poligonais, com núcleos redondos centrais a levemente excêntricos. Apresentam citoplasma moderado, rosa pálido, contendo grânulos azuis a acinzentados na coloração de hematoxilina e eosina (HE). Observa-se ainda grande quantidade de eosinófilos de entremeio (KIUPEL, 2016).

Por vezes, os grânulos não estão evidentes na coloração de rotina (HE) e faz-se necessária a realização de coloração Azul de Toluidina. Essa técnica evidencia os grânulos, que apresentam coloração metacromática, facilitando assim o diagnóstico em neoplasias pouco diferenciadas (LUNA, 1992)

Na análise histológica, os tumores são classificados em graus, sendo que duas classificações são utilizadas atualmente. O método de Patnaik, Ehler e MacEwen (1984) é o mais tradicional e distribui os tumores em 3 graus: grau I tumores com lesões de baixa celularidade, contidos na derme com mastócitos bem diferenciados com grânulos evidentes e dispostos em fila; grau II no caso de os mastócitos serem moderadamente diferenciados com grânulos menos evidentes, infiltrados na derme e subcutâneo e houver mitoses e células binucleadas; grau III, no qual encontra-se células pouco diferenciadas, exibindo elevado pleomorfismo, escassos grânulos, índice mitótico de médio a alto (PATNAIK, EHLER E MACEWEN, 1984). A subjetividade deste método é uma de suas desvantagens, uma vez que há grande discordância entre observadores. Outro inconveniente é que a maioria dos tumores recebem grau II, o que dificulta a avaliação prognóstica (STEFANELLO et al., 2015).

Por este motivo, Kiupel, et al. (2011) indicaram uma nova classificação em apenas dois graus, baseado no número de mitoses e características celulares, como presença de células multinucleadas e núcleos bizarros. Esta classificação considera como alto grau os tumores que apresentam pelo menos uma das seguintes características: mínimo de sete figuras de mitose em 10 campos de maior aumento, mínimo 3 células multinucleadas e ao menos 3 núcleos bizarros. Os mastocitomas que não apresentarem pelo menos uma destas características são considerados de baixo grau.

Uma vez que o método de Kiupel diminui a subjetividade da avaliação, observa-se uma tendência ao aumento de concordância entre examinadores. Vascellari et al. (2013) compararam o diagnóstico de três patologistas na classificação de Patnaik e notaram concordância de 100% nos tumores com grau 3, 70% nos tumores diagnosticados com grau 2 e 75% as neoplasias com

grau 1, enquanto na classificação de Kiupel a concordância foi de 100% tanto nos tumores de alto grau quanto nos de baixo grau. Não obstante, Berlato et al. (2021) ressaltaram que uma limitação do sistema de classificação proposto por Kiupel é não levar em consideração o padrão de crescimento ou extensão do MCT, podendo ocasionar a subestimação da agressividade local do tumor em alguns casos.

Para avaliar se havia correlação entre os sistemas de Patnaik e Kiupel, Horta et al. (2018) avaliaram 149 neoplasias e descreveram que todos os tumores grau 1 foram classificados em baixo grau e todos os tumores grau 3 foram classificados em alto grau, todavia aproximadamente metade dos tumores de grau 2 apresentam alto grau e estes apresentaram maior taxa de mortalidade relacionada ao tumor quando comparados aos tumores de grau 2 baixo grau. De semelhante modo, Vascellari et al. (2013) e Sabbatini et al. (2015) também relataram que a classificação em dois graus foi capaz de prever o comportamento negativo de mastocitomas que receberam grau II na classificação de Patnaik.

2.3 Fatores de Prognóstico

Tendo em vista a prevalência, o comportamento biológico variável dos MCTs e o custo de uma resposta terapêutica variável, torna-se imprescindível prognosticar com precisão os mastocitomas (SLEDGE et al., 2016). Fatores como graduação histopatológica (SLEDGE et al., 2016), localização (REYNOLDS et al., 2019; SMIECH et al., 2018), raça (PIERINI et al., 2019), estadió clínico (OMS) (WELLE et al., 2008), taxa de proliferação celular (índice mitótico) (ROMANSIK et al., 2007), profundidade de invasão do tecido subcutâneo (THOMPSON et al., 2010), número de nódulos tumorais (único ou múltiplo) (FURLANI et al., 2008) e marcadores de proliferação celular, incluindo regiões organizadoras nucleolares argirofílicas (AgNORs) (BOSTOCK et al., 1989; SCASE et al., 2006), antígeno de células nucleares em proliferação (PCNA) e Ki67 (BERLATO et al., 2015) têm sido utilizados na tentativa de prever o comportamento destes tumores.

2.3.1 Graduação

2.3.1.1 Graduação histológica

Até o momento, juntamente com o estadió clínico, o grau histológico é considerado um fator prognóstico altamente relevante. Animais com tumores de maior grau de indiferenciação (grau III) possuem menor sobrevida (PATNAIK; EHLER; MACEWEN, 1984), todavia, ao longo do tempo, notou-se grande divergência entre os observadores quanto aos graus. Sabbatini et al. (2015) compararam as duas classificações propostas quanto ao grau e a sobrevida,

afirmando que o método de Kiupel et al. (2011) gera menos divergências entre os observadores e também é capaz de prever melhor o prognóstico de pacientes com tumores com grau II de Patnaik. Em estudo realizado no Brasil, Horta et al. (2018) afirmam que os animais com tumores com alto grau de Kiupel apresentaram risco intermediário de morte, independente do grau de Patnaik, reforçando a classificação de Kiupel como melhor ferramenta prognóstica.

Berlato et al. (2018) descreveram um acréscimo no risco de morte por mastocitoma à medida que o grau histológico é maior. Cães com mastocitoma grau II morrem 5,1 vezes (risco relativo - *hazard ratio* 5,1) mais que a população canina sem mastocitoma e aqueles com tumores grau III morrem 45,6 vezes mais.

Fejös et al. (2021) analisaram vários fatores prognósticos e afirmaram que animais com tumores grau 3 de Patnaik e Kiupel de alto grau apresentavam mais frequentemente metástase à distância no estadiamento. Por outro lado, Pizzoni et al. (2017) não observaram associação entre metástase e graduação, uma vez que 51% dos animais com metástase tiveram as neoplasias classificadas em grau 1 ou 2 e 36% em baixo grau. Além disso, Hume et al. (2011) afirmam que cães com tumores de grau III morrem mais frequentemente como consequência de sua doença locorregional e dos efeitos colaterais clínicos associados e não das consequências das metástases à distância.

Recentemente, o consenso realizado pelo Oncology Pathology Working Group (Berlato et al., 2021) e De Nardi et al. (2022) recomendaram a utilização síncrona das duas graduações histológicas (Patnaik e Kiupel), além de associação com outros fatores prognóstico, tais como idade, progressão clínica, tamanho, marcadores de proliferação, uma vez que alguns tumores com grau I e baixo grau ainda podem apresentar comportamento clínico agressivo, independente da classificação utilizada.

2.3.1.1 Graduação citológica

Estudos têm sido desenvolvidos no sentido de padronizar uma graduação citológica capaz de auxiliar na avaliação prognóstica e contribuir para tomada de decisão clínica. Camus et al. (2016) observaram que os animais com mastocitomas de baixo grau na citologia apresentavam maior sobrevida (média de 562 dias), comparado aos que receberam alto grau (média de 364,6 dias).

Kiupel e Camus (2019) alertam que os tumores com menos grânulos apresentam pior prognóstico, no entanto, algumas colorações rápidas utilizadas na citologia dificultam a visualização dos grânulos.

De semelhante modo, Berlato et al. (2021) afirmaram que o sistema proposto por Camus fornece informações pré-operatórias valiosas, uma vez que as neoplasias classificadas como baixo grau na citologia apresentam boa correlação com a graduação histológica e o comportamento clínico, entretanto, deve-se ter cautela com os diagnósticos de alto grau na citologia, pois podem ocorrer casos falso positivos.

2.3.2 Margens cirúrgicas

Com respeito às margens cirúrgicas dos mastocitomas, tradicionalmente recomenda-se 3 cm de margens tanto laterais quanto profundas (SIMPSON et al., 2004; SCHULTHEISS et al., 2011). todavia na avaliação histopatológica muitas vezes ainda observa-se margens comprometidas. Este fato pode ocorrer devido à retração do tecido ao formol e a retirada de tecido para melhor acomodação no cassete. Risselada et al. (2015) afirmam que as margens histológicas retraem 35 a 42% em relação às margens cirúrgicas.

Na maioria das neoplasias, observa-se inflamação peritumoral, sendo que uma outra dificuldade observada na avaliação histopatológica de margens é a diferenciação entre mastócitos neoplásicos e mastócitos normais. Kiupel (2017) recomenda que um grupo de três ou mais mastócitos seja considerado neoplásico, no entanto Camus e Kiupel (2019) consideram essa classificação arbitrária.

Estudos recentes questionam a necessidade de retirada de uma margem tão ampla, uma vez que margens cirúrgicas menores podem influenciar positivamente a morbidade do paciente, a satisfação do proprietário e a redução do ônus financeiro (SELMIC e RUPLE, 2020). Nesse sentido, Schultheiss et al. (2011) avaliaram as margens de 115 mastocitomas e observaram que a cada 1 mm de aumento na margem profunda as chances de desenvolvimento de metástase ou recidiva local diminuía 1,46 vezes e a cada 1mm de acréscimo nas margens laterais os riscos reduziam 1,27 vezes. Apesar disso, sugerem a utilização de margens menores que as recomendadas atualmente em animais com tumores grau 1 e 2, uma vez que não observaram recidiva e metástase após a excisão cirúrgica em pacientes com tumores com margens laterais ≥ 10 mm e margens profundas ≥ 4 mm.

Do mesmo modo, um ensaio realizado nos Estados Unidos com 90 mastocitomas de 73 cães não encontrou associação entre margem e recidiva local, no entanto observou que os tumores recidivantes eram maiores, com alto índice de proliferação e maior grau histológico (DONNELLY et al., 2015)

Selmic e Ruple (2020) realizaram uma revisão de literatura sobre margens cirúrgicas em mastocitomas e sugerem o uso de margens cirúrgicas de 2 cm em mastocitomas grau I e II

com tamanho inferior a 4 cm. Entretanto, não há evidências que suportem a utilização de margens menores que 3 cm em tumores maiores de 4 cm e com graduação III.

2.3.3 Marcadores de proliferação

2.3.3.1 Índice Mitótico

Sabe-se que o índice mitótico é preditivo de sobrevida global para cães com mastocitomas independente do grau do tumor. Cães com mastocitomas com um índice mitótico de 0–5 apresentam mediana de sobrevida de 70 meses, enquanto cães com índice mitótico >5 apresentam mediana de sobrevida de 2 meses (ROMANSIK et al., 2007).

Estudos realizados no Reino Unido mostraram que 82% dos animais com tumores que apresentavam taxa de mitose ≤ 5 permaneciam vivos após 3 anos da cirurgia, enquanto entre aqueles que apresentavam taxa de mitose > 5 , apenas 21% permaneciam vivos (BERLATO et al., 2015) e animais com tumores com alto índice mitótico (>5) têm 6 vezes mais risco de morte do que aquele com baixo índice mitótico (BERLATO et al., 2018).

A fim de validar o ponto de corte do índice mitótico proposto por Romansik et al. (2007), Elston et al. (2009) também propuseram uma nova forma de agrupamento dos tumores, na qual 10 campos de maior aumento são analisados e os tumores são agrupados em três grupos: 0 mitoses, 1 a 7 e >7 . Durante o período de acompanhamento de sobrevida deste estudo, nenhum animal do grupo que não apresentava mitoses morreu, a média de sobrevida dos que apresentavam tumores com 7 mitoses/10 campos foi de 15 meses e dos que exibiam >7 mitoses/10 campos foi três meses.

Neste mesmo sentido, Van Lelyveld et al. (2015) sugeriram um ponto de corte de 2, porém recomendaram a utilização de uma classificação escalonada de índice mitótico, ao invés do estabelecimento de um único ponto de corte, uma vez que a avaliação prognóstica dos animais agrupados no grupo intermediário (entre 2 e 7 mitoses) é difícil. Estes autores observaram que os animais que apresentavam índice mitótico >7 tinham maior probabilidade de morte associada à neoplasia, enquanto os que apresentavam índice mitótico entre 2 e 7 tinham probabilidade moderada e aqueles com baixo índice de proliferação (<2) tinham apenas 5% de probabilidade de morte.

Estudo realizado por Horta et al. (2018) demonstrou que, na análise univariada, houve associação entre o índice mitótico e presença de metástases, além de número de células binucleadas e intensidade de necrose intratumoral. Entretanto, os animais com tumores com

índice mitótico >5 apresentaram sobrevida maior que nos estudos anteriores (média de 307 dias), fato que pode ser explicado devido à ausência de exames post mortem nos casos que morreram durante o estudo, podendo o óbito devido ao tumor ter sido subestimado.

Bertram et al. (2019) alertam para o fato de que o número de mitoses varia entre as diferentes regiões do tumor e destacam a necessidade de padronização na escolha dos campos nos quais será realizada a contagem de mitose, tendo em vista que observaram divergência entre a contagem realizada por análise computadorizada das imagens e a contagem manual.

Kiupel et al. (2019) ressaltam que a alta quantidade de grânulos em alguns tumores pode dificultar a visualização de mitoses. Além disso, Sledge, Webster e Kiupel (2016) advertem que apesar da contagem de mitose ser um critério muito utilizado na graduação histológica, mede apenas a fase proliferação celular, não refletindo a fração de células que estão em crescimento. Logo, ressaltam a importância de se utilizar outros marcadores de proliferação, como Ki67 e AgNOR.

2.3.3.2 AGNOR

A ligação de nitrato de prata a regiões organizadoras nucleolares (AgNOR) é utilizada rotineiramente como marcador de proliferação em processos patológicos, em especial em mastocitomas (SIMOES et al., 1994; SCASE et al., 2006, WEBSTER et al., 2007). Este índice reflete o aumento da velocidade de progressão do ciclo celular (SLEDGE; WEBSTER; KIUPEL, 2016). Contagens altas de AgNOR estão associadas à presença de metástase em linfonodo (KRICK et al., 2017), grau histológico (BERGMAN et al., 2004, BOSTOCK et al., 1989), aumento da taxa de recidiva local e à distância WEBSTER et al., 2007) e ao aumento de morte relacionada com o tumor (BOSTOCK et al., 1989; WEBSTER et al., 2007).

Para melhor avaliação de fatores de proliferação nas neoplasias, devem ser analisadas as áreas com maior quantidade de células marcadas, sendo esta uma das vantagens da técnica de AgNOR, pois as regiões se coram em marrom e são mais facilmente identificadas que mitoses coradas por hematoxilina e eosina (KIUPEL e CAMUS 2019). Bostock et al. (1989) afirmaram que a contagem de AgNOR é um indicador prognóstico melhor e mais objetivo que o grau histológico e o índice mitótico.

Devido ao comportamento variável dos mastocitomas de grau 2, Séguin et al. (2006) e Smith et al. (2017) selecionaram apenas cães com esta graduação a fim de avaliar se o baixo

índice proliferação celular conseguiria prever o comportamento destas neoplasias e concluíram que a recidiva é improvável em animais com tumores com baixa taxa de proliferação. Por outro lado, Scase et al. (2006) descreveram não ser possível prever o comportamento de mastocitomas grau 2 através do índice de AgNOR, sendo esta uma das desvantagens da técnica.

Confirmando a correlação entre as altas taxas de proliferação e maior malignidade, Hume et al. (2011) afirmaram que mastocitomas grau 3 apresentam elevados índices de AgNOR, todavia nesse estudo não foi observada associação prognóstica.

2.3.3.3 KI67

O Ki67 é uma proteína presente no núcleo da célula que é expressa em todas as fases do ciclo celular, exceto na fase G0 ou quiescência, ou seja, é um marcador de crescimento celular (OLIVEIRA et al., 2020). A imunomarcação para Ki67 apresenta associação com a graduação histológica (VASCELLARI et al., 2012; SCASE et al., 2007), intervalo livre da doença (GIL et al., 2020) e comparando a imunomarcação para Ki67 e o índice mitótico, Van Lelyveld et al. (2015) afirmaram que enquanto a marcação para Ki67 é mais sensível, o índice mitótico é mais específico.

A taxa de imunomarcação para Ki67 nos mastocitomas varia de 0 a 55% das células positivas, com média de 11% (KANDEFER-GOLA et al., 2019). Maglennon et al. (2008) sugerem que tumores com >1,8% das células expressam Ki-67, possuem pior prognóstico, embora não tenha observado associação entre a imunomarcação e metástases à distância e recidiva local. Em razão desta alta variação, Webster et al. (2007) propuseram um método para padronizar a avaliação da imunexpressão de Ki67 em mastocitomas, onde são contadas as células Ki67 positivas utilizando uma grade ocular de 10x10mm em cinco campos de maior aumento. Calcula-se então a média de células marcadas nesses campos e os animais que apresentarem tumores >23 células marcadas são classificados como alta taxa de proliferação celular e apresentam menor sobrevida e morte relacionada ao tumor.

A imunomarcação para Ki67 é particularmente importante em neoplasias de grau 2, visto que o prognóstico destes tumores é incerto. Scase et al. (2007) afirmam que os cães com mastocitoma grau 2 que apresentam maior positividade para Ki67 apresentam menor probabilidade de sobrevivência. Semelhantemente, Berlato et al. (2013) afirmam que tanto o índice mitótico quanto o índice Ki67 foram capazes de diferenciar independentemente MCTs

com pior prognóstico, sendo esta distinção particularmente significativa para mastocitomas de grau intermediário.

Um dos obstáculos da utilização da avaliação de Ki-67 é que em alguns tumores a imunomarcagem não ocorre. Fonseca-Alves et al. (2015) relataram que utilizaram como controle positivo a pele presente no fragmento da neoplasia, e que 49,27% das amostras de seu estudo precisaram ser descartadas pois não expressavam Ki67 neste controle positivo interno. Kiupel e Camus (2019) relatam ainda que por vezes a localização dos campos de maior marcação para Ki67 no menor aumento torna-se difícil e por isso recomendam a utilização de cromógeno vermelho.

Para melhor refletir a taxa de proliferação e crescimento celular, os índices de AgNOR devem ser multiplicados pela taxa de Ki67 (WEBSTER et al., 2007). De semelhante modo, Kiupel et al. (2016) afirmam que a combinação AgNOR x Ki67 é o marcador de proliferação mais importante para mastocitomas de baixo grau com margens comprometidas e risco de recorrência. Oliveira et al. (2020) recomendam que a avaliação de marcadores de proliferação deve ser utilizada em conjunto à graduação histológica para uma caracterização mais completa dos tumores.

2.3.4 ESTADIAMENTO

O estadiamento dos mastocitomas segundo a OMS (OWEN, 1980) deve ser realizado conforme Tabela 1.

Tabela 1: Estadiamento clínico do mastocitoma canino.

Estadio 0	Tumor incompletamente excisado da derme, sem envolvimento do linfonodo regional
Estadio 1	Presença de tumor confinado à derme, sem envolvimento do linfonodo regional
Estadio 2	Presença de tumor confinado à derme, com envolvimento do linfonodo regional
Estadio 3	Tumores múltiplos, grandes e infiltrativos com ou sem envolvimento do linfonodo regional
Estadio 4	Tumores com metástase à distância, com envolvimento de sangue e medula óssea

Fonte: OWEN, 1980.

Uma das críticas levantadas por Murphy et al. (2006) a este sistema é que um animal que apresenta múltiplos tumores no momento do diagnóstico pode ser classificado em estadio 3, todavia, se um novo tumor se desenvolve posteriormente, este cão será classificado como estadio 1. Estes autores ainda julgam que falta uma definição objetiva do que seriam os tumores classificados como grandes para serem classificados como estadio 3.

Alguns estudos indicam não haver diferença no resultado entre pacientes com um único mastocitoma cutâneo e aqueles com vários mastocitomas (MULLINS et al., 2008; THAMM et al., 2006). Não obstante, Natividade et al. (2014) observaram que cães com neoplasias maiores apresentam menor sobrevida e mais chances de desenvolver recidiva local e Donnelly et al. (2015) descreveram que a mediana dos tumores que sofreram recidiva foi de 3,0 cm, enquanto dos que não apresentaram recorrência a mediana foi de 2,0 cm. Semelhantemente, Pierini et al. (2019) descreveram que o tempo médio de sobrevivência para cães com mastocitomas >3 cm é de 510 dias e para cães com mastocitomas <3 cm é de 943 dias.

A presença de metástase em linfonodos em cães com MCT pode ser detectada por punção por agulha fina, onde o diagnóstico é estabelecido a partir da visualização de grupos de mastócitos ninhos de mastócitos (BLACKWOOD et al., 2012), e está associada a pior prognóstico (MURPHY et al., 2006). Kiupel (2017) relataram que a manipulação dos tumores pode levar a migração de mastócitos para os linfonodos, induzindo a um resultado falso positivo.

Estudo realizado nos Estados Unidos descreveu que 90% dos animais com linfonodos livres de metástases ou com pré-metástases permaneceram vivos após 2 anos, contra 56% dos animais com metástase precoce ou evidente (WEISHAAR et al., 2014). Krick et al. (2017) relatam que a metástase no linfonodo tem correlação com a recidiva tumoral e com outros fatores prognósticos, como o número médio de AgNORs/núcleo. Warland et al. (2012) descrevem ainda que a avaliação dos linfonodos é essencial, uma vez que todos os cães que desenvolveram metástase à distância apresentavam metástases em linfonodos também.

O consenso europeu para mastocitomas afirma que, apesar da presença de metástase em linfonodos ser um bom fator prognóstico, a interpretação do envolvimento nodal é um desafio (BLACKWOOD et al., 2012). Nesse sentido, Weishaar et al. (2014) propuseram um método de classificação histopatológica de metástases em linfonodos.

Nesta classificação, os linfonodos são divididos em: HN0 (raros ou nenhum mastócito); HN1 (mais de três mastócitos isolados, caracterizando pré-metástase); HN2 (agregados de

mastócitos, caracterizando metástase inicial); HN3 (perda da arquitetura nodal por massas evidentes de mastócitos). (WEISHAAR et al., 2014).

Embora infrequentes, as metástases à distância em mastocitomas são associadas a um pior prognóstico (TAKAHASHI et al., 2000; OZAKI et al., 2002), entretanto o diagnóstico destas metástases é complexo. Book et al. (2011) afirmam que a sensibilidade do exame de ultrassom para detectar metástases no baço é de 43% e para identificar metástases no fígado é de 0%. Warland et al. (2012) compararam a utilização de ultrassonografia e radiografias para diagnóstico de metástases. Uma vez que o exame radiográfico é utilizado predominantemente para diagnosticar as metástases pulmonares e estas são incomuns nos mastocitomas, estes autores descrevem ser o exame ultrassonográfico mais eficiente na detecção de metástases (WARLAN et al., 2012)

Fejos et al. (2021) defendem que o estadiamento deve ser feito apenas nos animais que apresentem alto risco ou com fatores prognósticos negativos (Grau III de Patnaik, alto grau de Kiupel, metástase em linfonodo, crescimento rápido, ulceração, recidiva, localização de alto risco), pois as chances de metástases nos animais que não apresentam esses fatores é muito pequena.

2.3.5 Localização

As localizações mais frequentes dos mastocitomas cutâneos são tronco, extremidades e cabeça e pescoço. Tumores no leito ungueal, cavidade oral, focinho ou áreas inguinais, prepúciais, perineais e mucocutâneas são frequentemente correlacionados com um pior prognóstico do que aqueles em outras partes do corpo (WELLE et al., 2008). De acordo com Blackwood et al. (2012) a dificuldade de realização de exérese cirúrgica adequada nestas localizações pode contribuir para a piora do prognóstico. Smiech et al. (2018) afirmaram que a pele do escroto apresenta maior risco de desenvolver mastocitoma de alto grau. Já Reynolds et al. (2019) descrevem tumores em região de cabeça e inguinal com maiores chances de ser alto grau.

Kiupel et al. (2005) afirmaram que cães com MCTs cutâneos localizados na cabeça e pescoço tinham um risco aumentado de desenvolver metástases, entretanto não observaram correlação entre a localização do tumor e o tempo de sobrevivência dos animais. Poggiani et al. (2012) também descreveram que, apesar de os animais que apresentaram tumores na região

inguinal terem morrido apenas quatro meses após o diagnóstico, a localização do tumor não foi um indicador prognóstico. Similarmente, Horta et al. (2018) e Pierini et al. (2019) não observaram relação entre a localização e a sobrevida.

2.3.6 Angiogênese tumoral

Os mastócitos desempenham papel importante na angiogênese tumoral, pois os grânulos dos mastócitos possuem fatores pró-angiogênicos, tais como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), timidina fosforilase (TP), triptase e quimase (SOUCEK et al., 2007). Além disso, a heparina e a histamina também estimulam a formação de células endoteliais (SÖRBO et al., 1994).

Em humanos, a presença de mastócitos já foi relacionada à angiogênese em neoplasias gastrointestinais (AMMENDOLA et al., 2013), tumores de mama (MARECH et al., 2014) e adenocarcinoma pancreático ductal (AMMENDOLA et al., 2014). Sun e Zhang (2006) descrevem que em carcinomas coloretais o aumento da densidade vascular está associado ao aumento do tumor, menor diferenciação celular, aumento da invasividade, infiltração nos vasos linfáticos e metástases em linfonodos e outros órgãos.

Em mastocitomas, Kandefer-Gola et al. (2015) afirmam que a avaliação da angiogênese por identificação de proteínas estruturais encontradas nos vasos sanguíneos, como o CD31, pode ser uma ferramenta útil para avaliação prognóstica, assim como avaliação do fator pró-angiogênico LIMS-1. Da mesma forma, Patruno et al. (2009) descreveram que a maior expressão VEGF (Vascular endotelial growth factor) está associada a maior malignidade do tumor. Além disso, Preziosi, Sarli e Paltrinieri (2004) avaliaram a imunoexpressão de Fator VIII e afirmaram que a angiogênese está relacionada à invasividade tumoral e o índice mitótico.

Giantin et al. (2012) afirmaram que mastocitomas grau III imunoexpressam fator de crescimento endotelial vascular em maior quantidade, demonstrando que quanto maior o grau do tumor, maior a angiogênese. Melo et al. (2021) observaram associação entre a intensidade de marcação para VEGF e o tempo de sobrevida, sugerindo que este fator seja incluído como marcador prognóstico para mastocitomas e o desenvolvimento de drogas anti-VEGF.

2.3.7 c-KIT

A proteína KIT é um receptor de tirosina-quinase, codificada pelo proto-oncogene c-KIT (Yarden et al., 1987). Mutações no gene c-KIT foram indentificadas em 26,2% dos mastocitomas cutâneos caninos (Letard et al., 2008) e a localização aberrante da proteína KIT

em células avaliadas por imuno-histoquímica pode indicar mutação no gene c-KIT (Webster et al., 2007).

Segundo Blackwood et al. (2012) o receptor de tirosina quinase c-KIT pode estar desregulado em 15-40% dos mastocitomas e está associado a maior risco de metástases, recidiva local, além de maior índice de proliferação tumoral. O padrão de marcação de c-KIT pode ser membranoso, citoplasmático focal ou citoplasmático difuso (REGUERA et al., 2000).

Horta et al. (2018) afirmaram que a imunomarcação citoplasmática difusa apresenta pior prognóstico, com pacientes apresentando mediana de sobrevida de 224 dias, enquanto a localização citoplasmática focal apresenta mediana de 1020 dias. Webster et al. (2007) também afirmam que a localização citoplasmática aberrante está relacionada ao maior risco de recidiva e menor sobrevida. Giantin et al. (2012) afirmam que a marcação perimembranosa indica um bom prognóstico. Entretanto, em seu trabalho, a localização citoplasmática, tanto focal quanto difusa, não foi um bom preditor de prognóstico, uma vez que 82% dos animais com esse padrão ainda estavam vivos ao final do experimento.

Fonseca-Alves et al. (2015) indicaram a dupla marcação de c-KIT e Ki67 como bom preditor prognóstico, uma vez que nos animais que eram positivos para os dois marcadores a média de sobrevida foi 14,4 meses, enquanto naqueles que eram positivos apenas para c-KIT a sobrevida foi 24,5 meses.

Uma revisão sistemática e metanálise sobre o valor prognóstico de marcadores imuno-histoquímicos para MCTs afirmou que cães que possuem tumores com imunoe expressão aberrante de c-KIT apresentam maior chance de óbito (FREYTAG et al., 2021), todavia ressaltam que muitos autores não seguiam os critérios adequados para avaliação, o que dificulta a comparação entre os estudos.

A expressão do m-RNA do c-KIT pode ser uma ferramenta útil para avaliar o status c-KIT em mastocitomas, uma vez que esta possui associação com outros fatores de prognóstico, tais como fatores proliferação (AgNOR, Ki67, índice mitótico) e graduação histológica (SEUNG et al., 2021)

2.3.8 Alterações Histomorfológicas

Berlato et al. (2021) afirmam que alguns tumores classificados como baixo grau podem manifestar um comportamento clínico agressivo. Neste sentido, Horta et al. (2008), propuseram um sistema de classificação de cães com MCT com base no risco de mortalidade. Para isso, observaram arquitetura da neoplasia, presença de edema, hemorragia, necrose, infiltrado eosinofílico. A organização das células tumorais em ninhos mostrou-se relacionada a pior

prognóstico, sugerindo que a arquitetura tumoral seja incluída como critério de malignidade independente da graduação histológica.

A presença de eosinófilos, quase sempre é observada em mastocitomas, podendo por vezes ser o tipo de célula predominante nestas neoplasias (Kiupel et al., 2016). Sua contagem é citada como fator de malignidade na graduação proposta por Patnaik et al. (1984). Entretanto, essa variável foi excluída na graduação segundo Kiupel et al. (2011). Natividade et al. (2014) descreveram que a quantidade de eosinófilos não possui associação com a sobrevida dos animais.

Além da diferenciação celular, Patnaik et al. (1984) descrevem a presença de necrose e hemorragia como critérios de malignidade. Schultheiss et al. (2011) avaliaram a quantidade de edema dentro e ao redor do tumor, entretanto não observaram correlação com o comportamento clínico dos animais.

REFERÊNCIAS

- AMMENDOLA, M. et al. Mast cell positivity to tryptase correlates with metastatic lymph nodes in gastrointestinal cancer patients treated surgically. **Oncology**, v. 85, n. 2, p. 111-116, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1159/000351145>. Disponível em: <https://www.karger.com/Article/Abstract/351145>. Acesso em: 11 set. 2021.
- AMMENDOLA, M. et al. Mast cells density positive to tryptase correlates with angiogenesis in pancreatic ductal adenocarcinoma patients having undergone surgery. **Gastroenterology research and practice**, v. 2014, 2014 DOI: <https://doi.org/10.1155/2014/951957>. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/grp/2014/951957/>. Acesso em: 24 nov. 2021.
- BAE, S. et al. Histologically low-grade, yet biologically high-grade, canine cutaneous mast cell tumours: A systematic review and meta-analysis of individual participant data. **Veterinary and comparative oncology**, v. 18, n. 4, p. 580-589, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1111/vco.12581>. Disponível em: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/vco.12581?casa_token=Jx4hv0irk_MAAAAA:cU2INgelcTXvdJCAeluH2tkB-vl5_U0I8TYNQZd-VXjGIpueoXissS9M3ICDnfm8KVtnlXI_4gtmlgt5. Acesso em: 15 jun. 2021.
- BARBOSA, D. F. L.; PARAVENTI, M. D.; STREFEZZI, R. F. Reproducibility of nuclear morphometry parameters from cytologic smears of canine cutaneous mast cell tumors—intra- and interobserver variability. **Veterinary Clinical Pathology**. V. 43, n.3, p. 469-471, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1111/vcp.12167>. Disponível em: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/vcp.12167?casa_token=ELjOjke2RWEAAA%3AL10K2F1wW_JADE-wuxiSM6cHqvw0R52HH9jb0YB0Hau0kBftR70JX8IHOZdEn0PqazxQyIDIpzUinxO7. Acesso em: 08 fev. 2021.
- BEAVEN, M. A. Our perception of the mast cell from Paul Ehrlich to now. **European journal of immunology**, v. 39, n. 1, p. 11-25, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1002/eji.200838899>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/eji.200838899>. Acesso em: 25 fev. 2019.
- BEHMER, O. A.; TOLOSA, E. M. C. Manual de técnicas para histologia normal e patológica. In: **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**. 2003. p. 331-331.
- BEIL, M. et al. Chromatin texture analysis in three-dimensional images from confocal scanning laser microscopy. **Analytical and quantitative cytology and histology**, v. 17, n. 5, p. 323-331, 1995. DOI: <https://doi.org/10.1159/000325259>. Disponível em: <https://europepmc.org/article/med/8534335>. Acesso em: 10 jul. 2019.
- BERGMAN, P. J. et al. Correlation of histologic grading of canine mast cell tumors with Ki67/PCNA/AgNOR/c-Kit scores: 38 cases (2002–2003). **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 2, n. 2, p. 98-98, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1476-5810.2004.0045a.x>. Disponível em: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1476-5810.2004.0045a.x?casa_token=NRP25vJRN5UAAAAA:vc8BRnns9jGSxCq1CdX5dpkqyPT6r2K1zvdmCoKSScwi_6oFGQTN77KPpGRM2GksSVMjVAjzQR3Qpvs9. Acesso em: 04 Ago. 2019.

BERLATO, D. et al. Comparison of mitotic index and Ki67 index in the prognostication of canine cutaneous mast cell tumours. **Veterinary and comparative oncology**, v. 13, n. 2, p. 143-150, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1111/vco.12029> Disponível em: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/vco.12029?casa_token=N3vzRoKFscUAAA:5iOnj4FEfOP4Ai2-ZayUV1n65q3I7ArI9C6NaywmZJILmprBbe3qmd20ltUT4criee87ZQ-q09sRPEqF. Acesso em: 6 mar. 2018.

BERLATO, D. et al. Value, Limitations, and Recommendations for Grading of Canine Cutaneous Mast Cell Tumors: A Consensus of the Oncology-Pathology Working Group. **Veterinary Pathology**. [s.l.], v.58, n.5, p.858-863, 2021. DOI:10.1177/03009858211009785 Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/03009858211009785>. Acesso em: 01 jan 2022.

BOOK, A. P. et al. Correlation of ultrasound findings, liver and spleen cytology, and prognosis in the clinical staging of high metastatic risk canine mast cell tumors. **Veterinary Radiology & Ultrasound**, v. 52, n. 5, p. 548-554, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1740-8261.2011.01839.x>. Disponível em: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1740-8261.2011.01839.x?casa_token=4GFwwRLJT-QAAAAA:80YWgtEzNf8NET9gZ-2t4NKABPUIvHheRiEC2eu3ZF2RWXVxnncEQdFt9dd2OJTfLpgdsSHyiyIFs4mH. Acesso em: 24 mai. 2020.

BOSTOCK, D. E. et al. Nucleolar organiser regions as indicators of post-surgical prognosis in canine spontaneous mast cell tumours. **British journal of cancer**, v. 59, n. 6, p. 915-918, 1989. DOI: <https://doi.org/10.1038/bjc.1989.193>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/bjc1989193>. Acesso em: 8 de set. 2019;

BROCKS, B. A. W. et al. Internal tandem duplication of exon 8 of *c-kit* is associated with longer total survival in canine cutaneous mast cell tumors. **Veterinary Pathology**, [s.l.], v.58, n. 2, p.315-324, March, 2021. DOI: 10.1177/0300985820973463. Disponível em: https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0300985820973463?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%20%200pubmed. Acesso em: 22 nov. 2021.

CAMUS, M. S. et al. Cytologic criteria for mast cell tumor grading in dogs with evaluation of clinical outcome. **Veterinary pathology**, Madison, v.53, n.6, p. 1117-1123, 2016. DOI: 10.1177/0300985816638721. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/full/10.1177/0300985816638721>. Acesso em: 15 set. 2020.

CASANOVA, M. et al. Stereology in Grading and Prognosis of Canine Cutaneous Mast Cell Tumors. **Veterinary pathology**, v. 58, n. 3, p. 483-490, 2021. DOI:10.1177/0300985820985138. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/full/10.1177/0300985820985138>. Acesso em 1 jan. 2022.

DALECK, C. R. et al. Mastocitoma. In: DALECK, C.R.; NARDI, A.B.; RODASKI, S. **Oncologia em cães e gatos**. São Paulo: Roca, 2009. p. 282-291.

DE NARDI, A. B. et al. Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine Cutaneous and Subcutaneous Mast Cell Tumors. **Cells**, v. 11, n. 4, p. 618, 2022. DOI: <https://doi.org/>

10.3390/cells11040618. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2073-4409/11/4/618>. Acesso em: 20 fev. 2022.

DE RIDDER, T. R. et al. Randomized controlled clinical study evaluating the efficacy and safety of intratumoral treatment of canine mast cell tumors with tigilanol tiglate (EBC-46). **Journal of veterinary internal medicine**, v. 35, n. 1, p. 415-429, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1111/jvim.15806>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/jvim.15806>. Acesso em: 05 jan. 2022.

DIEGENBACH, P. C.; BAAK, J. P. A. Quantitative nuclear image analysis: differentiation between normal, hyperplastic, and malignant appearing uterine glands in a paraffin section III. The use of texture features for differentiation. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 8, n. 2, p. 109-116, 1978. DOI: [https://doi.org/10.1016/0028-2243\(78\)90138-7](https://doi.org/10.1016/0028-2243(78)90138-7). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0028224378901387>. Acesso em: 07 fev. 2018.

DOBROMYLSKYJ, M. J. et al. Evaluation of Minichromosome Maintenance Protein 7 and c-KIT as Prognostic Markers in Feline Cutaneous Mast Cell Tumours. **Journal of comparative pathology**, v. 153, n. 4, p. 244-250, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2015.08.005>. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021997515001309?casa_token=tEkqOlcrW9MAAAAA:D8pjUiYWK7onn_w4W1ArMy56fgHuMagwLjEkq7KWC9thmyKPAQyzhkW1UpaMwT7gJe5NnnXsNFU. Acesso em: 07 set. 2018.

DOBSON, J. M. Breed-predispositions to cancer in pedigree dogs. **International Scholarly Research Notices**, v. 2013, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/941275> Disponível em: <https://downloads.hindawi.com/archive/2013/941275.pdf>. Acesso em: 23 mai. 2019.

DONNELLY, L. et al. Evaluation of histological grade and histologically tumour-free margins as predictors of local recurrence in completely excised canine mast cell tumours. **Veterinary and comparative oncology**, v. 13, n. 1, p. 70-76, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1111/vco.12021>. Disponível em: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/vco.12021?casa_token=3hZNoGjX_3oAAA:AA:bN86VQG9JZURgvqbDy5ZUBFNIP3V6yOQv75NzYxghn-TivO4mbAcNahJXuOz3nc9HPRRpejmMym1lV3d. Acesso em: 24 ago. 2019.

DUNCAN, J. R.; PRASSE, K. W. Cytology of Canine Cutaneous Round Cell Tumors Mast Cell Tumor, Histiocytoma, Lymphosarcoma and Transmissible Venereal Tumor. **Veterinary Pathology Online**, v. 16, n. 6, p. 673-679, 1979.

EHRLICH, P. Beiträge zur Kenntniss der Anilinfärbungen und ihrer Verwendung in der mikroskopischen Technik. **Archiv für mikroskopische Anatomie**, v. 13, n. 1, p. 263-277, 1877. DOI: <https://doi.org/10.1177/030098587901600605>. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/030098587901600605>. Acesso em: 05 fev. 2021.

EINSTEIN, A. J. et al. Fractal characterization of chromatin appearance for diagnosis in breast cytology. **The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland**. v. 185, n. 4, p. 366-381, 1998. DOI: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9896\(199808\)185:4<366::AID-PATH122>3.0.CO;2-C](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9896(199808)185:4<366::AID-PATH122>3.0.CO;2-C). Disponível em:

[https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/\(SICI\)1096-9896\(199808\)185:4%3C366::AID-PATH122%3E3.0.CO;2-C?casa_token=XQTXEzD-oSwAAAAA:3FTzw5MSnNgYX27WMEyRHNiGgTm-N1ZEZax4dlHgFjavBeSDkW8FLLiencVnSg-AywImjEN1ryll-qxr](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/(SICI)1096-9896(199808)185:4%3C366::AID-PATH122%3E3.0.CO;2-C?casa_token=XQTXEzD-oSwAAAAA:3FTzw5MSnNgYX27WMEyRHNiGgTm-N1ZEZax4dlHgFjavBeSDkW8FLLiencVnSg-AywImjEN1ryll-qxr). Acesso em: 05 mar. 2021.

ELSTON, L. B. et al. The importance of the mitotic index as a prognostic factor for survival of canine cutaneous mast cell tumors: a validation study. **Veterinary pathology**, v. 46, n. 2, p. 362-364, 2009. DOI: 10.1354/vp.46-2-362 11. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1354/vp.46-2-362>. Acesso em: 5 jan. 2020.

FEJÖS, C. et al. Extensive staging has no prognostic value in dogs with low-risk mast cell tumours. **Veterinary and Comparative Oncology**, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1111/vco.12773>. Disponível em: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/vco.12773?casa_token=2EpRFWTXILoAAA%3AT7pouL4CjT4o9HiYI-eZnFjiz1LHnmnuoicTsV1Bq2XeTrEwHtSc7tfHb3WEq3gNJN34G_xw75vYrbXy. Acesso em: 07 fev. 2022.

FERNANDES, C. C. et al. Frequência de neoplasias cutâneas em cães atendidos no hospital veterinário da Universidade Federal de Uberlândia durante os anos 2000 a 2010. **Bioscience Journal**, v. 31, n. 2, 2015. Disponível em: https://docs.bvsalud.org/biblioref/2018/11/964108/frequencia-de-neoplasias-cutaneas-em-caes-atendidos-no-hospital_FtGbgzB.pdf. Acesso em: 07 fev. 2021.

FONSECA-ALVES, C. E. et al. Ki67/KIT double immunohistochemical staining in cutaneous mast cell tumors from Boxer dogs. **Research in veterinary science**, v. 102, p. 122-126, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2015.08.007>. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0034528815300369?casa_token=7Hw8YxxE5zcAAAAA:M4cj7uGHR2MryPMYPNLmVe2kWS8gGbhMAiE3eRbbRI6GWxOMkMs4FXRJpCRhS-Bgz2hu3pZgZn8. Acesso em: 15 nov. 2020.

FREYTAG, J. O. et al. Prognostic value of immunohistochemical markers in canine cutaneous mast cell tumours: A systematic review and meta-analysis. **Veterinary and comparative oncology**, v. 19, n. 3, p. 529-540, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1111/vco.12692>. Disponível em: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/vco.12692?casa_token=xjCyQ8fZq2kAAAAA%3A712TCe-8okVSBwfw98QSz5L9zxEX8VDwDAxz2YMwE4_oEsQ7mu5wEBY9boUW0J2S11YebPrTWl4WblXF. Acesso em: 11 jan. 2022.

FULCHER, R. P. et al. Evaluation of a two-centimeter lateral surgical margin for excision of grade I and grade II cutaneous mast cell tumors in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 228, n. 2, p. 210-215, 2006. DOI: 10.2460/javma.228.2.210. Disponível em: <https://avmajournals.avma.org/view/journals/javma/228/2/javma.228.2.210.xml>. Acesso em: 4 fev. 2021.

GIANTIN, M. et al. Expression of matrix metalloproteinases, tissue inhibitors of metalloproteinases and vascular endothelial growth factor in canine mast cell

tumours. **Journal of comparative pathology**, v. 147, n. 4, p. 419-429, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2012.01.011>. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002199751200014X?casa_token=up5VF3TNFvgAAAAA:kwqFogulfrStlUyE-C0gcJorKLmxenLaar52VjFoqfurDXfQxmKcGv2eUj2GZ8IIsH9mVVhjcaM. Acesso em: 03 fev. 2022.

GIANTIN, M. et al. c-KIT messenger RNA and protein expression and mutations in canine cutaneous mast cell tumors: correlations with post-surgical prognosis. **Journal of veterinary diagnostic investigation**, v. 24, n. 1, p. 116-126, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1177/1040638711425945>. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/1040638711425945>. Acesso em: 05 jan. 2019.

GINN, P. E. et al. 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. DOI: <https://doi.org/10.1354/vp.37-1-33>. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1354/vp.37-1-33>. Acesso em: 1 jan. 2019.

GOLDSCHMIDT, M. H., HENDRICK, M. J. **Tumors of the skin and soft tissues**. In: Meuten, D.J., Tumors in the domestic animals. 4ed. Iowa State Press, 2002. P. 45-118.

GRAF, R. et al. Cutaneous tumors in swiss dogs: retrospective data from the swiss canine cancer registry, 2008–2013. **Veterinary pathology**, v. 55, n. 6, p. 809-820, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1177/0300985818789466>. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/full/10.1177/0300985818789466>. Acesso em: 7 fev. 2020.

HORTA, R. S. et al. Assessment of canine mast cell tumor mortality risk based on clinical, histologic, immunohistochemical, and molecular features. **Veterinary pathology**, v. 55, n. 2, p. 212-223, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1177/0300985817747325>. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/0300985817747325>. Acesso em: 25 set. 2019.

HOTTENDORF, G. H.; NIELSEN, S. W. Pathologic survey of 300 extirpated canine mastocytomas. **Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe A**, v. 14, n. 3, p. 272-281, 1967. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1439-0442.1967.tb00235.x>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1439-0442.1967.tb00235.x>. Acesso em: 14 mar; 2020.

JACKSON, D. E. et al. Evaluation of fixation time using Diff-Quik for staining of canine mast cell tumor aspirates. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 42, n. 1, p. 99-102, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1111/vcp.12012>. Disponível : https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/vcp.12012?casa_token=FgBeY6jrNSgAAAAA:s_h1W4YFxFxKHdt9iL71AlFT1gMGyRMx8CrC2kEfOZPff9xqx5EqfZjdRLpnMzWQPyCM0L-5GkQUd9-FsV. Acesso em: 22 jan. 2021.

JAFFE, M. H. et al. Immunohistochemical and clinical evaluation of p53 in canine cutaneous mast cell tumors. **Veterinary pathology**, v. 37, n. 1, p. 40-46, 2000. DOI: <https://doi.org/10.1354/vp.37-1-40>. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1354/vp.37-1-40>. Acesso em: 27 mar. 2019..

JARK, P. C. et al. Genomic copy number variation associated with clinical outcome in canine cutaneous mast cell tumors. **Research in veterinary science**, v. 111, p. 26-30, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2016.11.009>. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0034528816306348?casa_token=4di4LDYaZBYAAAAA:Wnq3FB3jJP34BZsnmQ19pXErZU8nH532rVgLhwkQsztpPsciLQsMp_fi6U3283Gp8nXDvN2pBZY. Acesso em 5 ago. 2020.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Tecido conjuntivo. **Histologia básica**, v. 10, p. 92-124, 1990.

KALESNIKOFF, Janet; GALLI, Stephen J. New developments in mast cell biology. **Nature immunology**, v. 9, n. 11, p. 1215-1223, 2008. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/ni.f.216>. Acesso em: 02 mar. 2022.

KANDEFER-GOLA, M. et al. Immunohistochemical characterization of canine mast cell tumours. **Journal of Comparative Pathology**, v. 166, p. 126, 2019. DOI: 10.1515/bvip-2015-0037 Disponível em: <https://sciendo.com/pdf/10.1515/bvip-2015-0037>. Acesso em: 17 dez. 2020.

KANDEFER-GOLA, M. et al. Immunohistochemical evaluation of neoangiogenesis in canine mast cell tumours. **Bull Vet Inst Pulawy**, v. 59, p. 247-253, 2015.

KIUPEL, M. et al. Impact of tumour depth, tumour location and multiple synchronous masses on the prognosis of canine cutaneous mast cell tumours. **Journal of Veterinary Medicine Series A**, v. 52, n. 6, p. 280-286, 2005. DOI: 10.1111/j.1439-0442.2005.00726.x. Disponível em: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1439-0442.2005.00726.x?casa_token=dv1OaVX_HbUAAAAA:-qB_nUFQgo_0dGjxqYy01qlh3aiYKVTPqQuZLdYM9ZGoBK-izut2dWsFSANkHR3sU8YuXLitEfPaS86s. Acesso em: 28 jan. 2019.

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**, Madison, v.48, n.1, p.147-155, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1177/0300985810386469>. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/full/10.1177/0300985810386469>. Acesso em: 10 set. 2020.

KIUPEL, M. et al. The use of KIT and tryptase expression patterns as prognostic tools for canine cutaneous mast cell tumors. **Veterinary pathology**, v. 41, n. 4, p. 371-377, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1354/vp.41-4-371>. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/full/10.1354/vp.41-4-371>. Acesso em: 15 set. 2021.

KIUPEL, M.; CAMUS, M. Diagnosis and Prognosis of Canine Cutaneous Mast Cell Tumors. **Vet Clin North Am Small Anim Pract.** [s.l.], v. 49, n. 5, p. 819-836, 2019. DOI:10.1016/j.cvsm.2019.04.002. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31178200/> Acesso em: 08 jun. 2021.

KRICK, E. L. et al. Investigating Associations Between Proliferation Indices, C-kit, and Lymph Node Stage in Canine Mast Cell Tumors. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 53, n. 5, p. 258-264, 2017. DOI: <https://doi.org/10.5326/JAAHA-MS-6265>. Disponível em: <https://meridian.allenpress.com/jaaha/article-abstract/53/5/258/176419>. Acesso em 3 mai. 2020.

LESTER, S. J. Disseminated anaplastic mastocytoma with terminal mastocythemia in a dog. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 17, p. 355-360, 1981.

LETARD, S. et al. Gain-of-function mutations in the extracellular domain of KIT are common in canine mast cell tumors. **Molecular Cancer Research**, v. 6, n. 7, p. 1137-1145, 2008. DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-08-0067. Disponível em: <https://mcr.aacrjournals.org/content/6/7/1137.short>. Acesso em: 08 ago. 2019.

LUNA, L. G. **Histopathologic methods and color atlas of special stains and tissue artifacts**. Amer Histolabs Pub Department, 1992.

MADEWELL, B. R.; MUNN, R. J.; PHILLIPS, L. K. Ultrastructure of canine, feline, and bovine mast cell neoplasms. **American journal of veterinary research**, v. 45, n. 10, p. 2066-2073, 1984. Disponível em: <https://europepmc.org/article/med/6437300>. Acesso em: 07 fev. 2022.

MAGLENNON, G. A. et al. Association of Ki67 index with prognosis for intermediate-grade canine cutaneous mast cell tumours. **Veterinary and comparative oncology**, v. 6, n. 4, p. 268-274, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1476-5829.2008.00168.x>. Disponível em: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1476-5829.2008.00168.x?casa_token=jeElCbX_PEEAAAAA:lZ0isfYXi2Fsjk0Y68yHQUuoDk5CWptQqGPn9DAWyJkQeA01MYuh1mhbcJLpK7hH420rAAhyknrf1wRJ. Acesso em 9 jan. 2022.

MARCONATO, L. et al. Clinicopathological features and outcome for dogs with mast cell tumors and bone marrow involvement. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 22, n. 4, p. 1001-1007, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2008.0128.x>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1939-1676.2008.0128.x>. Acesso em: 09 jan, 2021.

MARECH, I. et al. Serum tryptase, mast cells positive to tryptase and microvascular density evaluation in early breast cancer patients: possible translational significance. **BMC cancer**, v. 14, n. 1, p. 1, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2407-14-534>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1186/1471-2407-14-534>. Acesso em: 9 abril. 2020.

MAZAKI-TOVI, M. et al. Marked subcutaneous mast cell and eosinophilic infiltration associated with the presence of multiple *Dirofilaria repens* microfilariae in 4 dogs. **Veterinary clinical pathology**, v. 45, n. 4, p. 703-709, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1111/vcp.12410>. Disponível em: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/vcp.12410?casa_token=itQ6mB3ly-8AAAAA:sa1Gvzsy0SM-77FGwQuwNNgbWQFWYlA2mMwcntcbWL9LKwUctd-to9Ie6Vtd0zqmg9C0Aw7aq9vflDvR. Acesso em: 07 fev. 2020.

MCNIEL, E. A.; PRINK, A. L.; O'BRIEN, T. D. Evaluation of risk and clinical outcome of mast cell tumours in pug dogs. **Veterinary and comparative oncology**, v. 4, n. 1, p. 2-8, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1476-5810.2006.00085.x>. Disponível em: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1476-5810.2006.00085.x?casa_token=5d3ja84M5PAAAAAA:rwBKsuJjw8bOdGxa3jpkQ4pWEHo

B-lFD4TZw0WqtzzTpPaKdKM4kFRGVTcBvEtIZzTVvpUfUklpf8En3. Acesso em: 2 fev. 2021.

MELO, S. R. et al. Immunohistochemical Expression of Vascular Endothelial Growth Factor as a Prognostic Marker for Canine Mast Cell Tumors. **Topics in Companion Animal Medicine**, [s.l.], v. 42, p.100506, 2021. DOI: 10.1016/j.tcam.2020.100506. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1938973620301045>. Acesso em: 05, dez. 2021

MISDORP, W. Mast cells and canine mast cell tumours. A review. **Veterinary quarterly**, v. 26, n. 4, p. 156-169, 2004. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1080/01652176.2004.9695178>. Acesso em: 02 mar.2022.

MULLINS, M. N. et al. 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, n. 1, p. 91-95, 2006. DOI: <https://doi.org/10.2460/javma.228.1.91>. Disponível em: <https://avmajournals.avma.org/view/journals/javma/228/1/javma.228.1.91.xml>. Acesso em: 9 dez. 2021.

NATIVIDADE, F. S. et al. Análise de sobrevida e fatores prognósticos de cães com mastocitoma cutâneo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n. 9, p. 874-884, 2014. Disponível em: <https://www.scielo.br/pdf/pvb/v34n9/v34n9a12.pdf>. Acesso em: 12 set. 2019.

NICOLA, D. Células Redondas. In: COWELL, R. L.; et al. **Diagnóstico citológico e hematológico de cães e gatos**. São Paulo: Medvet, P. 253-256, 2009.

OLIVEIRA, M. T. et al. Canine and feline cutaneous mast cell tumour: a comprehensive review of treatments and outcomes. **Topics in Companion Animal Medicine**, p. 100472, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tcam.2020.100472>. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1938973620300702?casa_token=kLal0_mIhZUAAAAA:q8dYqsADR-wuH_2E00Elt3XNE4N_NE0j3KnVGa-7BjkmVialGWSz9w2PYCi3vfYYTJHVb6Pjewk. Acesso em: 07 fev. 2021.

OZAKI, K. et al. Mast cell tumors of the gastrointestinal tract in 39 dogs. **Veterinary pathology**, v. 39, n. 5, p. 557-564, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1354/vp.39-5-557>. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1354/vp.39-5-557>. Acesso em: 9 jun. 2019.

PATNAIK, A. K.; EHLER, W. J.; MACEWEN, E. G. Canine mast cell tumor: morphologic grading and survival time in 83 dogs. **Veterinary Pathology**, Madison, v.21, p.469-474, 1984. DOI: <https://doi.org/10.1177/030098588402100503>. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/030098588402100503>. Acesso em: 2 fev. 2021.

PATRUNO, R. et al. VEGF concentration from plasma-activated platelets rich correlates with microvascular density and grading in canine mast cell tumour spontaneous model. **Journal of cellular and molecular medicine**, v. 13, n. 3, p. 555-561, 2009. DOI:

<https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2008.00355.x>. Disponível em:
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1582-4934.2008.00355.x>. Acesso em: 13 mar. 2019.

PATRINO, R. et al. c-Kit expression, angiogenesis, and grading in canine mast cell tumour: a unique model to study c-Kit driven human malignancies. **BioMed research international**, v. 2014, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1155/2014/730246>. Disponível em:
<https://www.hindawi.com/journals/bmri/2014/730246/>. Acesso em: 06 jan. 2020.

PIERINI, A. et al. Epidemiology of Breed-Related Mast Cell Tumour Occurrence and Prognostic Significance of Clinical Features in a Defined Population of Dogs in West-Central Italy. **Veterinary sciences**, v. 6, n. 2, p. 53, 2019. DOI:
<https://doi.org/10.3390/vetsci6020053>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/475618>.
 Acesso em: 8 jun. 2021.

PINHEIRO, N. L. Tecido conjuntivo. In: Samuelson, A. D. Tratado de Histologia Veterinária. **Elsevier**. Brasil, 2011.

POGGIANI, S. S. C. et al. Canine cutaneous mast cell tumor: biologic behavior and its correlation with prognostic indicators. **Scientific Research** V. 2, N. 4, p. 255-261, 2012. DOI: DOI:10.4236/ojvm.2012.24041. Disponível em: https://www.scirp.org/html/16-2280047_25612.htm. Acesso em: 13 jun. 2021.

PRESSMAN, N. J. Markovian analysis of cervical cell images. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 24, n. 1, p. 138-144, 1976. DOI: <https://doi.org/10.1177/24.1.56387>. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/24.1.56387>. Acesso em: 6 jan. 2021.

PREZIOSI, R.; SARLI, G.; PALTRINIERI, M. Prognostic value of intratumoral vessel density in cutaneous mast cell tumours of the dog. **Journal of comparative pathology**, v. 130, n. 2, p. 143-151, 2004. DOI: 10.1016/j.jcpa.2003.10.003. Disponível em:
https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002199750300118X?casa_token=L6mvoMeLeq8AAAAA:ZiJ_YiilJGzgnT9Hxn4l7Rg3jVQknrlQnjtH4jYXpo90E3tw_n0Z3KzfVclzT1wKXLqJ5arEO9s. Acesso em: 3 fev. 2021.

REGUERA, M. J. et al. Canine mast cell tumors express stem cell factor receptor. **The American journal of dermatopathology**, v. 22, n. 1, p. 49-54, 2000. DOI: Disponível em:
https://journals.lww.com/amjdermatopathology/fulltext/2000/02000/canine_mast_cell_tumors_express_stem_cell_factor.10.aspx?casa_token=r4upfwatQVAAAAAA:DRswrUVCKoAzA-9K_Q9W8nLBytrOgd6irwnUzIVygGCN5dLHC4-zKr0oiDtKGMX5pxcDn5_sGCQmEzb-QTc3Md4fFcI. Acesso em: 5 jan. 2021.

REYNOLDS, B. D. et al. Patient and tumour factors influencing canine mast cell tumour histological grade and mitotic index. **Veterinary and comparative oncology**, v. 17, n. 3, p. 338-344, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1111/vco.12477>. Disponível em:
https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/vco.12477?casa_token=5eaALMTZhKMAA AAA:qEcvql-38G7B8VZ6Nk6YLobR6r7rqaLSQjnIpaXE0bL0Q0DltjT7L7jNhZZote_KxkeFZu9oZAZ-y6Eu. Acesso em: 7 fev. 2022.

RILEY, J. F.; WEST, G. B. The presence of histamine in tissue mast cells. **The Journal of physiology**, v. 120, n. 4, p. 528, 1953. DOI: 10.1113/jphysiol.1953.sp004915. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmc1366001/>. Acesso em: 5 mar. 2021.

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 the American Veterinary Medical Association**, v. 247, n. 2, p. 184–189, 2015. DOI: <https://doi.org/10.2460/javma.247.2.184>. Disponível em: <https://avmajournals.avma.org/view/journals/javma/247/2/javma.247.2.184.xml>. Acesso em: 3 jan. 2021.

RIVA, F. et al. A study of mutations in the c-kit gene of 32 dogs with mastocytoma. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 17, n. 4, p. 385–388, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1177/104063870501700416>. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/104063870501700416>. Acesso em: 3 set. 2020.

ROMANSIK, E. M. et al. Mitotic index is predictive for survival for canine cutaneous mast cell tumors. **Veterinary pathology**, v. 44, n. 3, p. 335–341, 2007. DOI: 10.1354/vp.44-3-335. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1354/vp.44-3-335>. Acesso em: 07 maio 2018.

SABATTINI, S. et al. Histologic Grading of Canine Mast Cell Tumor Is 2 Better Than 3?. **Veterinary pathology**, v. 52, n. 1, p. 70–73, 2015. DOI: 0.1177/0300985814521638. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24513799/>. Acesso em: 07 dez 2021.

SCARPA, F.; SABATTINI, S.; BETTINI, G. Cytological grading of canine cutaneous mast cell tumors. **Veterinary and comparative oncology**, [s.l.], v.14, n.3, p. 245–251, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1111/vco.12090>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/vco.12090>. Acesso em: 10 set. 2020

SCASE, T. J. et al. Canine mast cell tumors: correlation of apoptosis and proliferation markers with prognosis. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 20, n. 1, p. 151–158, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2006.tb02835.x>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1939-1676.2006.tb02835.x>. Acesso em: 1 jan. 2022.

SCHULTHEISS, P. C. et al. Association of histologic tumor characteristics and size of surgical margins with clinical outcome after surgical removal of cutaneous mast cell tumors in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 238, n. 11, p. 1464–1469, 2011. DOI: <https://doi.org/10.2460/javma.238.11.1464>. Disponível em: <https://avmajournals.avma.org/view/journals/javma/238/11/javma.238.11.1464.xml>. Acesso em: 07 fev. 2022.

SÉGUIN, B. et al. Recurrence Rate, Clinical Outcome, and Cellular Proliferation: Indices as Prognostic Indicators after Incomplete Surgical Excision of Cutaneous Grade II Mast Cell Tumors: 28 Dogs (1994–2002). **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 20, n. 4, p. 933–940, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2006.tb01808.x>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1939-1676.2006.tb01808.x>. Acesso em: 4 jan. 2020.

SÉGUIN, B. et al. Clinical outcome of dogs with grade-II mast cell tumors treated with surgery alone: 55 cases (1996–1999). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 218, n. 7, p. 1120-1123, 2001. DOI: <https://doi.org/10.2460/javma.2001.218.1120>. Disponível em: [https://avmajournals.avma.org/configurable/content/journals\\$002fjavma\\$002f218\\$002f7\\$002fjavma.2001.218.1120.xml?t:ac=journals%24002fjavma%24002f218%24002f7%24002fjavma.2001.218.1120.xml](https://avmajournals.avma.org/configurable/content/journals$002fjavma$002f218$002f7$002fjavma.2001.218.1120.xml?t:ac=journals%24002fjavma%24002f218%24002f7%24002fjavma.2001.218.1120.xml). Acesso em: 29 out. 2020.

SELMIC, L.; E.; RUPLE, A. A systematic review of surgical margins utilized for removal of cutaneous mast cell tumors in dogs. **BMC Veterinary Research**, v. 16, n. 1, p. 1-6, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12917-019-2227-8>. Disponível em: <https://bmcvetres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12917-019-2227-8>. Acesso em: 16 mar. 2021.

SEUNG, B. et al. In situ c-KIT mRNA quantification of canine cutaneous mast cell tumours and its relationship to prognostic factors. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 19, n. 1, p. 132-139, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1111/vco.12650>. Disponível em: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/vco.12650?casa_token=UhFLybev_jkAAAAA:OfRC6uBaJD_R8mjFhEB_kVxOxNMFvcY2NdW7dthNik-z27C3hwpYRQunpq-xW-VvykJkARGT3JM-CJUo. Acesso em: 07 fev. 2022.

SFILIGOI, G. et al. Outcome of dogs with mast cell tumors in the inguinal or perineal region versus other cutaneous locations: 124 cases (1990–2001). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 226, n. 8, p. 1368-1374, 2005. DOI: <https://doi.org/10.2460/javma.2005.226.1368>. Disponível em: <https://avmajournals.avma.org/view/journals/javma/226/8/javma.2005.226.1368.xml>. Acesso em: 14 dez. 2021.

SHAW, T.; KUDNIG, S. T.; FIRESTONE, S. M. Diagnostic accuracy of pre-treatment biopsy for grading cutaneous mast cell tumours in dogs. **Veterinary and comparative oncology**, v. 16, n. 2, p. 214-219, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1111/vco.12346>. Disponível em: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/vco.12346?casa_token=6tWA4jkvnHEAAAAA:LjdAiybE7yESZ66RZolJtolr5KeoXkgC1H5xokQl4nwCqWB9yrrZvEHbqvBQNMA7jyPtgu14-ls_tZo. Acesso em: 05 fev. 2021.

SHOOP, S. J. W. et al. Prevalence and risk factors for mast cell tumours in dogs in England. **Canine Genetics and Epidemiology**, v. 2, n. 1, p. 1, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1186/2052-6687-2-1>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1186/2052-6687-2-1>. Acesso em: 2 jan. 2022.

SIMOES, J. P. C.; SCHONING, P.; BUTINE, M. Prognosis of canine mast cell tumors: a comparison of three methods. **Veterinary Pathology**, v. 31, n. 6, p. 637-647, 1994. DOI: <https://doi.org/10.1177/030098589403100602>. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/030098589403100602>. Acesso em: 18 maio 2020.

SIMPSON, A. M. et al. Evaluation of surgical margins required for complete excision of cutaneous mast cell tumors in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical**

Association, v. 224, n. 2, p. 236-240, 2004. DOI: <https://doi.org/10.2460/javma.2004.224.236>. Disponível em: <https://avmajournals.avma.org/view/journals/javma/224/2/javma.2004.224.236.xml>. Acesso em: 07 fev. 2022 .

SLEDGE, D. G.; WEBSTER, J.; KIUPEL, M. Canine cutaneous mast cell tumors: A combined clinical and pathologic approach to diagnosis, prognosis, and treatment selection. **The Veterinary Journal**, v. 215, p. 43-54, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2016.06.003>. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1090023316300752?casa_token=rjYo9RwFTmMAAAAA:B3nPudN8CUMVxKByrksau74uTw7C8XYVWenJH0KYV9EAZx-aGg84nU1DSd7y-xulGgiKMfluJEI. Acesso em: 4 dez. 2021.

ŚMIECH, A. et al. Epidemiological assessment of the risk of canine mast cell tumours based on the Kiupel two-grade malignancy classification. **Acta veterinaria scandinavica**, v. 60, n. 1, p. 70, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13028-018-0424-2>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1186/s13028-018-0424-2>. Acesso em: 01 nov. 2020.

SMITH, J. et al. Recurrence rates and clinical outcome for dogs with grade II mast cell tumours with a low AgNOR count and Ki67 index treated with surgery alone. **Veterinary and comparative oncology**, v. 15, n. 1, p. 36-45, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1111/vco.12140>. Disponível em: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/vco.12140?casa_token=i3Ds_w0RJr0AAAAA:x0EG0Rt5nSyuObKUZPDmxOxoQ7imCUbjX-qgR17BAdtKBc1tcOIrgUJZSEnMyc_TAQ9RIXYADU8qL-. Acesso em: 01 jul. 2020.

SÖRBO, J.; JAKOBSSON, A.; NORRBY, K. L. A. S. Mast-cell histamine is angiogenic through receptors for histamine1 and histamine2. **International journal of experimental pathology**, v. 75, n. 1, p. 43, 1994. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmc2001786/>. Acesso em: 4 set. 2021.

SOUCEK, L. et al. Mast cells are required for angiogenesis and macroscopic expansion of Myc-induced pancreatic islet tumors. **Nature medicine**, v. 13, n. 10, p. 1211-1218, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1038/nm1649> Disponível em: https://idp.nature.com/authorize/casa?redirect_uri=https://www.nature.com/articles/nm1649&casa_token=Bd-jgTgNH5cAAAAA:ep-VZ1YJ1o6nVhyGpnovC05aX2LT__CIKAFQtNMZkv8MQwoAS9U9SHndf769iFzOVdA_XAOm7beFZiwpUA. Acesso em: 23 out. 2021.

SOUZA, A. C. F. et al. Canine cutaneous mast cell tumors: retrospective study of cases attended by the oncology service at the Veterinary Hospital of FCAV-Unesp, Jaboticabal, from 2005 to 2015. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, n. 9, p. 1808-1817, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1038/nm1649>. Disponível em: https://idp.nature.com/authorize/casa?redirect_uri=https://www.nature.com/articles/nm1649&casa_token=TqKJl20a0esAAAAA:JSeqW7QmhfS8e9DXwuKGYsaBTHPNQSxzvVrT42jdDbkTgsC6LXutLnlB9ZUtH_A7o5xQ7s1YB6xJFaOLIA . Acesso em 15 fev. 2021.

STEFANELLO, D. et al. Comparison of 2-and 3-category histologic grading systems for predicting the presence of metastasis at the time of initial evaluation in dogs with cutaneous mast cell tumors: 386 cases (2009–2014). **Journal of the American Veterinary Medical**

Association, v. 246, n. 7, p. 765-769, 2015. DOI: <https://doi.org/10.2460/javma.246.7.765>.

Disponível em:

<https://avmajournals.avma.org/view/journals/javma/246/7/javma.246.7.765.xml>. Acesso em 4 jun. 2021.

STREFEZZI, R. F. et al. 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. DOI: <https://doi.org/10.1177/104063870902100608>. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/104063870902100608>. Acesso em: 08 jun. 2021.

STREFEZZI, R. F.; XAVIER, J. G.; CATAO-DIAS, J. L. Morphometry of canine cutaneous mast cell tumors. **Veterinary Pathology**, v. 40, n. 3, p. 268-275, 2003. DOI: 10.1354/vp.40-3-268. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1354/vp.40-3-268>. Acesso em: 07 fev. 2021.

SUN, X.; ZHANG, H. Clinicopathological significance of stromal variables: angiogenesis, lymphangiogenesis, inflammatory infiltration, MMP and PINCH in colorectal carcinomas. **Molecular cancer**, v. 5, n. 1, p. 1-20, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1186/1476-4598-5-43>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1186/1476-4598-5-43>. Acesso em : 20 jan. 2021.

TAKAHASHI, T. et al. Visceral mast cell tumors in dogs: 10 cases (1982–1997). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 216, n. 2, p. 222-226, 2000. DOI: <https://doi.org/10.2460/javma.2000.216.222> . Disponível em: <https://avmajournals.avma.org/view/journals/javma/216/2/javma.2000.216.222.xml>. Acesso em: 2 jun. 2021.

TAKEUCHI, Y. et al. Validation of the prognostic value of histopathological grading or c-kit mutation in canine cutaneous mast cell tumours: a retrospective cohort study. **The Veterinary Journal**, v. 196, n. 3, p. 492-498, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2012.11.018>. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1090023312005229?casa_token=JLQYILHWV6MAAAAA:jUSPCxyfWcCejdDgzFv4i40JC3-j5RR4-zdD_rCk1YbAPu8z3_8SiElMvVuNKBXFO1f45QGd3X4. Acesso em: 22 out. 2020.

THAMM, D. H.; TUREK, M. M.; VAIL, D. M. Outcome and prognostic factors following adjuvant prednisone/vinblastine chemotherapy for high-risk canine mast cell tumour: 61 cases. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 68, n. 6, p. 581-587, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1292/jvms.68.581> Disponível em: https://www.jstage.jst.go.jp/article/jvms/68/6/68_6_581/_article/-char/ja/. Acesso em: 6 ago. 2020.

THAMM, D.H; VAIL, D.M. Mast cell tumors. In: WITHROW, S.J.; VAIL, D.M. Withrow & MacEwen's **Small animal clinical oncology**. 4th ed. St. Louis: Saunders Elsevier, 2008. Cap.19, p.402-424.

THOMPSON, J. J. et al. Canine subcutaneous mast cell tumor: characterization and prognostic indices. **Veterinary Pathology**, v. 48, n. 1, p. 156-168, 2011. DOI:

10.1177/03009858103907164. Disponível em:
<https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/0300985810387446>. Acesso em: 22 mar. 2020.

TOMPKINS, S. et al. Breed and anatomical predisposition for canine cutaneous neoplasia in South Africa during 2013. **Veterinary Record**, v. 186, n. 7, p. 218-218, 2020. DOI:
<https://doi.org/10.1136/vr.105277>. Disponível em:
https://bvajournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1136/vr.105277?casa_token=5JG1A93uhVkAAAAA%3AmZX0JT5ib_9Vj8b38n_t897CD3uPsiHDMOo_EGH0SCNvf8wggwBqYigVvzUkIRckeShM86NslKZAmRft7. Acesso em: 04 mar. 2021.

VAIL D. M., WITHROW S. J. 1996. Tumors of the skin and subcutaneous tissues. In: Withrow SJ, Macewen EG. **Small Animal Clinical Oncology**. Philadelphia: W. B. Saunders. pp.167-191.

VAN LEEUWEN, I. S. et al. P53 gene mutations in osteosarcomas in the dog. **Cancer letters**, v. 111, n. 1-2, p. 173-178, 1997. Disponível em:
https://www.researchgate.net/profile/Gerard-Rutteman/publication/14169242_P53_mutations_in_mammary_tumor_cell_lines_and_corresponding_tumor_tissues_in_the_dog/links/0fcfd502a43cab8346000000/P53-mutations-in-mammary-tumor-cell-lines-and-corresponding-tumor-tissues-in-the-dog.pdf. Acesso em: 19 set. 2021.

VAN LEEUWEN, I. S. et al. P53 mutations in mammary tumor cell lines and corresponding tumor tissues in the dog. **Anticancer research**, v. 16, n. 37373744, 1996. Disponível em:
https://www.researchgate.net/profile/Gerard-Rutteman/publication/14169242_P53_mutations_in_mammary_tumor_cell_lines_and_corresponding_tumor_tissues_in_the_dog/links/0fcfd502a43cab8346000000/P53-mutations-in-mammary-tumor-cell-lines-and-corresponding-tumor-tissues-in-the-dog.pdf. Acesso em: 30 ago. 2020.

VAN LELYVELD, S. et al. Comparison between Ki-67 index and mitotic index for predicting outcome in canine mast cell tumours. **Journal of Small Animal Practice**, v. 56, n. 5, p. 312-319, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1111/jsap.12320>. Disponível em:
https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/jsap.12320?casa_token=-OurmVbSWLwAAAAA:vc3kK4MoVIU57grLutO5VcEKw4pkIHmIEa4gzeW3aABhlBQvJb9YRNG9NM9phZb7vMDEAd6wNitTcBSC. Acesso em: 4 jun. 2021.
 VASCELLARI, M. et al. Expression of Ki67, BCL-2, and COX-2 in canine cutaneous mast cell tumors: association with grading and prognosis. **Veterinary Pathology**. [s.l.], v. 50, n.1, p. 110-121, 2013. DOI: 10.1177/0300985812447829. Disponível em:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22673539/>. Acesso em: Acesso em: 23 dez. 2021.

VELDHOFEN, N. et al. Mutations of the p53 gene in canine lymphoma and evidence for germ line p53 mutations in the dog. **Oncogene**, v. 16, n. 2, p. 249-255, 1998. DOI:
<https://doi.org/10.1038/sj.onc.1201489>. Disponível em:
<https://www.nature.com/articles/1201489>. Acesso em: 4 set.. 2021.

VOZDOVA, M. et al. Prevalence and prognostic value of c-kit and TP53 mutations in canine mast cell tumours. **The Veterinary Journal**, v. 247, p. 71-74, 2019. DOI:
<https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2019.03.005>. Disponível em:
https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1090023319300383?casa_token=2nFKUL

QD3NcAAAAA:P1Qng0M7M1rGy0bLIACGPb9irRnNOKGvk7Z2acP1SH3DCIxXBwfa25flH6PSLzrdg0VwSCsMy-E. Acesso em: 4 jul. 2020.

VOZDOVA, M. et al. Structural and copy number chromosome abnormalities in canine cutaneous mast cell tumours. **Journal of applied genetics**, v. 60, n. 1, p. 63-70, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13353-018-0471-4> Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s13353-018-0471-4>. Acesso em: 07 fev. 2022.

WAKSHLAG, J. J. et al. Cross-sectional study to investigate the association between vitamin D status and cutaneous mast cell tumours in Labrador retrievers. **British journal of nutrition**, v. 106, n. S1, p. S60-S63, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1017/S000711451100211X>. Disponível em: <https://www.cambridge.org/core/journals/british-journal-of-nutrition/article/crosssectional-study-to-investigate-the-association-between-vitamin-d-status-and-cutaneous-mast-cell-tumours-in-labrador-retrievers/59B59280540950A7DFDDFF27D7C3921>. Acesso em: 01 jan. 2021.

WARLAND, J. et al. Canine mast cell tumours: decision-making and treatment. **In Practice**, v. 37, n. 7, p. 315-332, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1136/inp.h3440>. Disponível em: https://bvajournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1136/inp.h3440?casa_token=0i2k9BxBIPMAAAAA:JAGVWn1lCWvHFaf3mHARorFhloRxeKHMnGr5Xr6SSBUGh-a2H-GC_54aCzMSed9rERI0bvWDMbNybp0f. Acesso em: 15 mar. 2020.

WARLAND, J. et al. The utility of staging in canine mast cell tumours. **Veterinary and comparative oncology**, v. 12, n. 4, p. 287-298, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1111/vco.12012>. Disponível em: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/vco.12012?casa_token=U6SJcDgINBEAAA:AA:i7dOvi8knxFu-hQhOi1bJMbdRdUVBY8Od3fi1MPshp7ECg4h7m-GJucFzZ741h4u_83ZfvzovtDDtSOF. Acesso em: 17 nov. 2021.

WARLAND, J.; DOBSON, J. Breed predispositions in canine mast cell tumour: a single centre experience in the United Kingdom. **The Veterinary Journal**, v. 197, n. 2, p. 496-498, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2013.02.017>. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1090023313000798?casa_token=-bCcKpeLIBoAAAA:IOMZ1sW98aIHmsyikETThUep-EdIzvFRipo2Ap-NOuaLNGpmCsPKly-y0wvcGxVavvH5Oe6k6j0. Acesso em: 22 set. 2020.

WEBSTER, J. D. et al. Cellular proliferation in canine cutaneous mast cell tumors: associations with c-KIT and its role in prognostication. **Veterinary Pathology Online**, v. 44, n. 3, p. 298-308, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1354/vp.44-3-298>. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/full/10.1354/vp.44-3-298>. Acesso em: 3 mar. 2020.

WEBSTER, J.D. et al. The role of c-KIT in tumorigenesis: evaluation in canine cutaneous mast cell tumors. **Neoplasia**, [s.l.], v. 8, n. 2, p. 104-111, 2006. DOI: 10.1593/neo.05622. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1476558606800199>. Acesso em: 15 fev. 2021.

WEILER, C. R.; BUTTERFIELD, J. Mast Cell Sarcoma: Clinical Management. **Immunology and allergy clinics of North America**, v. 34, n. 2, p. 423-432, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.iac.2014.01.004>. Disponível em:

[https://www.immunology.theclinics.com/article/S0889-8561\(14\)00005-8/abstract](https://www.immunology.theclinics.com/article/S0889-8561(14)00005-8/abstract). Acesso em: 4 fev. 2021.

WEISHAAR, K. M. et al. Correlation of nodal mast cells with clinical outcome in dogs with mast cell tumour and a proposed classification system for the evaluation of node metastasis. **Journal of comparative pathology**, v. 151, n. 4, p. 329-338, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2014.07.004>. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021997514001182?casa_token=uFrCPxDXVx8AAAAA:nf6ScERRj5LttewAwKwt7xSptDpUWnStLVON5dHYUyGK1GohtfLPZkWhcrdbbPAs1uuk23crgR8. Acesso em: 4 out. 2021.

WEISHAAR, K. M. et al. Correlation of nodal mast cells with clinical outcome in dogs with mast cell tumour and a proposed classification system for the evaluation of node metastasis. **Journal of comparative pathology**, v. 151, n. 4, p. 329-338, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2014.07.004>. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021997514001182?casa_token=nqJZdm0yLkoAAAAA:pfWZoPEqZKL6qeOMi-AhcRMSV2Q0rRifZ-qiVKBEHDg38rI3JV7wSGBQTmM9kWrQJL2x8gX5rgA. Acesso em: 14 jan. 2021.

WELLE, 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. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-3164.2008.00694.x>. Disponível em: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-3164.2008.00694.x?casa_token=Bgdcxkfdjn4AAAAA:mN1oGlu7yLh6c46jT6Z-RPmeKghsu0d0a6MYUE7Gl42heymqLeehVsucqn3S6iteHbPWS_Ha3KhguCCb. Acesso em: 06 out. 2021.

WELLMAN, M. L.; LONDON, C. Cutaneous Mast Cell Tumors. **Veterinary Cytology**, p. 138-150, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1002/9781119380559.ch13>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9781119380559.ch13>. Acesso em: 11 nov. 2021.

WHITE, C. R. et al. Cutaneous MCTs: associations with spay/neuter status, breed, body size, and phylogenetic cluster. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 47, n. 3, p. 210-216, 2011. DOI: <https://doi.org/10.5326/JAAHA-MS-5621>. Disponível em: <https://meridian.allenpress.com/jaaha/article-abstract/47/3/210/176792>. Acesso em: 11 nov. 2021.

YARDEN, Y. et al. Human proto-oncogene c-kit: a new cell surface receptor tyrosine kinase for an unidentified ligand. **The EMBO journal**, v. 6, n. 11, p. 3341, 1987. DOI: <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1987.tb02655.x>. Disponível em: <https://www.embopress.org/doi/abs/10.1002/j.1460-2075.1987.tb02655.x>. Acesso em: 05 set. 2020.

ZEMKE, D.; YAMINI, B.; YUZBASIYAN-GURKAN, V. Mutations in the juxtamembrane domain of c-KIT are associated with higher grade mast cell tumors in dogs. **Veterinary pathology**, v. 39, n. 5, p. 529-535, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1354/vp.39-5-529>. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1354/vp.39-5-529>. Acesso em: 2 nov. 2021.

ZEMKE, D.; YAMINI, B; YUZBASIYAN-GURKAN, V. Characterization of an undifferentiated malignancy as a mast cell tumor using mutation analysis in the proto-oncogene c-KIT. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.13, p.341-345, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1177/104063870101300411>. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/104063870101300411>. Acesso em: 25 set. 2021.

CAPÍTULO 2

Artigo a ser submetido no periódico Histopathology

VALIDATION OF THE PROGNOSTIC VALUE OF HISTOMORPHOLOGICAL VARIABLES IN CANINE CUTANEOUS MAST CELL TUMOURS

VALIDAÇÃO DO VALOR PROGNÓSTICO DE VARIÁVEIS HISTOMORFOLÓGICAS EM MASTOCITOMAS CUTÂNEOS CANINOS

L. F. Gundim^{1*}, T. C. Modesto¹, I. P. Castro¹, A. A. Medeiros¹, E. C. Guimarães²

¹Laboratório de Patologia Animal, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG. ² Faculdade de Matemática, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG.

*E-mail: ligiagundim@gmail.com

Resumo

O mastocitoma é um dos tumores mais comuns em cães. Alguns fatores prognósticos já foram estabelecidos, entretanto, devido ao comportamento variável destas neoplasias, torna-se necessária a investigação de outros fatores que possam auxiliar na previsão do comportamento destes tumores. Objetivou-se avaliar alterações histomorfológicas em mastocitomas caninos, a correlação entre elas e sua influência na evolução clínica de cães com mastocitoma, assim como características epidemiológicas e clínicas do tumor e sua relação com a morte do animal. Observou-se relação entre arquitetura e grau segundo Kiupel ($p=2,907^{-6}$), mitose e grau segundo Patnaik ($p=0,003$). Animais SRD apresentaram mais neoplasias grau II ($p=0,045$), e a morte dos animais esteve relacionada com ulceração do tumor ($p=0,006$) e idade do animal ($p=0,001$). Na matriz de correlação, houve associação entre quantidade de eosinófilos e extensão tumoral (0,221) e arquitetura (0,338); arquitetura e quantidade de mitoses (0,339); hemorragia e graduação segundo Patnaik (0,190). Já no teste de log-rank, arquitetura ($p=0,006$), número de mitoses ($p=0,000$), graduação de Patnaik ($p=0,045$) e graduação de Kiupel ($p=0,000$) influenciaram na sobrevivência dos animais. Concluiu-se que ulceração do tumor, arquitetura, número de mitoses e graduação histológica podem ser utilizadas como fatores prognósticos de mastocitomas em cães.

Palavras-chave: cães; mastócitos; neoplasia.

Abstract

Mast cell tumor is one of the most common tumors in dogs. Some prognostic factors have already been established, however, due to their variable behavior, it is necessary to investigate other factors that may assist in predicting the behavior of these tumors. The objective was to evaluate histomorphological changes in canine mastocytomas, the correlation between them and their influence on the clinical evolution of dogs with mastocytoma, as well as the epidemiological and clinical characteristics of the tumor and its relationship with the death of the animal. In the chi-square test, a relationship was observed between architecture and degree according to Kiupel ($p = 2.907 \cdot 10^{-6}$), mitosis and degree according to Patnaik ($p = 0.003$). SRD animals showed more grade II neoplasms ($p = 0.045$), and the animals' death was related to tumor ulceration ($p = 0.006$) and animal age ($p = 0.001$). In the correlation matrix, there was an association between quantity of eosinophils and tumor extension (0.221) and architecture (0.338); architecture and quantity of mitoses (0.339); hemorrhage and grading according to Patnaik (0.190). In the log-rank test, architecture ($p = 0.006$), number of mitoses ($p = 0.000$), Patnaik graduation (0.045) and Kiupel graduation (0.000) influenced the animals' survival. It was concluded that tumor ulceration, architecture, number of mitoses and histological grading can be used as prognostic factors for mast cell tumors in dogs.

Key-words: dog; mast cell; neoplasia.

Introdução

O mastocitoma é uma das neoplasias mais comuns em cães, representando 16,78% e 21,8% das neoplasias cutâneas (COSTA et al., 2017; SUEPAUL et al., 2019; KOK et al., 2019). Ocorre predominantemente na pele, no entanto pode acometer outras localizações, como linfonodos e órgãos internos (BLACKWOOD et al., 2012). As raças mais acometidas são Boxer, Labrador e Golden Retriever e não há predisposição sexual (PIERINI et al., 2019).

O comportamento clínico dos mastocitomas caninos é variável, alguns apresentam comportamento menos agressivo, enquanto outros crescem agressivamente e metastatizam (DOBSON E SCASE, 2007). Vários fatores tem sido utilizados para predizer o comportamento dos mastocitomas como: grau histopatológico (SLEDGE et al., 2016), estadio clínico (OMS) (WELLE et al., 2008), localização (REYNOLDS et al., 2019; SMIECH et al., 2018), taxa de proliferação celular (índice mitótico) (ROMANSIK et al., 2007), raça (PIERINI et al., 2019),

número de nódulos tumorais (único ou múltiplo) (FURLANI et al., 2008) , profundidade de invasão do tecido subcutâneo (THOMPSON et al., 2010), e marcadores de proliferação celular, incluindo regiões organizadoras nucleolares argirofílicas (AgNORs) (BOSTOCK et al., 1989; SCASE et al., 2006), antígeno de células nucleares em proliferação (PCNA) e Ki67 (BERLATO et al., 2015).

Nenhum desses fatores de prognóstico provou ser superior à graduação histopatológica para prever o tempo de sobrevivência. No entanto, essa graduação depende da avaliação subjetiva das características histológicas das células neoplásicas e tem problemas de reprodutibilidade que levam a discordância de até 50-60% entre patologistas experientes, especialmente na avaliação de casos limítrofes (grau II) (STREFEZZI et al., 2003; NORTHRUP et al., 2005). Consequentemente, o estudo de outras variáveis histomorfológicas que possam auxiliar na determinação do prognóstico é necessário, principalmente porque estas podem ser obtidas a partir de lâminas coradas com hematoxilina-eosina utilizadas rotineiramente para diagnóstico histopatológico, evitando outras técnicas de alto custo e complexidade.

Nesta perspectiva, o presente estudo objetivou avaliar alterações histomorfológicas em mastocitomas caninos, a correlação entre elas e sua influência na evolução clínica de cães com mastocitoma, assim como características epidemiológicas e clínicas do tumor e sua relação com a morte do animal.

Material e métodos

Amostras

Realizou-se estudo retrospectivo dos casos de mastocitoma canino a partir do arquivo do Laboratório de Patologia Animal do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia (HV-UFU), no período de Janeiro de 2016 a Junho 2019. Os critérios de inclusão no estudo foram: cães portadores de mastocitoma diagnosticados a partir de avaliação histopatológica, que haviam realizado biópsia excisional. Foram excluídos os casos diagnosticados apenas por exames citopatológico ou biópsia incisional. Todos os cães selecionados passaram por tratamento cirúrgico com excisão total dos tumores, sempre que possível com margem de 3 cm em dois planos e remoção de um plano fascial profundo ao

tumor. Os proprietários dos cães deram consentimento por escrito para o uso experimental das amostras de tumor e informações clínicas dos cães.

Os dados epidemiológicos (idade, sexo, raça) e clinicopatológicos (localização, tamanho do tumor e presença de ulceração) foram coletados dos prontuários. Quanto à idade, os cães foram agrupados em: jovens (até 1 ano), adultos (1 a 8 anos) e idosos (acima de 8 anos). As localizações consideradas foram: cabeça, membros, órgãos genitais, cauda, abdome, tórax, flanco, região inguinal, segundo Costa et al. (2017). Conforme o tamanho, os tumores foram classificados em menor que 2 cm, entre 2 e 5 cm e maior que 5 cm (MURPHY et al., 2006).

Análise Histológica

Amostras dos mastocitomas foram fixadas em formalina por 48 horas e seções de 4 mm de espessura foram preparadas rotineiramente e coradas com hematoxilina-eosina e azul de toluidina.

O exame histopatológico foi realizado sob microscopia de luz e os tumores foram classificados segundo o grau usando os Sistemas de Patnaik et al. (1984) e Kiupel et al. (2011). Utilizou-se ainda a associação das duas graduações, conforme Berlato et al. (2021). O grau do tumor foi avaliado de forma independente por três patologistas e quando havia discordância quanto à graduação, o diagnóstico atribuído por dois patologistas foi considerado.

As neoplasias também foram avaliadas para caracterizar a extensão do tumor (infiltração de células tumorais na derme, subcutâneo e tecido muscular), arquitetura (ninhos ou cordões), necrose intratumoral, hemorragia, hialinização de colágeno, desmoplasia e infiltrado eosinofílico em uma análise semiquantitativa (ausentes, infiltrado discreto, infiltrado moderado e infiltrado intenso). Outras avaliações foram as margens cirúrgicas (livre, comprometida, exígua), número de células binucleadas e índice mitótico. Figuras mitóticas foram contadas em cinco campos com números mais elevados destas variáveis, sendo agrupados os tumores com <5 ; $5-7$ e >7 mitoses por campo de maior aumento segundo Elston et al. (2009).

Acompanhamento dos animais

As informações de acompanhamento dos cães foram obtidas por meio de exames periódicos realizados no HV-UFU, ou por comunicação por telefone com os proprietários. Os

cães foram acompanhados por no mínimo 12 meses após a cirurgia. A sobrevida global (SG) foi determinada para todos os pacientes e definido como o tempo desde o tratamento cirúrgico até a morte relacionada ao tumor (independentemente de ser natural ou resultado de eutanásia como consequência de metástases generalizadas ou de piora progressiva da saúde devido ao tumor). Pacientes perdidos para acompanhamento foram censurados.

Dados sobre o estado geral do paciente, ocorrência ou não de recidivas, surgimento de novos tumores cutâneos ou ocorrência de metástase foram registrados.

Análise estatística

Teste de Qui-quadrado foi utilizado para avaliar a relação entre as seguintes variáveis: graduação histológica de Patnaik et al. (1984) e Kiupel et al. (2011) e alterações histológicas (número de células binucleadas, índice mitótico, extensão do tumor, arquitetura, infiltrado eosinofílico, necrose intratumoral, hemorragia, hialinização do colágeno e desmoplasia); características epidemiológicas (idade, raça, tamanho do tumor, ulceração da neoplasia) e graduação histológica; características epidemiológicas e morte. Quando as variáveis apresentaram associação estatística, realizou-se teste de regressão logística. O cálculo de correlação entre as variáveis histológicas foi realizado por meio de matriz de correlação de Spearman, sendo $r > 0,7$ considerado como forte correlação, r entre 0,3 e 0,7 correlação moderada e $r < 0,3$ correlação fraca.

A sobrevida global (SG) dos pacientes neste estudo foi estimada pela curva de Kaplan-Meier seguido pelo teste de Log-Rank, Breslow e Tarone-Ware para comparação das curvas de sobrevida de acordo com as variáveis histológicas estudadas (graduação histológica segundo Patnaik et al. (1984) e Kiupel et al. (2011) e alterações histológicas (número de células binucleadas, índice mitótico, extensão do tumor, arquitetura, infiltrado eosinofílico, necrose intratumoral, hemorragia, hialinização do colágeno e desmoplasia). Na análise da SG foram censurados os cães que ainda estavam vivos.

A influência concomitante das variáveis prognósticas na SG foi investigada por meio de análise multivariada por regressão de Cox. Os testes foram realizados com o programa do Software Statistics Base para Windows V.20 (IBM® SPSS®), com nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

Resultados

Foram incluídos nesse estudo 123 animais, sendo a maioria fêmeas (65,29%), sem raça definida (SRD) (48,82%) ($p=2,2 \cdot 10^{-6}$) e com idade média de 8,95 anos (Tabela 1).

Tabela 1: Dados epidemiológicos e graduação histológica de mastocitomas cutâneos caninos de cães atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia-MG, Janeiro de 2016 a Junho 2019

n	%	n	%	n	%
Sexo (n=121)		Localização (n=115)		Patnaik (n=141)	
Fêmeas	79 64,23	Abdome	26 22,61	1	28 18,86
Machos	42 34,15	Membros	24 20,87	2	86 60,99
Raça (n=114)		Genital	20 17,39	3	27 19,15
SRD	55 48,24	Cabeça	18 15,62	Kiupel	
Boxer	13 11,4	Tórax	11 9,57	Baixo Grau	91 64,54
Labrador	12 10,53	Inguinal	7 6,09	Alto Grau	50 35,46
Poodle	7 6,14	Flanco	5 4,35		
Pit bull	6 5,26	Outros	4 3,48		
Cocker	4 3,51	Ulceração (n=90)			
Rottweiler	2 1,75	Sim	34 37,78		
Basset	2 1,75	Não	56 62,22		
Fox Paulistinha	2 1,75	Idade (n=110)			
Teckel	2 1,75	Adulto	57 51,82		
York Shire	2 1,75	Idoso	53 48,18		
Pug	2 1,75	Tamanho (n=11)			
Beagle	2 1,75	<2	28 25,23		
Golden Retriever	1 0,88	2 a 5 cm	51 45,94		
Lhasa Apso	1 0,88	> 5 cm	31 28,83		
Pinscher	1 0,88				

Cento e dois animais apresentavam nódulo único (82,93%) e os demais (17,07%) apresentavam nódulos múltiplos, totalizando 141 tumores. Dentre esses, a maior parte se encontrava em região abdominal (22,61%) e membros (20,87%) e a maioria não era ulcerado (62,22%). O tamanho das neoplasias variou de 0,2 a 25 cm, com média de 4,49 cm, sendo que a maioria dos tumores (45,95%) tinha entre 2 e 5 cm (Tabela 1). Na avaliação da graduação histológica dos mastocitomas, a maioria apresentou grau II (60,99%) e foram classificados como de baixo grau (64,54%) (Tabela 1).

Quando as alterações histológicas foram comparadas com a graduação histológica, observou-se associação entre disposição celular das neoplasias em cordões e baixo grau segundo Kiupel et al. (2011) ($p=2,907^{-6}$) (Tabela 2), sendo a razão de probabilidade 0,272. Observou-se ainda que neoplasias grau III segundo Patnaik, Ehler e Macewen (1984) possuíam maior quantidade de mitoses ($p=0,03$) (Tabela 2).

Tabela 2: Correlação entre parâmetros histológicos e graduação e morte de cães com mastocitoma. Uberlândia-MG, Janeiro de 2016 a Junho 2019

Alterações histológicas	Teste Qui-quadrado			Log-rank
	Grau Patnaik	Grau Kiupel	Morte	
Arquitetura	0,895	2,907 ⁻⁶ *	0,112	0,006*
Necrose	0,235	0,551	0,598	0,690
Hemorragia	0,491	0,811	0,933	0,980
Hialinização	0,886	0,617	0,838	0,805
Desmoplasia	0,668	0,642	0,382	0,274
Eosinófilos	0,416	0,631	0,262	0,175
Células binucleadas	0,895	0,278	0,257	0,078
Mitose	0,003*	0,063	0,300	0,000*
Grau Patnaik	-	-		0,045*
Grau Kiupel	-	-	-	0,000*

* $p<0,05$

Na análise da matriz de correlação de Spearman, as variáveis histológicas que demonstraram correlação foram: quantidade de eosinófilos e extensão tumoral e arquitetura; arquitetura e células binucleadas, quantidade de mitoses, Grau de Patnaik e Grau de Kiupel; hemorragia e graduação segundo Patnaik.

Avaliação da sobrevida

Durante o período médio de acompanhamento de 560 dias (intervalo 1-1400), 73 cães foram perdidos para acompanhamento (tutor não trouxe novamente o cão para avaliação, tutor não respondeu ao contato telefônico, impossibilidade de contactar tutor). Dos 50 animais em que foi possível acompanhar a evolução clínica, apenas três (6%) apresentaram recidiva, um animal desenvolveu metástase (2%) e 31 animais morreram (62%).

Em relação à análise da influência das características epidemiológicas e do tumor sobre a evolução clínica (teste de Qui-quadrado) houve correlação entre óbito e ulceração dos tumores ($p=0,006$) e idade maior que oito anos ($p=0,001$), sendo o risco de morte em cães idosos 40,5% vezes maior do que nos animais adultos. O desfecho clínico não foi relacionado à localização, raça e tamanho tumoral ($p>0,05$) (Tabela 3).

A média de SG foi de 698 dias (Intervalo de confiança de 95% [IC], 543-853), e a mediana foi de 604 dias (Intervalo de confiança de 95% [IC], 386-822). Das variáveis prognósticas consideradas, somente número de mitoses, grau e arquitetura apresentaram correlação significativa com SG (Tabela 2).

Tabela 3: Correlação entre achados epidemiológicos e graduação e morte de cães com mastocitoma. Uberlândia-MG, Janeiro de 2016 a Junho 2019

	Graduação Patnaik et al. (1984)	Graduação Kiupel et al. (2011)	Morte
Raça	0,045*	0,336	0,23
Localização	0,216	0,216	0,475
Ulceração	0,623	0,385	0,006*
Idade	0,289	0,77	0,001*
Tamanho	0,893	0,876	0,472

* teste de Qui-quadrado $p<0,05$

Os animais com mastocitomas dispostos em ninhos apresentam mediana de 90 dias e morrem antes do que os animais com neoplasias organizadas em cordões ($p=0,006$). Os animais com mastocitoma de alto grau segundo Kiupel et al. (2011) não atingem a mediana (604 dias)

e morrem mais cedo que aqueles classificados como baixo grau ($p=0,045$). Quanto à graduação segundo Patnaik et al. (1984), a mediana foi de 604 dias, sendo que os mastocitomas com grau III morrem mais cedo ($p=0,000$). Na avaliação da variável número de mitoses, a mediana foi de 604 dias e os cães com mastocitoma com 5-7 e >7 mitoses por campo de maior aumento não atingiram a mediana (mediana de 240 e 33 dias respectivamente) e morrem mais cedo que aqueles cães com mastocitoma com menos de 5 mitoses por campo de grande aumento ($p=0,000$) (Figura 1).

Somente nove amostras puderam ter as margens adequadamente avaliadas e todas apresentavam margem comprometida. Entretanto os dados foram insuficientes para serem incluídos na avaliação da sobrevida.

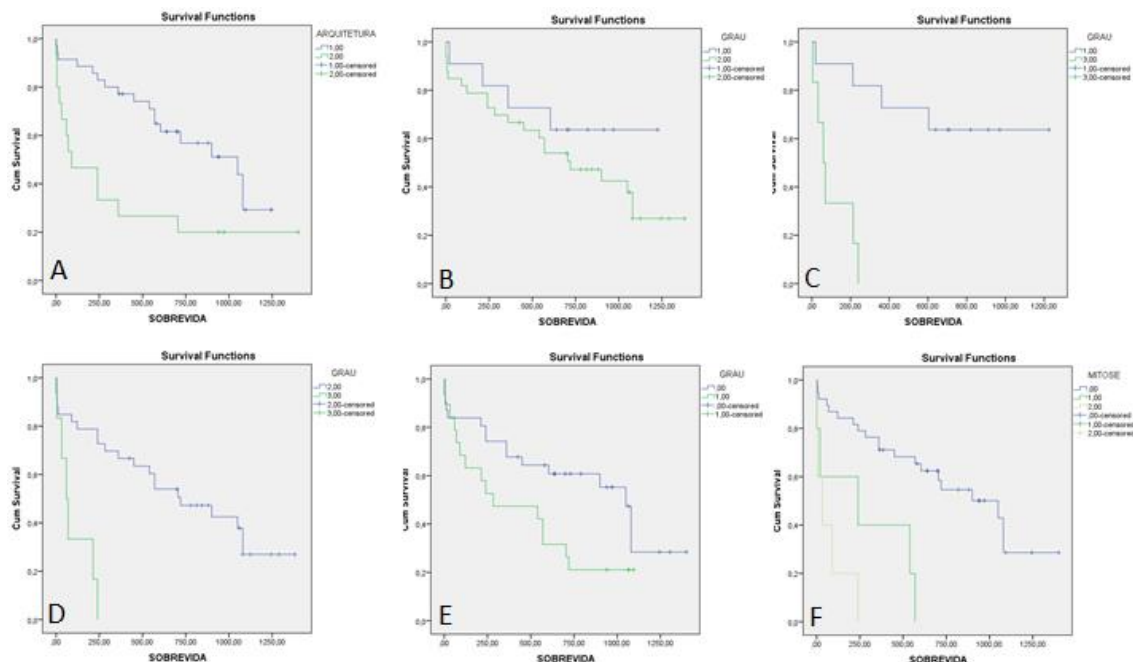


Figura 1: Curvas de sobrevida para cães com mastocitoma. A: Arquitetura (1: Cordões; 2: Ninhos): mediana 705 dias e mastocitomas com arquitetura em ninhos tem mediana de 90 dias ($p=0,006$); B: Comparação entre graus histológicos 1 e 2 segundo Patnaik et al. (1984) ($p=0,29$); C: Comparação entre graus histológicos 1 e 3 ($P=0,001$); D: Comparação entre graus histológicos 2 e 3 ($P=0,000$); E: Graduação histológica segundo Kiupel et al. (2011): mediana 604 dias e animais com alto grau apresentam mediana de 283 dias ($p=0,045$). F: Mitoses (1: <5 ; 2: 5-7; 3: >7)

À análise multivariada entre a SG e as variáveis preditoras estudadas para mastocitomas caninos, não houve correlação entre as variáveis analisadas (Tabela 4).

Tabela 4. Análise multivariada de regressão de Cox da sobrevida global de cães com mastocitoma em comparação às variáveis preditoras. Uberlândia-MG, Janeiro de 2016 a Junho 2019

Variáveis		Erro Padrão	p-valor	Taxa de risco	de IC (95%)
Grau	histológico	0,570	0,244	1,941	0,636 – 5,931
Patnaik					
Grau	histológico	0,552	0,835	1,122	0,380 – 3,312
Kiupell					
Extensão		0,343	0,551	1,227	0,626 – 2,404
Arquitetura		0,479	0,352	0,641	0,251 – 1,637
Necrose		0,665	0,532	0,660	0,179 – 2,430
Hemorragia		0,667	0,509	1,553	0,420 – 5,743
Hialinização		0,477	0,789	0,880	0,346 – 2,242
Eosinófilos		0,256	0,834	1,055	0,639 – 1,744
Margem		0,646	0,125	0,371	0,105 – 1,315
Binucleação		0,176	0,163	0,782	0,554 – 1,105
Mitoses		0,290	1,602	2,719	0,907 – 2,830

Discussão

Animais sem raça definida (SRD) foram os mais afetados por mastocitoma, assim como descrito por Horta et al. (2018) e Kluthcovsky et al. (2020) em estudos também realizados no Brasil. Este dado reflete o estrato populacional do HV- UFU, uma vez que os animais atendidos são majoritariamente SRD. Quanto às raças, Warland e Dobson (2013) em estudo realizado no Reino Unido e Śmiech et al. (2018) na Polônia, descreveram que as raças mais afetadas foram boxer e labrador, assim como descrito neste estudo.

A média de idade dos animais do presente estudo (8,95 anos) foi semelhante à descrita por Horta et al. (2018) e Kluthcovsky et al. (2020). Embora cães idosos tenham morrido com mais frequência do que adultos, não se pode afirmar que o óbito ocorreu devido à neoplasia, pois somente 50 cães puderam ser acompanhados. Shoop et al. (2015) descreveram que cães idosos têm mais chance de desenvolver mastocitoma que cães jovens e Śmiech et al. (2019)

relataram que cães idosos apresentam maior risco de apresentar tumores de alto grau. Por outro lado, semelhante ao observado nesse estudo, Reynolds et al. (2019) não observaram associação significativa entre idade e graduação histológica.

Não há consenso na literatura quanto à localização mais frequente de mastocitomas. Nesse estudo, a região abdominal foi mais acometida (22,61%), enquanto no estudo realizado por Reynolds et al. (2019) os tumores ocorreram mais frequentemente em região de nariz e face. Por outro lado, Horta et al. (2018) descreveram membros e tronco como localizações mais comuns, enquanto Pierini et al. (2019) e Kluthcovsky et al. (2020) também observaram mais neoplasias na região de tronco. Já Smiech et al. (2018) descreveram que o risco de ocorrência de mastocitomas na região do escroto é maior.

Apesar de não ter sido observada correlação entre a localização do tumor e a graduação histológica neste ensaio ($p=0,893$), outros estudos indicam maior chance de mastocitomas de alto grau se localizarem na região inguinal, na cabeça (REYNOLDS et al., 2019) e no escroto (SMIECH et al., 2018). A ulceração do tumor esteve relacionada à morte dos cães deste estudo. Pierini et al. (2019) descreveram que a ulceração dos tumores mostrou forte correlação com tamanho tumoral e metástase em linfonodos. Kiupel (2017) explica que os tumores ulcerados, grandes e invasivos geralmente são malignos, entretanto não se deve descartar a possibilidade de malignidade em tumores que não demonstram essas características.

O tamanho médio das neoplasias do presente estudo (4,49 cm) foi maior que o observado por Pierini et al. (2019), que observaram tumores variando entre 0,5 a 10 cm, com média de 2 cm, fato que pode estar associado à demora na procura do tratamento. Assim como relatado por Reynolds et al. (2019), não houve correlação entre o tamanho tumoral e a graduação do tumor. Por outro lado, Natividade et al. (2014) descreveram que os tumores maiores apresentavam mais frequentemente alto grau histológico. A influência do tamanho do tumor no prognóstico do mastocitoma ainda é questionável e esta variável não é considerada na determinação do estadiamento da doença.

A graduação histológica revelou-se excelente fator capaz de prever o comportamento dos mastocitomas. Cães com mastocitomas de alto grau conforme Kiupel et al. (2011) apresentaram sobrevida menor do que cães com tumores de baixo grau e os cães com graduação III segundo Patnaik morreram mais cedo que os classificados como grau I e II.

Entretanto, não houve diferença estatística entre as sobrevidas dos graus I e II na classificação de Patnaik et al. (1984), assim como observado por Sabbatini et al. (2013) e Horta

et al. (2018). Neste sentido, recomenda-se a utilização da graduação proposta por Kiupel et al. (2011), que além de gerar menos discordância entre os observadores (SABATTINI et al., 2013), prevê melhor o comportamento do tumor.

A classificação proposta por Kiupel et al. (2011) não inclui o arranjo das células como fator prognóstico. Não obstante, neste estudo demonstrou-se correlação entre arquitetura e graduação histológica e entre arquitetura e índice mitótico, além de menor sobrevida nos animais com mastocitomas com células dispostas em ninhos. Horta et al. (2018) observaram resultados semelhantes e sugerem que a arquitetura tumoral seja incluída como critério de malignidade independente da graduação histológica.

Tumores com grau III e alto grau apresentavam índice mitótico maior ($r=0,351$ e $r=0,301$, respectivamente), o que valida a graduação histológica deste estudo, uma vez que o número de mitoses é utilizado como critério de graduação nas duas classificações. Thompson et al. (2011) avaliando mastocitomas subcutâneos, também destacaram o índice mitótico como bom fator prognóstico. Entretanto, Romansik et al. (2007) afirmaram que animais com alto índice mitótico apresentam sobrevida menor, independente da graduação histológica. Um fator que pode interferir na avaliação do número de mitoses e sua correlação com grau é a escolha dos campos para avaliação e, neste sentido, Bertram et al. (2020) recomendam melhor padronização da seleção dos campos para avaliação mitótica, uma vez que esta escolha é feita de maneira subjetiva.

Além da diferenciação celular, Patnaik et al. (1984) descrevem a presença de necrose e hemorragia como critérios de malignidade. No presente estudo, foi observada apenas associação fraca entre hemorragia e graduação de Patnaik ($r=0,190$) e esses fatores não foram associados à morte dos animais. De semelhante modo Horta et al. (2018) não observaram correlação entre esses achados, todavia descreveram relação significativa entre necrose e índice mitótico, que é um fator prognóstico.

A quantidade de eosinófilos, que era empregada como fator de malignidade na graduação conforme Patnaik et al. (1984), não é utilizada como parâmetro de malignidade na graduação segundo Kiupel et al. (2011). Assim como no presente estudo, Natividade et al. (2014) descrevem que a quantidade de eosinófilos não é fator prognóstico, uma vez que não influencia na sobrevida dos animais. Além da ausência de interferência na sobrevida, a quantidade de eosinófilos mostrou fraca correlação com a arquitetura ($r=0,338$) e extensão tumorais ($r=0,221$) e número de mitoses ($r=0,190$), esses sim bons fatores prognósticos.

A avaliação das margens nos cortes histológicos foi prejudicada neste estudo, pois somente nove amostras puderam ter as margens adequadamente avaliadas e os dados foram insuficientes para serem incluídos na avaliação da sobrevida. A importância das margens cirúrgicas no mastocitoma canino é muito discutida. Selmic e Rupple (2020), em uma ampla revisão a respeito de margens cirúrgicas em mastocitomas, afirmam que a margem não pode ser considerada um fator prognóstico isoladamente, devendo também ser levado em conta o grau e o tamanho do tumor.

Uma das dificuldades na avaliação das margens é a diferenciação entre mastócitos neoplásicos de não neoplásicos. Kiupel (2017) e Sledge et al. (2016) afirmam não haver um método confiável para diferenciar mastócitos inflamatórios e neoplásicos, não sendo identificados até o momento marcadores confiáveis. Kiupel (2017) afirma que em tumores não encapsulados, a avaliação da margem é importante e destaca que a presença de até três mastócitos não deve ser considerada invasão neoplásica. Este mesmo autor ainda afirma que apesar de oncologistas e patologistas atribuírem muita importância à presença de células tumorais na margem para prever a recorrência, a avaliação histológica da margem não é baseada em um método de avaliação uniformemente aceito. Assim, estudos controlados com avaliação padronizada das margens são necessários para verificar o seu verdadeiro impacto sobre o prognóstico de cães com mastocitoma.

Apesar da ausência de correlação entre os parâmetros avaliados na análise multivariada, PREZIOSI et al. (2007) descreveram a invasividade do tumor e o número de mitoses como indicadores prognósticos independentes e Sledge et al. (2016) recomendam uma abordagem conjunta entre clínica, histopatologia e avaliação molecular para melhor definição quanto ao tratamento e ao prognóstico do animal.

Conclusão

Concluiu-se que nos mastocitomas caninos: a ulceração do tumor e a idade do animal influenciam na ocorrência de morte; a quantidade de eosinófilos, a extensão tumoral e a quantidade de mitoses apresentam correlação com a arquitetura tumoral; a ocorrência de hemorragia está associada à graduação segundo Patnaik et al. (1984); animais com tumores dispostos em ninhos são mais frequentemente classificados em alto grau e possuem menor sobrevida; a sobrevida é menor em cães com neoplasias com alto índice mitótico e graduação histológica 3 segundo Patnaik et al. (1984) e alto grau segundo Kiupel et al. (2011). Sugere-se, então, que a arquitetura tumoral e o índice mitótico sejam avaliados juntamente com a graduação histológica para melhor avaliação prognóstica.

REFERÊNCIAS

- BERLATO, D. et al. Comparison of mitotic index and Ki67 index in the prognostication of canine cutaneous mast cell tumours. **Veterinary and comparative oncology**, v. 13, n. 2, p. 143-150, 2015.
- BERTRAM, C. A. et al. A large-scale dataset for mitotic figure assessment on whole slide images of canine cutaneous mast cell tumor. **Scientific Data**, v. 6, n. 1, p. 1-9, 2019.
- BLACKWOOD, L. et al. European consensus document on mast cell tumours in dogs and cats. **Veterinary and comparative oncology**, v. 10, n. 3, p. e1-e29, 2012.
- BOSTOCK, D. E. et al. Nucleolar organiser regions as indicators of post-surgical prognosis in canine spontaneous mast cell tumours. **British Journal of Cancer**, v. 59, n. 6, p. 915-918, 1989.
- COSTA, M. C. et al. Prevalence and epidemiological and histopathological features of canine cutaneous mast cell tumours in Uberlândia, Brazil. **Acta Veterinaria Brno**, v. 86, n. 2, p. 189-193, 2017.
- DOBSON, J. M.; SCASE, T. J. Advances in the diagnosis and management of cutaneous mast cell tumours in dogs. **Journal of Small Animal Practice**, v. 48, n. 8, p. 424-431, 2007.
- FURLANI, J.M.; et al. Mastocitoma canino: estudo retrospectivo. **Ciência Animal Brasileira**, v.9, p.242-250, 2008.
- HORTA, R. S. et al. Assessment of canine mast cell tumor mortality risk based on clinical, histologic, immunohistochemical, and molecular features. **Veterinary pathology**, v. 55, n. 2, p. 212-223, 2018.
- 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.
- KIUPEL, M. Mast Cell Tumors in Meuten D: Tumors in Domestic Animals (176-195). 2017.
- KLUTHCOVSKY, L. C. et al. Comparison of Two Different Vinblastine Dosages for Treatment of Cutaneous Mast Cell Tumor in Dogs. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 48, 2020.
- KOK, M. K. et al. Retrospective study of canine cutaneous tumors in Japan, 2008–2017. **Journal of Veterinary Medical Science**, p. 19-0248, 2019.
- MURPHY, S. et al. Effects of stage and number of tumours on prognosis of dogs with cutaneous mast cell tumours. **Veterinary Record**, v. 158, n. 9, p. 287-291, 2006.
- NATIVIDADE, F. S. et al. Análise de sobrevida e fatores prognósticos de cães com mastocitoma cutâneo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n. 9, p. 874-884, 2014.

NORTHRUP, N. C. et al. Variation among pathologists in the histologic grading of canine cutaneous mast cell tumors with uniform use of a single grading reference. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 17, n. 6, p. 561-564, 2005.

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, n. 5, p. 469-474, 1984.

PIERINI, A. L. et al. Epidemiology of Breed-Related Mast Cell Tumour Occurrence and Prognostic Significance of Clinical Features in a Defined Population of Dogs in West-Central Italy. **Veterinary Sciences**, v. 6, n. 2, p. 53, 2019.

PREZIOSI, R.; SARLI, G.; PALTRINIERI, M. Multivariate survival analysis of histological parameters and clinical presentation in canine cutaneous mast cell tumours. **Veterinary research communications**, v. 31, n. 3, p. 287-296, 2007.

REYNOLDS, B. D. et al. Patient and tumour factors influencing canine mast cell tumour histological grade and mitotic index. **Veterinary and comparative oncology**, v. 17, n. 3, p. 338-344, 2019.

ROMANSIK, E. M. et al. Mitotic index is predictive for survival for canine cutaneous mast cell tumors. **Veterinary pathology**, v. 44, n. 3, p. 335-341, 2007.

SABATTINI, S. et al. Histologic grading of canine mast cell tumor: is 2 better than 3?. **Veterinary pathology**, v. 52, n. 1, p. 70-73, 2015.

SCASE, T. J. et al. Canine mast cell tumors: correlation of apoptosis and proliferation markers with prognosis. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 20, n. 1, p. 151-158, 2006.

SELMIC, L. E.; RUPLE, A. A systematic review of surgical margins utilized for removal of cutaneous mast cell tumors in dogs. **BMC veterinary research**, v. 16, n. 1, p. 1-6, 2020.

SHOOP, S. J.W. et al. Prevalence and risk factors for mast cell tumours in dogs in England. **Canine Genetics and Epidemiology**, v. 2, n. 1, p. 1, 2015.

SLEDGE, D. G.; WEBSTER, J.; KIUPEL, M. Canine cutaneous mast cell tumors: A combined clinical and pathologic approach to diagnosis, prognosis, and treatment selection. **The Veterinary Journal**, v. 215, p. 43-54, 2016.

ŚMIECH, A. et al. Epidemiological assessment of the risk of canine mast cell tumours based on the Kiupel two-grade malignancy classification. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 60, n. 1, p. 70, 2018.

STREFEZZI, R. De F.; XAVIER, J. G.; CATAO-DIAS, J. L. Morphometry of canine cutaneous mast cell tumors. **Veterinary Pathology**, v. 40, n. 3, p. 268-275, 2003.

SUEPAUL, R. et al. A review of neoplastic and non-neoplastic canine skin tumours in Trinidad from 2010-2015. **Braz J Vet Pathol**, v. 12, n. 2, p. 41-47, 2019.

THOMPSON, J. J. et al. Canine subcutaneous mast cell tumor: characterization and prognostic indices. **Veterinary pathology**, v. 48, n. 1, p. 156-168, 2011.

WARLAND, J.; DOBSON, J. Breed predispositions in canine mast cell tumour: a single centre experience in the United Kingdom. **The Veterinary Journal**, v. 197, n. 2, p. 496-498, 2013.

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.

CAPÍTULO 3

Artigo a ser submetido no periódico BMC Cancer

TAMANHO E LOCALIZAÇÃO TUMORAIS, GRAU HISTOLÓGICO, AGNOR E EXPRESSÃO DE C-KIT E KI67 COMO FERRAMENTAS PARA DETERMINAÇÃO DO PROGNÓSTICO EM MASTOCITOMAS CUTÂNEOS CANINOS

Lígia Fernandes Gundim^{1*}, Talita Cristina Modesto¹, Igor de Paula Castro¹, Lígia Assunção Oliveira², Alessandra Aparecida Medeiros-Ronchi¹

¹Laboratório de Patologia Animal, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG

*e-mail: ligiagundim@gmail.com

Antecedentes: Apesar dos diversos estudos sobre fatores de prognóstico para o mastocitoma canino (MCT) a tomada de decisão quanto às medidas terapêuticas para o paciente permanece desafiadora frente ao comportamento heterogêneo do MCT. O Objetivo deste estudo foi avaliar o valor prognóstico da imunoexpressão de c-KIT e Ki-67, contagem de AgNOR, graduação histológica, localização e tamanho dos MCT.

Métodos: Foram utilizados 91 cães afetados por MCT cutâneo e coletadas informações sobre localização e tamanho. Amostras do tumor foram testadas por imuno-histoquímica para expressão de KI67 e C-KIT e determinado o grau histológico e número de regiões argirofílicas nucleolares (AgNOR). Teste Qui-quadrado foi utilizado para verificação da associação entre as variáveis e a sobrevida global (SG) dos pacientes foi estimada pela curva de Kaplan-Meier seguido pelo teste de Log-Rank.

Resultados: Os animais com mastocitoma baixo grau apresentaram sobrevida maior que os cães com tumor de alto grau ($p=0,003$). Os cães com tumores grau III apresentaram sobrevida menor do que os de grau I e II ($p=0,002$), assim como aqueles classificados em grau II alto grau e grau III alto grau ($p=0,002$). Os animais com mastocitoma com baixa contagem de AgNORs apresentaram sobrevida maior do que os cães com alta contagem ($p=0,022$), assim como os animais com baixo índice KI67 ($p=0,003$) e baixo índice Ag67 ($0,006$). Houve também associação entre padrão KIT e sobrevida ($p=0,017$), sendo que os cães com mastocitomas padrão kit I e III apresentaram sobrevida maior. A expressão de c-KIT membranosa possui menor contagem de AgNOR ($p=0,043$). Não houve correlação entre as variáveis na análise multivariada.

Conclusões: A associação de dois sistemas de graduação histológica prova seu valor prognóstico, em especial nos MCTs de grau II, assim como a utilização combinada de marcadores de proliferação (Ki67 e AgNOR) foi útil no reconhecimento de tumores agressivos. A marcação citoplasmática focal de C-kit está relacionada a pior prognóstico. Estudos

posteriores devem ser executados para indicar a melhor combinação de testes na determinação do prognóstico de cães com MCTs,

Palavras-chave: cão, mastócitos, sobrevida, marcadores prognósticos, imuno-histoquímica, proliferação celular, graduação.

Introdução

O mastocitoma cutâneo canino é uma das neoplasias mais comuns em cães, sendo responsável por 20% de todos os tumores de pele (KIUPEL e CAMUS, 2019; BERLATO et al., 2021; GRAF et al., 2018). A forma de apresentação mais comum são massas localizadas, porém pode-se apresentar como tumores metastáticos (KIUPEL et al., 2011; SABATTINI et al., 2015, BROCKS et al., 2021).

O fator prognóstico mais utilizado para avaliar os mastocitomas é a graduação histológica segundo Patnaik, Ehler e Macewen (1984) e Kiupel et al. (2011). No entanto, nenhum parâmetro isolado pode com precisão prever o comportamento biológico dos MCTs em cães (CASANOVA et al., 2021). Nesse sentido, vários métodos para determinação do comportamento dos MCTs têm sido estudados para melhorar o prognóstico (SCARPA; SABATTINI; BETTINI, 2014; CAMUS et al., 2016, KIUPEL et al., 2004, WEBSTER et al., 2007, TAKEUCHI et al., 2013, THOMPSON et al., 2011; KIUPEL et al., 2005, ROMANSIK et al., 2007, ELSTON et al., 2009).

Dentre os fatores prognósticos, destacam-se aqueles que avaliam a proliferação celular, sendo a avaliação de regiões nucleolares com prata (AgNOR) e a imunomarcagem para Ki67 os mais utilizados em mastocitomas. Uma vez que os dois marcadores refletem fases diferentes do ciclo de proliferação celular, podem ser utilizados em conjunto na tentativa de melhor avaliação prognóstica.

Além dos fatores de proliferação, a imunomarcagem do receptor c-KIT (KIT ou agrupamento de diferenciação CD117) tem sido utilizada para avaliação preditiva e prognóstica de mastocitomas, uma vez que a localização da imunomarcagem possui associação com a sobrevida e pode ser usada para seleção de pacientes elegíveis para a terapia com inibidores de tirosina-quinase (HORTA et al., 2018; FREYTAG et al., 2021).

Porém, mesmo com diversos estudos abordando fatores de prognóstico para o MCT, a tomada de decisão quanto às medidas terapêuticas para o paciente permanece desafiadora para o profissional de pequenos animais (WARLAND et al., 2015), mostrando a necessidade de novos estudos para validação destes fatores prognósticos. Sendo assim, este estudo avaliou o valor prognóstico da imunoexpressão de c-KIT e Ki-67, contagem de AgNOR, graduação

histológica, localização e tamanho dos mastocitomas cutâneos caninos, além de verificar a correlação entre as variáveis selecionadas.

Métodos

Amostras

Foram selecionados casos de mastocitoma cutâneo canino diagnosticados no Laboratório de Patologia Animal do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia, no período de janeiro de 2016 a junho de 2019. Os critérios de inclusão no estudo foram: cães portadores de mastocitoma diagnosticados a partir de avaliação histopatológica, que haviam realizado biópsia excisional. Foram excluídos os casos diagnosticados apenas exame citopatológico ou biópsia incisional e cães que foram submetidos à quimioterapia após a exérese cirúrgica. Para realização dos exames imuno-histoquímicos, foram utilizados apenas os blocos de parafina que continham material suficiente para secção.

Todos os cães selecionados passaram por tratamento cirúrgico com excisão total dos tumores, com margem de 3 cm em dois planos e remoção de um plano fáscial profundo ao tumor. Todos os casos tiveram a anuência dos proprietários para o uso experimental das amostras de mastocitoma e informações clínicas dos cães.

Dados epidemiológicos (idade, sexo, raça) e clínicopatológicos (localização e tamanho do tumor) foram coletados. Quanto à idade, os cães foram agrupados em: jovens (até 1 ano), adultos (1 a 8 anos) e idosos (acima de 8 anos). As localizações consideradas foram: membros, tronco (incluindo cabeça, cauda, abdome, tórax, flanco e dorso) e região genital (incluindo região do escroto, vulva, períneo, prepúcio e inguinal). Conforme o tamanho, os tumores foram classificados de acordo com Organização Mundial da Saúde adaptado por Horta et al. (2018).

Análise Histológica

O exame histopatológico foi realizado sob microscopia de luz e os tumores foram classificados segundo o grau utilizando ambos os sistemas de classificação sugeridos por Patnaik, Ehler e Macewen (1984) e por Kiupel et al. (2011), seguindo as recomendações do American College of Veterinary Pathologists e Veterinary Cancer Society (BERLATO et al., 2021) e Nardi et al. (2022). O grau do tumor foi avaliado de forma independente por três patologistas, sendo adotado o grau atribuído por pelo menos dois patologistas.

Técnica de AgNOR

Secções de 4mm foram obtidas a partir dos blocos de parafina e colocadas em lâminas silanizadas. As lâminas foram desparafinizadas e re-hidratadas em concentrações seriadas de álcool. Os cortes foram incubados ao abrigo de luz em câmara úmida durante 40 minutos em solução de nitrato de prata conforme Ploton (1986). As amostras foram lavadas em água destilada e imersas em tiosulfato de sódio a 5% durante 5 minutos. Em seguida, foram colocadas em solução de metabissulfito de sódio 5% por 5 minuto e procedeu-se o processamento histopatológico rotineiro das lâminas.

A contagem das regiões nucleolares com prata (AgNOR) foi realizada observando os pontos de coloração negra no interior dos nucléolos em microscópio óptico na objetiva de imersão com aumento de 100 x. Em cada lâmina foram selecionados 10 campos com maior marcação e foram contadas 10 células/campo, totalizando 100 células, obtendo-se a média do número de regiões organizadoras de nucléolo (WEBSTER et al., 2007). Os mastocitomas foram agrupados de acordo com a média de AgNOR em <1,7, entre 1,7 e 3,2 e >3,2, conforme Bostock et al. (1989).

Técnica imuno-histoquímica

Secções de 4mm foram obtidas a partir dos blocos de parafina e colocadas em lâminas silanizadas. As lâminas foram desparafinizadas e re-hidratadas em concentrações seriadas de álcool. A recuperação antigénica foi realizada em panela de pressão por 15 minutos em citrato pH 6,0. O bloqueio da peroxidase foi feito com imersão em peróxido de hidrogénio 3% por 20 minutos. Os anticorpos primários CD117 (anticorpo policlonal, CD117, c-KIT, Spring Bioscience®) e Ki67 (anticorpo monoclonal, anti Ki67 humano, Clone MIB-1, Dako Cytomation®) foram incubados a 4° C por 18 horas. Após incubação, utilizou-se a técnica de estreptavidina-biotina-peroxidase (Dako, K069011). A reação foi revelada com diaminobenzidina (Diaminobenzina, Dako- K3468-1) e as lâminas contra coradas com hematoxilina de Harris e montadas. Para controle positivo de c-KIT (CD117) foi utilizada amostra de mastocitoma sabidamente positiva e para Ki67, utilizou-se amostra de linfonodo reativo.

O padrão de imunomarcção para c-KIT foi avaliada em imunoexpressão membranosa (Padrão I), citoplasmática focal (Padrão II) ou citoplasmática difusa (Padrão III), conforme Webster et al. (2004). Para avaliação do índice de Ki-67, realizou-se o escaneamento das lâminas no aumento de 100x. Após a identificação de áreas com imunoexpressão, colocou-se uma grade quadriculada de 10x10mm sobre a imagem e contou-se o número de células positivas

em 5 campos e foi feita a média dos campos. Os casos foram então agrupados de acordo com o número médio de células que expressam Ki67 (baixo índice de proliferação: ≤ 23 células e alto índice de proliferação: >23 células por campo de maior aumento) (WEBSTER et al., 2007).

Foi calculado ainda o índice Ag67, multiplicando-se as taxas de AgNOR e Ki67, segundo Webster et al., (2007) e os tumores foram agrupados em: $Ag67 \leq 54$ e $Ag67 >54$.

Avaliação da sobrevida

Os cães foram acompanhados por no mínimo 12 meses após a cirurgia, através de consultas periódicas realizadas no HV-UFU ou por contato telefônico com o tutor. O tempo desde o tratamento cirúrgico até a morte foi utilizado para o cálculo da sobrevida global. Os animais que não puderam ser acompanhados foram censurados do estudo.

Análise estatística

Os dados foram analisados utilizando estatística descritiva, sendo realizado ainda o teste Qui-quadrado para verificação da associação entre as variáveis: padrão de imunoexpressão c-KIT, imunomarcagem para Ki67, contagem de AgNOR, grau histológico e tamanho tumoral.

A sobrevida global (SG) dos pacientes foi estimada pela curva de Kaplan-Meier seguido pelo teste de Log-Rank para comparação das curvas de sobrevida. A SG foi avaliada de acordo com as variáveis tamanho e localização do tumor, média de AgNOR, padrão de imunoexpressão para c-KIT, imunoexpressão Ki67 e índice Ag67. Na análise da SG foram censurados os cães que ainda estavam vivos.

A influência concomitante das variáveis prognósticas na SG foi investigada por meio de análise multivariada por regressão de Cox. Os testes foram realizados com o programa do Software Statistics Base para Windows V.20 (IBM® SPSS®), com nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

Resultados

Dados clínicos

Foram avaliados 91 animais com mastocitoma, sendo 60 fêmeas, 28 machos e em três prontuários não havia informação quanto ao sexo do animal. A idade do animal constava em 79 fichas, sendo 38 adultos (48,10%) e 41 (51,90%) idosos. Foi possível acessar o tamanho das neoplasias de 76 animais, nos quais observou-se variação entre 0,2 cm a 25 cm, com tamanho médio de 5 cm. As localizações mais comuns foram membros e abdome, representando 23,46% (19/81) cada uma (Tabela 1).

Tabela 1 - Correlações entre sobrevida e parâmetros clínico-patológicos, histopatológicos, histoquímicos, imuno-histoquímicos em cães com mastocitoma cutâneo, Uberlândia- MG, 2022.

(continua)

	N	%	Sobrevida	Média sobrevida	P-valor
Tamanho (n=76)					
T1	14	18,42%	964	740	0,14
T2	37	48,68%	550		
T3	25	32,89%	-		
Localização (n=71)					
Membros	19	26,76%	-	-	-
Abdome	19	26,76%	-		
Genital	12	16,90%	-		
Tórax	8	11,27%	-		
Cabeça	8	11,27%	-		
Demais localizações	5	7,04%	-		
AgNORs (n=45)					
< 1,7 AgNORs/célula	1	2,22%	-	649	0,022
1,7 - 3,2 AgNORs/célula	39	86,67%	712		
> 3,2 AgNORs/célula	5	11,11%	199		
Ki67 (n=28)					
Baixo índice	20	71,43%	719	556	0,003
Alto índice	8	28,57%	188		
Ag67 (n=23)					
≤ 54	15	65,22%	769	567	0,006
>54	8	34,78%	188		
Ckit (n=40)					
Padrão 1	25	62,50%	850	747	0,017
Padrão 2	11	27,50%	293		
Padrão 3	4	10,00%	753		
Kiupel (n=91)					
Baixo Grau	59	64,84	973	756	0,003
Alto Grau	32	35,16	395		
Patnaik (n=91)					
Grau 1	19	20,88	919	756	0,002
Grau 2	60	65,33	747		
Grau 3	12	13,19	206		

Tabela 1 - Correlações entre sobrevida e parâmetros clínico-patológicos, histopatológicos, histoquímicos, imuno-histoquímicos em cães com mastocitoma cutâneo, Uberlândia- MG, 2022.

(conclusão)

	N	%	Sobrevida	Média sobrevida	P-valor
Kiupel/Patnaik (n=91)					
Grau 1/ baixo grau	19	20,88	919		
Grau 2/ baixo grau	39	42,86	883		
Grau 2/ alto grau	21	23,08	496	756	0,002
Grau 3/ baixo grau	1	1,1	-		
Grau 3/ alto grau	11	12,09	206		

Avaliação histológica, histoquímica e imuno-histoquímica

Com relação ao grau histológico, 64,84% (59/91) dos MCT eram baixo grau, 65,33% (60/91) grau II e 42,86% (39/91) grau II/baixo grau (Tabela 1). A média de contagem de AgNOR foi de 2,71 AgNORs/célula (Figura 1) e apenas um MCT apresentava média <1,7 AgNOR/célula (2,22%) (Tabela 1).

No caso da imunoexpressão de Ki67, a média de células marcadas/campo de maior aumento foi de 17, sendo que 71,43% apresentavam baixo índice de proliferação e 25,57% apresentavam alto índice (Figura 1). Já na avaliação de c-KIT, 62,50% dos MCT apresentavam padrão de imunomarcacão membranosa, 27,50% imunomarcacão citoplasmática focal e 10% citoplasmática difusa (Figura 1).

Na análise da associação entre as variáveis estudadas, o teste Qui-quadrado indicou associação entre a expressão de c-KIT e contagem de AgNOR ($p=0,043$), sendo que mastocitomas com padrão de imunomarcacão para c-KIT membranosa (Padrão I) possuem menor contagem de AgNOR.

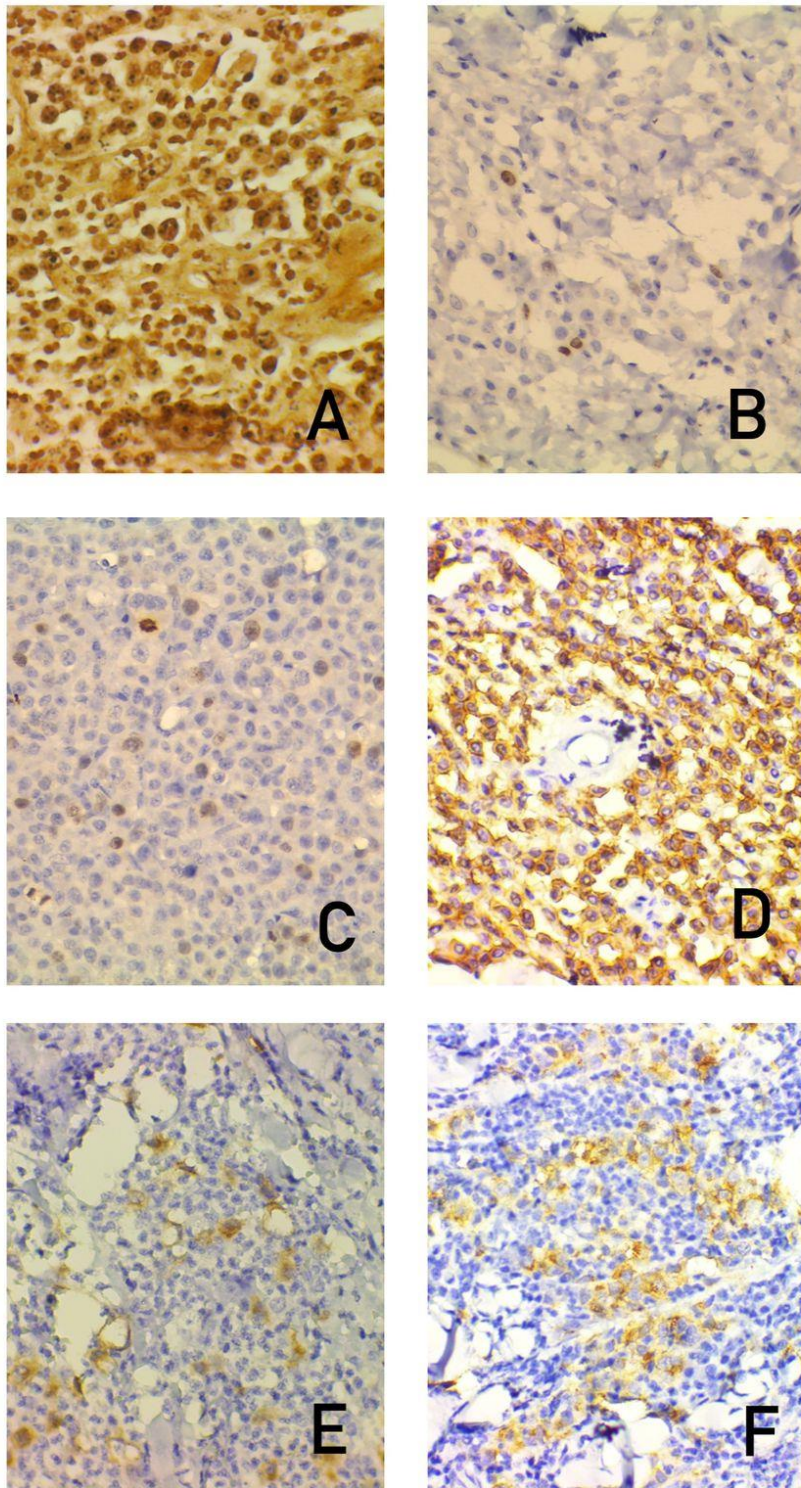


Figura 1 – Mastocitoma cutâneo canino, cão, pele. A) Técnica de AgNOR. Observar pontos enegrecidos no núcleo das células. B) Imunomarcção para Ki67, baixo índice proliferativo. C) Imunomarcção para Ki67, baixo índice proliferativo. D, E e F – Imunoexpressão de CKIT. D) Padrão 1, E) Padrão 2 e F) Padrão 3

Análise de sobrevida

O tempo médio de seguimento de 36 pacientes foi de 500 dias, a média de sobrevida global dos cães com mastocitoma foi de 756 dias e a mediana de 604 dias.

Quanto à localização, apesar da análise de Log Rank não ter indicado diferença na curva de sobrevida de acordo com o local de ocorrência do MCT ($p=0,636$), cães com MCT na região genital não alcançaram a mediana de sobrevida global que foi de 570 dias. A sobrevida média foi de 606, 710 e 468 dias para as localizações membros, tronco e região genital, respectivamente (Figura 2).

Da mesma forma, apesar da análise de Log Rank não ter indicado diferença na curva de sobrevida de acordo com o tamanho do MCT ($p=0,138$), cães com MCT $\geq 3,0$ cm não alcançaram a mediana de sobrevida global dos animais deste grupo que foi de 604 dias. A sobrevida média foi de 963 e 549 dias para cães com MCT menores de 3,0 cm e $\geq 3,0$ cm, respectivamente (Figura 2).

Na análise da sobrevida de cães com MCT de acordo com a graduação histológica, teste de Log Rank indicou diferença nas curvas de sobrevida tanto na classificação segundo Patnaik, Ehler e MacEwen (1984) ($p=0,002$) quanto nas classificações de Kiupel et al. (2011) ($p=0,003$) e na classificação combinada ($p=0,002$). A mediana de sobrevida global dos animais avaliados quanto ao grau histológico foi de 604 dias e cães com MCT grau III segundo Patnaik, Ehler e MacEwen (1984) não atingiram a mediana e viveram menos que os classificados como graus I e II ($p=0,02$) (Figura 2). De modo semelhante, os animais com MCT classificados como alto grau de Kiupel não atingiram a mediana e viveram menos do que aqueles com MCT de alto grau ($p=0,03$) (Figura 2).

Quando as duas classificações foram combinadas, os animais com MCT classificados como grau II/alto grau e grau III/alto grau não atingiram a mediana e viveram menos que aqueles com MCT grau I/baixo grau e grau II/baixo grau ($p=0,002$) (Figura 3) (Tabela 1).

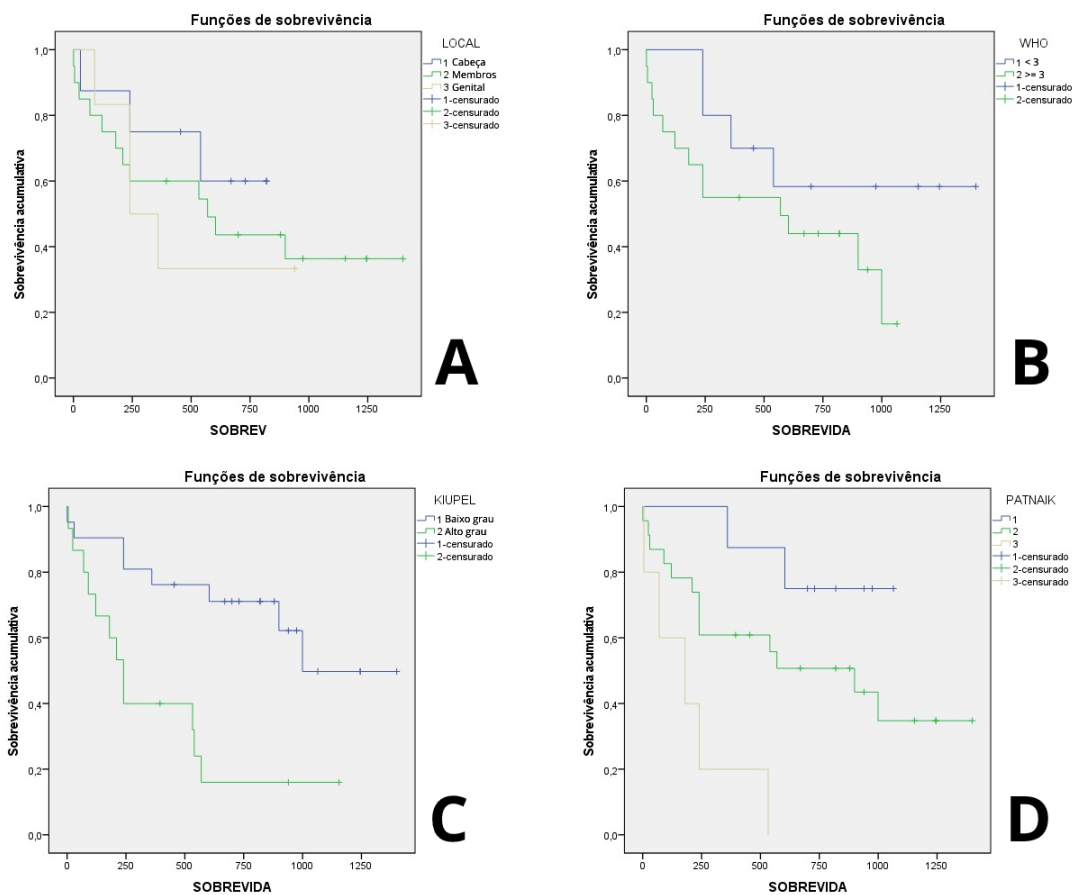


Figura 2 – Curvas de sobrevida de cães com mastocitoma cutâneo. A) Local. Os animais com tumores em genitais não atingem a média de sobrevida B) Tamanho. Cães com tumores >3cm não atingem a média de sobrevida. C) Graduação segundo Kiupel et al., (2011). Cães com tumores baixo grau apresentam sobrevida maior do que os de alto grau. D) Graduação segundo Patnaik, Ehler e Macewen (1984), animais com neoplasias grau III demonstram sobrevida menor que animais com grau I e II. Uberlândia, 2022.

Na análise da sobrevida de cães com MCT de acordo com número de AgNOR, teste de Log Rank indicou diferença nas curvas de sobrevida de cães com MCT que apresentavam média >3,2 AgNORs/célula ($p=0,022$). A mediana de sobrevida global dos animais avaliados quanto número de AgNOR foi de 360 dias e cães com MCT que apresentavam média >3,2 AgNORs/célula não atingiram a mediana e viveram menos que aqueles com MCT que apresentavam média de 1,7 a 3,2 AgNORs/célula (Figura 3) (Tabela 1).

Na avaliação da variável KI67, teste de Log Rank indicou diferença nas curvas de sobrevida, sendo que cães com MCT que apresentavam alta taxa de proliferação (>23 células) viveram menos ($p=0,003$). A mediana de sobrevida global dos animais avaliados quanto à imunoe expressão de Ki67 foi de 360 dias (Tabela 1).

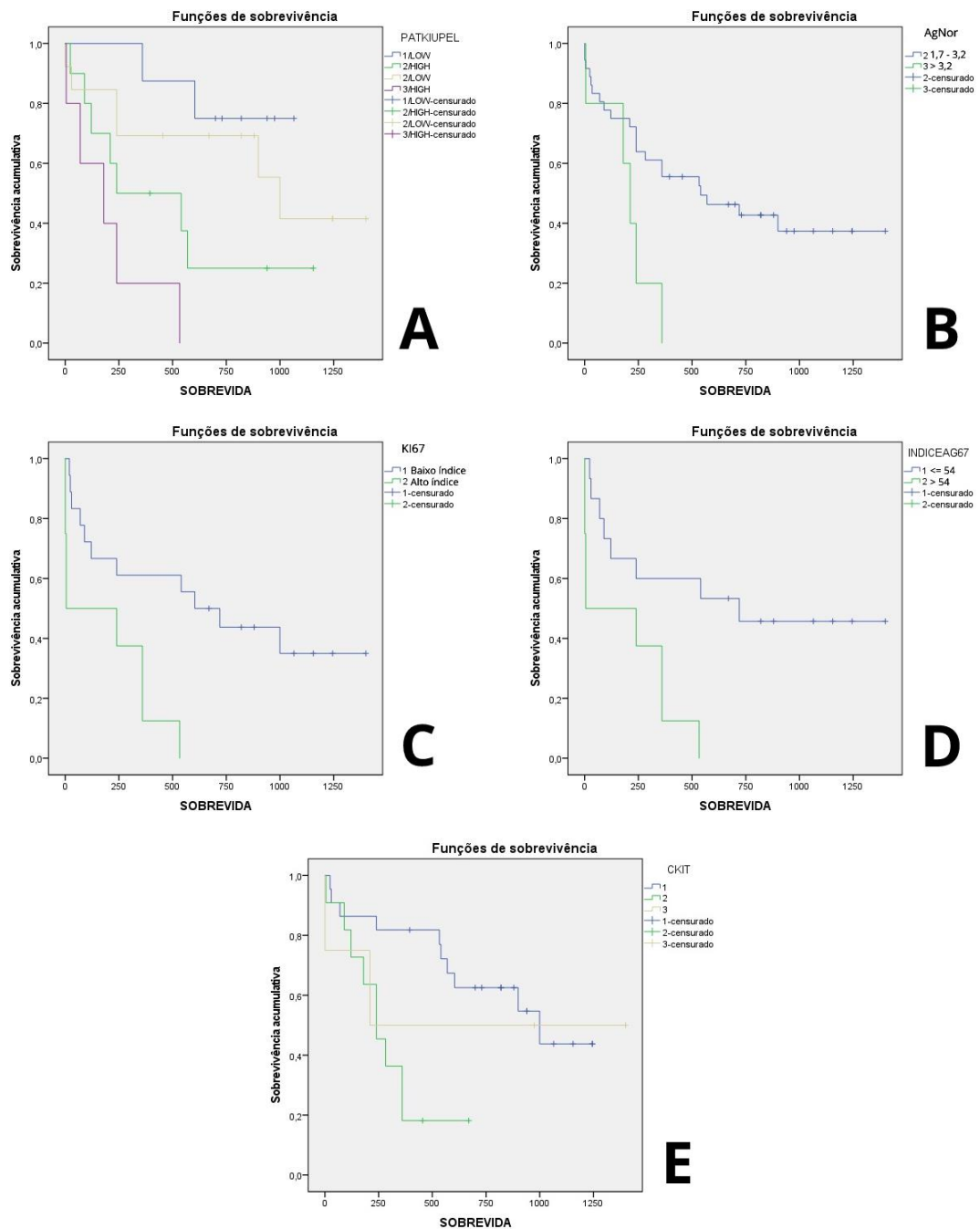


Figura 3. A) Associação entre as graduações de Patnaik e Kiupel. Cães com tumores grau II alto grau e grau III alto grau vivem menos que aqueles classificados como alto grau. B) AgNOR. Animais com tumores com alto número de AgNOR apresentam menor sobrevida C) KI67. Animais com alto índice KI67 não atingem a mediana e vivem menos que os animais com baixo índice D) Índice Ag67. Cães com tumores baixo índice Ag67 apresentam sobrevida maior que animais com alto índice. E) CKIT. Animais com padrão II de KIT não atingem a mediana e vivem menos que os demais. Uberlândia, 2022.

Avaliou-se ainda a sobrevida de cães com MCT de acordo com índice Ag67 (produto das taxas de AgNOR e Ki67). Teste de Log Rank indicou diferença nas curvas de sobrevida, sendo que cães com MCT que apresentavam índice Ag67 >54 viveram menos ($p=0,006$) (Tabela 1) (Figura 3).

Com relação à imunoexpressão de c-KIT, teste de Log Rank indicou diferença nas curvas de sobrevida, sendo que cães com MCT que apresentavam padrão de expressão citoplasmática focal (Padrão II) viveram menos ($p=0,017$).

A mediana de sobrevida global dos animais avaliados quanto à imunoexpressão de c-KIT foi de 604 dias e cães com MCT com padrão de expressão citoplasmática focal não atingiram a mediana e viveram menos (Figura 3). (Tabela 1)

Durante o período médio de acompanhamento de 505 dias (intervalo 1-1400), foi possível acompanhar a evolução clínica de 17 animais que possuíam todos os dados relativos às variáveis estudadas. A influência concomitante das variáveis prognósticas na SG foi investigada por meio de análise multivariada por regressão de Cox que indicou não haver correlação entre as variáveis analisadas (Tabela 2).

Tabela 2. Análise multivariada de regressão de Cox da sobrevida total de cães com mastocitoma cutâneo em comparação às variáveis preditoras. Uberlândia, 2022.

Variáveis	Erro Padrão	p-valor	Taxa de risco	IC (95%)
c-KIT	0,676	0,066	3,456	0,919 – 12,991
KI67	1,342	0,548	2,237	0,161 – 31,025
Patnaik	1,506	0,959	0,925	0,048 – 17,696
Kiupel	1,244	0,051	11,297	0,986 – 129,429
Grau combinado	2,461	0,838	1,655	0,013 – 205,924

$P < 0,05$ é considerado significante.

Discussão

Os mastocitomas ocorreram mais comumente em fêmeas (68,18%). De modo semelhante, Souza et al. (2018), em estudo também realizado no Brasil, descreveram frequência maior de fêmeas. Este dado provavelmente é reflexo da composição da população atendida no HV-UFU, uma vez que a maioria dos animais atendidos são fêmeas.

Quanto à idade, todos os animais eram adultos ou idosos e animais jovens não apresentaram mastocitoma. Apesar de Miller (1995) descrever que em cães da raça Shar Pei, o mastocitoma é frequente em animais com menos de dois anos, a maioria dos estudos relatam

que o risco de ocorrência é maior em cães de idade avançada (THAMM e VAIL, 2008; SHOOP et al., 2015; SMIECH et al., 2019).

Membros e abdome foram as localizações mais comuns de mastocitoma neste estudo. Horta et al. (2018) também descreveram os membros como a principal localização de mastocitomas, além de tronco. Em outros estudos as localizações mais frequentes foram tronco e extremidades (WELLE et al., 2008), nariz e face (REYNOLDS et al., (2019) e escroto (SMIECH et al., 2018).

Não foi observada associação entre a localização do tumor e a graduação histológica neste estudo, ao contrário do que foi observado por Smiech et al. (2018) que afirmam que a pele do escroto apresenta maior risco de desenvolver mastocitoma de alto grau e Reynolds et al. (2019) que descrevem tumores em região de cabeça e inguinal com maiores chances de ser alto grau. Vale ressaltar que cães com MCT na região genital não alcançaram a mediana de sobrevida global, o que reforça a observação de Nelson e Couto (2015) que relataram que MCTs localizados na cavidade oral, leito ungueal e regiões inguinal, perineal e prepucial apresentam comportamento mais agressivo.

De modo semelhante ao observado no presente estudo, Kiupel et al. (2005), Poggiani et al. (2012) Horta et al. (2018) e Pierini et al. (2019) não observaram associação entre o tamanho do tumor e a sobrevida dos animais. No entanto, os cães com tumores maiores que 3 cm não alcançaram a mediana de sobrevida global, assim como descrito por Hume et al. (2011) que relataram que o tamanho do tumor é fator prognóstico em mastocitomas com grau III, uma vez que animais com tumores maiores que 3 cm apresentam menor tempo médio de sobrevida do que os que apresentam tumores menores que 3 cm. Neste estudo, os tumores apresentaram grande variação de tamanho (entre 0,2 e 25 cm), o que pode explicar a ausência de associação estatística do tamanho do tumor à graduação dos tumores e

sobrevida dos animais. Também não foi observada associação entre o tamanho e a graduação dos tumores, semelhante ao relatado por Reynolds et al. (2019), que não observaram correlação entre o tamanho tumoral e a graduação do tumor.

Na graduação segundo Kiupel et al. (2011), a maior parte dos tumores receberam baixo grau (64,84%), semelhantemente ao observado por Horta et al., (2018) e Sabatini et al. (2015). Estes animais apresentaram média de sobrevida maior do que os de baixo grau, como descrito por Kiupel et al. (2011), Sabattini et al. (2015) e Horta et al. (2018), confirmando a efetividade da metodologia proposta por Kiupel et al. (2011) para previsão do comportamento clínico dos animais com mastocitoma.

Os animais de grau I segundo Patnaik, Ehler e Macewen, (1984) apresentaram bom prognóstico (média de sobrevida: 919 dias), assim como descrito Patnaik, Ehler e Macewen (1984); Sabatini et al., (2015), Stefanello et al., (2015). A maioria dos tumores foram classificados como grau 2 (65,33%), como observado por outros autores (STEFANELLO et al., 2015; MEDEIROS-RONCHI et al., 2018; COSTA et al., 2017). Stefanello et al. (2015) e Kiupel et al. (2011) alertam que esta disparidade na distribuição entre as graduações pode afetar a avaliação prognóstica dos animais de grau II, entretanto neste estudo a média de sobrevida dos animais de grau II foi maior do que a dos animais de grau III e menor do que a dos animais de grau I.

Para melhor avaliação prognóstica das neoplasias com grau II, a associação entre as graduações de Kiupel et al. (2011) e Patnaik, Ehler e MacEwen (1984) tem sido recomendada por alguns autores (BERLATO et al., 2021; DE NARDI et al., 2022). Neste trabalho, os animais que apresentavam mastocitomas grau 2 e baixo grau, tiveram média de sobrevida superior aos que apresentavam grau 2 alto grau (884 e 496, respectivamente), confirmando os benefícios desta combinação de graduações para acurácia prognóstica.

Com respeito aos marcadores de proliferação, a maior contagem de AgNOR observada nesse estudo foi de 3,7, número inferior ao observado por Bostock et al. (1989) que relataram variação entre 1,1 a 8,1. Neste estudo, os animais que apresentavam maior contagem de AgNOR viveram menos, assim como no estudo realizado por Bostock et al. (1989) e Webster et al. (2007) que descreveram que a alta contagem de AgNOR está relacionada à menor sobrevida. Não obstante, não foi observada associação entre contagem de AgNOR e graduação, fato descrito por Bostock et al. (1989).

A maioria dos animais deste estudo possuíam baixo índice de Ki67 (71,4%), assim como no estudo realizado por Webster et al. (2007), onde 60,71% dos animais apresentavam <23 células marcadas por campo. Estes animais apresentaram sobrevida maior que os animais com alto índice de proliferação, assim como nos estudos realizados por Webster et al., (2007) e Berlato et al. (2015) os quais relatam que o índice Ki67 é fator de prognóstico independente, sendo capaz de identificar MCTs com pior prognóstico.

Uma das limitações deste estudo foi o pequeno número de amostras que expressaram Ki67. Fonseca-Alves et al. (2015) relataram a mesma dificuldade com este marcador, sendo que 49,27% das amostras de seu estudo precisaram ser descartadas pois não expressavam Ki67 na pele, que foi utilizada como controle positivo interno. Fatores pré-analíticos associados à fixação das amostras podem ter contribuído para a baixa reatividade, uma vez que amostras

fixadas em formol podem apresentar alteração na estrutura tridimensional das proteínas do epítopo, dificultando a marcação (RAMOS-VARA et al., 2008)

O índice Ag67 também foi capaz de prever o prognóstico dos cães com mastocitoma, semelhantemente ao observado por Webster et al. (2007) e Smith et al. (2017). A utilização deste índice justifica-se pois, apesar de ambos serem marcadores de proliferação, os índices de AgNOR e Ki67 sinalizam diferentes fases do ciclo celular (Kiupel et al., 2016). Devido à ausência de associação entre o índice e a graduação histológica observada no presente estudo, Oliveira et al. (2020) recomendam que a avaliação de marcadores de proliferação deve ser utilizada em conjunto à graduação histológica para uma caracterização mais completa dos tumores.

Os mastocitomas com padrão de imunomarcação para c-KIT membranosa apresentaram menor contagem de AgNOR. Carvalho et al. (2017) descreveram que os tumores localizados em genitais, na cabeça e no pescoço possuíam 18 vezes mais chance de apresentarem padrão KIT citoplasmático e tumores de alto grau têm 36 vezes mais chance, porém tal associação não foi observada neste estudo.

Giantin et al. (2012) afirmaram que a marcação perimembranosa indica um bom prognóstico e neste estudo os animais com esse padrão atingiram a mediana. Por outro lado, Horta et al. (2018) afirmaram que a imunomarcação citoplasmática difusa apresentava pior prognóstico, fato não observado nesse estudo, provavelmente devido ao pequeno número de animais agrupados nesta categoria.

Mutações do gene c-KIT provavelmente são a causa do aumento da proliferação celular em MCTs com expressão citoplasmática de CD117. Costa et al. (2007) sugerem que a translocação de CD117 para o citoplasma se correlaciona com a ativação da proliferação celular mediada por CD117. Embora o aumento da proliferação celular por si só seja insuficiente para a transformação neoplásica, pode contribuir para o fenótipo maligno aumentando o risco de mutações espontâneas. Estes mesmos autores relataram que não foram observadas diferenças entre os padrões de coloração citoplasmática focal e difusa, sugerindo que estes padrões representam alterações celulares semelhantes, ou talvez um processo progressivo de acúmulo de CD117 citoplasmático.

A despeito da ausência de correlação entre os parâmetros avaliados na análise multivariada, no estudo conduzido por Webster et al. (2007) maior imunoexpressão de Ki67 e alto índice de AgNOR foram significativamente associados à recidiva, metástase e morte relacionada ao tumor.

Conclusões

A graduação histológica incluindo dois sistemas de classificação (Patnaik e Kiupel) confirma seu valor prognóstico, particularmente para MCTs de grau intermediário (grau II), pois o uso desta variável identificou diferença na sobrevida entre MCT grau II de alto e baixo grau. Da mesma forma, a utilização combinada dos marcadores de proliferação celular Ki67 e as contagens médias de AgNOR se mostrou útil na identificação de tumores mais agressivos. A presença de marcação citoplasmática focal de c-KIT é associada a pior prognóstico e atenção deve ser direcionada para cães com MCT com este padrão de expressão de c-KIT, que podem ser beneficiados com terapia com inibidores de tirosina quinases. A análise multivariada dos fatores de prognóstico foi prejudicada pelo pequeno número amostral. Uma vez identificado neste estudo o valor prognóstico independente das variáveis estudadas, estudos com subconjunto maior de tumores devem ser realizados para determinar a melhor forma de usar esses testes em combinação na determinação do prognóstico de cães com MCT.

Agradecimentos

Agradecemos ao HOVET-UFU e Laboratório de Patologia Animal /HOVET por fornecer informações e amostras de cães com mastocitoma.

Financiamento

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

Declaração de conflito de interesses

Os autores declararam não ter conflitos de interesse com relação à autoria da publicação deste artigo.

REFERÊNCIAS

- BERLATO, D. et al. Comparison of mitotic index and Ki67 index in the prognostication of canine cutaneous mast cell tumours. **Veterinary and comparative oncology**, v. 13, n. 2, p. 143-150, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1111/vco.12029> Disponível em: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/vco.12029?casa_token=N3vzRoKFscUAAA:5iOnj4FEfOP4Ai2-ZayUV1n65q3I7ArI9C6NaywmZJILmprBbe3qmd20ltUT4cric87ZQ-q09sRPEqF. Acesso em: 6 mar. 2018.
- BERLATO, D. et al. Value, Limitations, and Recommendations for Grading of Canine Cutaneous Mast Cell Tumors: A Consensus of the Oncology-Pathology Working Group. **Veterinary Pathology**. [s.l.], v.58, n.5, p.858-863, 2021. DOI:10.1177/03009858211009785 Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/03009858211009785>. Acesso em: 01 jan 2022.
- BOSTOCK, D. E. et al. Nucleolar organiser regions as indicators of post-surgical prognosis in canine spontaneous mast cell tumours. **British journal of cancer**, v. 59, n. 6, p. 915-918, 1989. DOI: <https://doi.org/10.1038/bjc.1989.193>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/bjc1989193>. Acesso em: 8 de set. 2019.
- BROCKS, B.A.W. et al. Internal tandem duplication of exon 8 of c-kit is associated with longer total survival in canine cutaneous mast cell tumors. **Veterinary Pathology**, [s.l.], v.58, n. 2, p.315-324, March, 2021. DOI: 10.1177/0300985820973463. Disponível em: https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0300985820973463?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%20%20pubmed. Acesso em: 22 nov. 2021.
- CAMUS, M. S. et al. Cytologic criteria for mast cell tumor grading in dogs with evaluation of clinical outcome. **Veterinary pathology**, Madison, v.53, n.6, p. 1117-1123, 2016. DOI: 10.1177/0300985816638721. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/full/10.1177/0300985816638721>. Acesso em: 15 set. 2020.
- CARVALHO, A. P. M. et al. Comparison of two histopathological classifications with pattern of immunostaining KIT, evaluation of cell proliferation and the presence of mutations in c-KIT canine cutaneous mast cell tumors. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 37, p. 359-367, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2017000400010>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/pvb/a/QSZf5LgvBRDswgCxmzCzZqj/abstract/?format=html&lang=en>. Acesso em: 10 out. 2020.
- CASANOVA, M. et al. Stereology in Grading and Prognosis of Canine Cutaneous Mast Cell Tumors. **Veterinary pathology**, v. 58, n. 3, p. 483-490, 2021. DOI:10.1177/0300985820985138. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/full/10.1177/0300985820985138>. Acesso em 1 jan. 2022.
- COSTA, R. M. G et al. CD117 immunoexpression in canine mast cell tumours: correlations with pathological variables and proliferation markers. **BMC Veterinary Research**, v. 3, n. 1,

p. 1-7, 2007. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1186/1746-6148-3-19>. DOI: <https://doi.org/10.1186/1746-6148-3-19> Acesso em: 20 fev. 2022.

COSTA, M. C. et al. Prevalence and epidemiological and histopathological features of canine cutaneous mast cell tumours in Uberlândia, Brazil. **Acta Veterinaria Brno**, v. 86, n. 2, p. 189-193, 2017. DOI: <https://doi.org/10.2754/avb201786020189>. Disponível em: <https://actavet.vfu.cz/86/2/189/>. Acesso em: 10 jan. 2020.

DE NARDI, A. B. et al. Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine Cutaneous and Subcutaneous Mast Cell Tumors. **Cells**, v. 11, n. 4, p. 618, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/cells11040618>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2073-4409/11/4/618>. Acesso em: 20 fev. 2022.

ELSTON, L. B. et al. The importance of the mitotic index as a prognostic factor for survival of canine cutaneous mast cell tumors: a validation study. **Veterinary pathology**, v. 46, n. 2, p. 362-364, 2009. DOI: 10.1354/vp.46-2-362 11. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1354/vp.46-2-362>. Acesso em: 5 jan. 2020.

FONSECA-ALVES, C. E. et al. Ki67/KIT double immunohistochemical staining in cutaneous mast cell tumors from Boxer dogs. **Research in veterinary science**, v. 102, p. 122-126, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2015.08.007>. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0034528815300369?casa_token=7Hw8YxxE5zcAAAAA:M4cj7uGHR2MryPMYPNLmVe2kWS8gGbhMAiE3eRbbRI6GWxOMkMs4FXRJpCRhS-Bgz2hu3pzgZn8. Acesso em: 15 nov. 2020.

FREYTAG, J. O. et al. Prognostic value of immunohistochemical markers in canine cutaneous mast cell tumours: A systematic review and meta-analysis. **Veterinary and comparative oncology**, v. 19, n. 3, p. 529-540, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1111/vco.12692>. Disponível em: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/vco.12692?casa_token=xjCyQ8fZq2kAAAAA%3A712TCe-8okVSBwfw98QSz5L9zxEX8VDwDAxz2YMwE4_oEsQ7mu5wEBY9boUW0J2Sl1YebPrTWl4WblXF. Acesso em: 11 jan. 2022.

GIANTIN, M. et al. c-KIT messenger RNA and protein expression and mutations in canine cutaneous mast cell tumors: correlations with post-surgical prognosis. **Journal of veterinary diagnostic investigation**, v. 24, n. 1, p. 116-126, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1177/1040638711425945>. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/1040638711425945>. Acesso em: 05 jan. 2019.

GRAF, R. et al. Cutaneous tumors in swiss dogs: retrospective data from the swiss canine cancer registry, 2008–2013. **Veterinary pathology**, v. 55, n. 6, p. 809-820, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1177/0300985818789466>. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/full/10.1177/0300985818789466>. Acesso em: 7 fev. 2020.

HORTA, R. S. et al. Assessment of canine mast cell tumor mortality risk based on clinical, histologic, immunohistochemical, and molecular features. **Veterinary pathology**, v. 55, n. 2, p. 212-223, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1177/0300985817747325>. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/0300985817747325>. Acesso em: 25 set. 2019.

HUME, C. T. et al. Outcomes of dogs with grade 3 mast cell tumors: 43 cases (1997–2007). **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 47, n. 1, p. 37-44, 2011. DOI: <https://doi.org/10.5326/JAAHA-MS-5557>. Disponível em: <https://meridian.allenpress.com/jaaha/article-abstract/47/1/37/176685>. Acesso em: 23 abr. 2019.

KIUPEL, M. et al. Impact of tumour depth, tumour location and multiple synchronous masses on the prognosis of canine cutaneous mast cell tumours. **Journal of Veterinary Medicine Series A**, v. 52, n. 6, p. 280-286, 2005. DOI: 10.1111/j.1439-0442.2005.00726.x. Disponível em: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1439-0442.2005.00726.x?casa_token=dv1OaVX_HbUAAAAA:-qB_nUFQgo_0dGjxqYy01qlh3aiYKVTPqQuZLdYM9ZGoBK-izut2dWsFSANkHR3sU8YuXLitEfPaS86s. Acesso em: 28 jan. 2019.

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**, Madison, v.48, n.1, p.147-155, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1177/0300985810386469>. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/full/10.1177/0300985810386469>. Acesso em: 10 set. 2020.

KIUPEL, M. et al. The use of KIT and tryptase expression patterns as prognostic tools for canine cutaneous mast cell tumors. **Veterinary pathology**, v. 41, n. 4, p. 371-377, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1354/vp.41-4-371>. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/full/10.1354/vp.41-4-371>. Acesso em: 15 set. 2021.

KIUPEL, M.; CAMUS, M. Diagnosis and Prognosis of Canine Cutaneous Mast Cell Tumors. **Vet Clin North Am Small Anim Pract**. [s.l], v. 49, n. 5, p. 819-836, 2019. DOI:10.1016/j.cvsm.2019.04.002. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31178200/> Acesso em: 08 jun. 2021.

MEDEIROS-RONCHI, A, et al. Estudo retrospectivo do mastocitoma cutâneo canino e papel do azul de toluidina na graduação histológica de mastocitomas. **Enciclopédia biosfera**, v. 15, n. 28, 2018. DOI: 10.18677/EnciBio_2018B47. Disponível em: <http://www.conhecer.org.br/enciclop/2018B/AGRAR/estudo%20retrospectivo.pdf>. Acesso em: 15 fev. 2020.

MILLER, D. M. The occurrence of mast cell tumors in young Shar-Peis. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 7, n. 3, p. 360-363, 1995. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/104063879500700311>. Acesso em: 20 ago. 2021.

OLIVEIRA, M. T. et al. Canine and feline cutaneous mast cell tumour: a comprehensive review of treatments and outcomes. **Topics in Companion Animal Medicine**, p. 100472, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tcam.2020.100472>. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1938973620300702?casa_token=kLa10_mIhZUAAAAA:q8dYqsADR-wuH_2E00Elt3XNE4N_NE0j3KnVGa-7BjkmVialGWSz9w2PYCi3vfYYTJHVB6Pjewk. Acesso em: 07 fev. 2021.
Oncologia em cães e gatos. São Paulo: Roca, 2009. p. 282-291.

PATNAIK, A.K.; EHLER, W.J.; MACEWEN, E.G. Canine mast cell tumor: morphologic grading and survival time in 83 dogs. **Veterinary Pathology**, Madison, v.21, p.469-474, 1984. DOI: <https://doi.org/10.1177/030098588402100503>. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/030098588402100503>. Acesso em: 2 fev. 2021.

PIERINI, A. I. et al. Epidemiology of Breed-Related Mast Cell Tumour Occurrence and Prognostic Significance of Clinical Features in a Defined Population of Dogs in West-Central Italy. **Veterinary Sciences**, v. 6, n. 2, p. 53, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/vetsci6020053>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2306-7381/6/2/53>. Acesso em: 5 mar. 2020.

PLOTON, D. et al. Improvement in the staining and in the visualization of the argyrophilic proteins of the nucleolar organizer region at the optical level. **The Histochemical Journal**, v. 18, n. 1, p. 5-14, 1986. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF01676192>. Acesso em 20 jan. 2020.

POGGIANI, S. S. C. et al. Canine cutaneous mast cell tumor: biologic behavior and its correlation with prognostic indicators. **Scientific Research** V. 2, N. 4, p. 255-261, 2012. DOI: DOI:10.4236/ojvm.2012.24041. Disponível em: https://www.scirp.org/html/16-2280047_25612.htm. Acesso em: 13 jun. 2021.

RAMOS-VARA, J. A. et al. Suggested guidelines for immunohistochemical techniques in veterinary diagnostic laboratories. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 20, n. 4, p. 393-413, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1177/104063870802000401>. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/full/10.1177/104063870802000401>. Acesso em: 21 maio, 2020.

REYNOLDS, B. D. et al. Patient and tumour factors influencing canine mast cell tumour histological grade and mitotic index. **Veterinary and comparative oncology**, v. 17, n. 3, p. 338-344, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1111/vco.12477>. Disponível em: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/vco.12477?casa_token=5eaALMTZhKMAA AAA:qEcvql-38G7B8VZ6Nk6YLobR6r7rqaLSQjnIpaXE0bL0Q0DltjT7L7jNhZZote_KxkeFZu9oZAZ-y6Eu. Acesso em: 7 fev. 2022.

ROMANSIK, E. M. et al. Mitotic index is predictive for survival for canine cutaneous mast cell tumors. **Veterinary pathology**, v. 44, n. 3, p. 335-341, 2007. DOI: 10.1354/vp.44-3-335. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1354/vp.44-3-335>. Acesso em: 07 maio 2018.

SABATTINI, S. et al. Histologic Grading of Canine Mast Cell Tumor Is 2 Better Than 3?. **Veterinary pathology**, v. 52, n. 1, p. 70-73, 2015. DOI: 0.1177/0300985814521638. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24513799/>. Acesso em: 07 dez 2021.

SCARPA, F.; SABATTINI, S.; BETTINI, G. Cytological grading of canine cutaneous mast cell tumors. **Veterinary and comparative oncology**, [s.l.], v.14, n.3, p. 245-251, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1111/vco.12090>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/vco.12090>. Acesso em: 10 set. 2020

- SHOOP, S. J. W. et al. Prevalence and risk factors for mast cell tumours in dogs in England. **Canine Genetics and Epidemiology**, v. 2, n. 1, p. 1, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1186/2052-6687-2-1>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1186/2052-6687-2-1>. Acesso em: 2 jan. 2022.
- ŚMIECH, A. et al. Epidemiological assessment of the risk of canine mast cell tumours based on the Kiupel two-grade malignancy classification. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 60, n. 1, p. 1-9, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13028-018-0424-2>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1186/s13028-018-0424-2>
- SMITH, J. et al. Recurrence rates and clinical outcome for dogs with grade II mast cell tumours with a low AgNOR count and Ki67 index treated with surgery alone. **Veterinary and comparative oncology**, v. 15, n. 1, p. 36-45, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1111/vco.12140>. Disponível em: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/vco.12140?casa_token=i3Ds_w0RJr0AAAAA:x0EG0Rt5nSyuObKUZPDmxOxoQ7imCUpbjX-qgR17BAdtKBc1tcOIrgUJZSEnMyc_TAQ9RIXYADU8qL-. Acesso em: 01 jul. 2020.
- STEFANELLO, D. et al. Comparison of 2-and 3-category histologic grading systems for predicting the presence of metastasis at the time of initial evaluation in dogs with cutaneous mast cell tumors: 386 cases (2009–2014). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 246, n. 7, p. 765-769, 2015. DOI: <https://doi.org/10.2460/javma.246.7.765>. Disponível em: <https://avmajournals.avma.org/view/journals/javma/246/7/javma.246.7.765.xml>. Acesso em: 4 jun. 2021.
- TAKEUCHI, Y. et al. Validation of the prognostic value of histopathological grading or c-kit mutation in canine cutaneous mast cell tumours: a retrospective cohort study. **The Veterinary Journal**, v. 196, n. 3, p. 492-498, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2012.11.018>. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1090023312005229?casa_token=JLQYILHWV6MAAAAA:jUSPCxyfWcCejdDgzFv4i40JC3-j5RR4-zdD_rCk1YbAPu8z3_8SiElMvvuNKBXFO1f45QGd3X4. Acesso em: 22 out. 2020.
- THAMM, D.H; VAIL, D.M. Mast cell tumors. In: WITHROW, S.J.; VAIL, D.M. Withrow & MacEwen's **Small animal clinical oncology**. 4th ed. St. Louis: Saunders Elsevier, 2008. Cap.19, p.402-424.
- THOMPSON, J. J. et al. Canine subcutaneous mast cell tumor: characterization and prognostic indices. **Veterinary Pathology**, v. 48, n. 1, p. 156-168, 2011. DOI: [10.1177/03009858103907164](https://doi.org/10.1177/03009858103907164). Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/0300985810387446>. Acesso em: 22 mar. 2020.
- WARLAND, J. et al. Canine mast cell tumours: decision-making and treatment. **In Practice**, v. 37, n. 7, p. 315-332, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1136/inp.h3440>. Disponível em: https://bvajournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1136/inp.h3440?casa_token=0i2k9BxBIPMAAAAA:JAGVWn1lCWvHFaF3mHARorFhloRxeKHMnGr5Xr6SSBUGh-a2H-GC_54aCzMSED9rERI0bvWDMbNybp0f. Acesso em: 15 mar. 2020.
- WEBSTER, J. D. et al. Cellular proliferation in canine cutaneous mast cell tumors: associations with c-KIT and its role in prognostication. **Veterinary Pathology Online**, v. 44,

n. 3, p. 298-308, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1354/vp.44-3-298>. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/full/10.1354/vp.44-3-298>. Acesso em: 3 mar. 2020.

WELLE, 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. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-3164.2008.00694.x>. Disponível em: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-3164.2008.00694.x?casa_token=Bgdcxkfdjn4AAAAA:mN1oGlu7yLh6c46jT6Z-RPmeKghsu0d0a6MYUE7Gl42heymqLeehVsuqcn3S6iteHbPWS_Ha3KhguCCb. Acesso em: 06 out. 2021.