

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA FACULDADE DE MEDICINA
VETERINÁRIA E ZOOTECNIA CAMPUS DE BOTUCATU

TROMBOCITOSE COMO INDICADOR PROGNÓSTICO DE
NEOPLASIAS EM CÃES

LETÍCIA GONDIM SOUTO

Botucatu
2024

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA FACULDADE DE MEDICINA
VETERINÁRIA E ZOOTECNIA CAMPUS DE BOTUCATU

TROMBOCITOSE COMO INDICADOR PROGNÓSTICO DE
NEOPLASIAS EM CÃES

LETÍCIA GONDIM SOUTO

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Medicina Veterinária
da Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia da UNESP, Campus de
Botucatu, como parte dos requisitos para
obtenção do título de Mestre em Medicina
Veterinária

Orientadora: Prof^a. Titular. Regina Kiomi Takahira

Botucatu
2024

S728t Souto, Leticia Gondim
Trombocitose como indicador prognóstico de neoplasias em cães /
Leticia Gondim Souto. -- Botucatu, 2025
64 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP),
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu
Orientadora: Regina Kiomi Takahira

1. Plaquetas. 2. Câncer. 3. Sobrevida. 4. Metástase. I. Título.

Impacto potencial desta pesquisa

Impacto científico esperado: Aplicação de um novo método prognóstico na rotina oncológica veterinária, possibilitam uma avaliação mais precisa da sobrevida de cães com neoplasias malignas.

Impacto social: Este método prognóstico poderá fornecer novas perspectivas de pesquisa, para futuras intervenções terapêuticas mais eficazes, especialmente no contexto da trombocitose e câncer.

Impacto econômico: Método de baixo custo, prático e rápido que contribuirá com informações valiosas de prognóstico em cães com neoplasias malignas.

Potential impact of this research

Expected scientific impact: Application of a new prognostic method in routine veterinary oncology, enabling a more accurate assessment of the survival of dogs with malignant neoplasms.

Social impact: This prognostic method may provide new research perspectives for future, more effective therapeutic interventions, especially in the context of thrombocytosis and cancer.

Economic impact: Low-cost, practical and rapid method that will contribute valuable prognostic information in dogs with malignant neoplasms.

Nome da autora: Letícia Gondim Souto

Título: TROMBOCITOSE COMO INDICADOR PROGNÓSTICO DE
NEOPLASIAS EM CÃES

Composição da Banca Examinadora

Profa. Titular Regina Kiomi Takahira

Presidente e Orientadora

Departamento de Clínica Veterinária

FMVZ - UNESP, Botucatu, SP

Prof. Ass. Dr. Paulo Fernandes Marcusso

Membro

Departamento de Clínica Veterinária

FMVZ - UNESP, Botucatu, SP

Prof. Titular Nayro Xavier de Alencar

Membro

Departamento de Patologia e Clínica Veterinária

Universidade Federal Fluminense, Rio de Janeiro

Dezembro de 2024

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus por ser meu guia e por todo livramento até aqui. Sou imensamente grata aos meus familiares e amigos que sempre estiveram ao meu lado. Essa vitória é nossa!

"Peçam, e lhes será dado; busquem, e encontrarão; batam, e a porta lhes será aberta. Pois todo o que pede, recebe; o que busca, encontra; e àquele que bate, a porta será aberta" Mateus 7:7-8

Agradecimentos à Faculdade de Medicina Veterinária FMVZ Botucatu, por proporcionar o programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, assim como a CAPES, pois, o presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

As plaquetas são classicamente associadas a hemostasia e trombose, entretanto estudos na medicina humana evidenciam outra função relacionada a contribuição na progressão do câncer. A trombocitose em pacientes humanos com câncer é amplamente reconhecida como um fator de mau prognóstico, entretanto, esta associação na medicina veterinária é raramente documentada ou pode estar potencialmente subnotificada. Foram selecionados 166 prontuários da espécie canina do Hospital Veterinário (HV) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP/Botucatu, nos períodos de 2014 a 2023, que apresentavam trombocitose, diagnóstico de neoplasia e informações de tempo sobrevida. Nosso estudo demonstrou que a intensidade da trombocitose pode representar um indicador prognóstico em neoplasias malignas, com tempo de sobrevida menor ou igual à 15 meses ($p=0,045$), demonstrando que quanto maior a contagem plaquetária menor era a sobrevida ($r = -0,18$; $p=0,025$). Quando avaliado diagnósticos isolados, os cães com mastocitoma que apresentavam trombocitose discreta ($430-500.000/\mu\text{L}$) tiveram menor chance de evoluir à óbito em tempo menor ou igual à 4 meses ($\text{OR} = 0,07$; $p=0,041$) e os pacientes com hemangiossarcoma com o tempo de sobrevida menor ou igual à 15 meses, apresentaram maior contagem plaquetária $638.000/\mu\text{L}$) (540.000 a $742.000/\mu\text{L}$) ($p=0,016$). A intensidade da trombocitose representa um importante indicador prognóstico em cães com neoplasias malignas, principalmente no mastocitoma e no hemangiossarcoma, portanto, promovendo novas perspectivas prognósticas na medicina veterinária.

Palavras-chave: Plaquetas, Câncer, Sobrevida, Metástase

ABSTRACT

Platelets are classically associated with hemostasis and thrombosis; however, studies in human medicine have highlighted another role related to their contribution to cancer progression. Thrombocytosis in human cancer patients is widely recognized as a poor prognostic factor; however, this association is rarely documented in veterinary medicine or may be potentially underreported. A total of 166 canine medical records from the Veterinary Hospital (HV) of the School of Veterinary Medicine and Animal Science – UNESP/Botucatu, spanning from 2014 to 2023, were selected. These records exhibited thrombocytosis, a diagnosis of neoplasia, and survival time information. Our study demonstrated that the intensity of thrombocytosis could serve as a prognostic indicator in malignant neoplasms, with a survival time of 15 months or less ($p = 0.045$), showing that higher platelet counts were associated with shorter survival ($r = -0.18$; $p = 0.025$). When evaluated by specific diagnoses, dogs with mast cell tumors presenting with mild thrombocytosis (430-500,000/ μL) had a lower likelihood of dying within 4 months or less ($\text{OR} = 0.07$; $p = 0.041$), while patients with hemangiosarcoma and a survival time of 15 months or less showed higher platelet counts (638,000/ μL) (range: 540,000 to 742,000/ μL) ($p = 0.016$). The intensity of thrombocytosis represents a significant prognostic indicator in dogs with malignant neoplasms, particularly in mast cell tumors and hemangiosarcoma, thus providing new prognostic perspectives in veterinary medicine.

Keywords: Platelets, Cancer, Survival, Metastasis

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Análise de contagem plaquetária em animais com trombocitose e neoplasia maligna em relação ao tempo de sobrevida. A. Boxplot demonstrando que pacientes com neoplasias malignas com tempo de sobrevida menor ou igual à 15 meses apresentam maior contagem plaquetária (554.000; 488.000-661.550) que pacientes com tempo de sobrevida maior que 15 meses (513.050; 467.500-587.500) ($p=0,045$). B. Gráfico de dispersão. Correlação linear simples fraca e negativa entre a contagem plaquetária e tempo de sobrevida (mês) em pacientes com neoplasias malignas e trombocitose ($r = -0,18$; $p=0,025$).

Figura 2: Análise de contagem plaquetária em animais com trombocitose e neoplasia de acordo com o citotipo/histogênese em relação ao tempo de sobrevida. A. Boxplot demonstrando que pacientes com neoplasias de células redondas com tempo de sobrevida menor ou igual à 4 meses apresentam maior contagem plaquetária (629.000; 528.256-840.750) que pacientes com tempo de sobrevida maior que 4 meses (474.000; 466.000-497.425) ($p=0,015$). B. Gráfico de dispersão. Correlação linear simples moderada e negativa entre a contagem plaquetária e tempo de sobrevida (mês) em pacientes com neoplasias de células redondas e trombocitose ($r = -0,552$; $p=0,006$). C. Boxplot demonstrando que pacientes com neoplasias epiteliais com tempo de sobrevida menor ou igual à 17 meses apresentam maior contagem plaquetária (551.000; 492.750-647.443) que pacientes com tempo de sobrevida maior que 17 meses (494.000; 458.500-560.500) ($p=0,017$).

Figura 3: Análise de contagem plaquetária em animais com trombocitose e neoplasia de acordo com o citotipo/histogênese e comportamento biológico em relação ao tempo de sobrevida. A. Boxplot demonstrando que pacientes com neoplasias de células redondas malignas com tempo de sobrevida menor ou igual à 4 meses apresentam maior contagem plaquetária (686.000; 545.000-873.000) que pacientes com tempo de sobrevida maior que 4 meses (480.000; 467.750-496.318) ($p=0,01$). B. Gráfico de dispersão. Correlação linear simples moderada e negativa entre a contagem plaquetária e tempo de sobrevida (mês) em pacientes com neoplasias de células redondas malignas e trombocitose ($r = -0,559$; $p=0,007$). C. Boxplot demonstrando que pacientes com neoplasias mesenquimais malignas com tempo de sobrevida menor ou igual à 16 meses

apresentam maior contagem plaquetária (562.000; 488.000-735.000) que pacientes com tempo de sobrevida maior que 16 meses (479.000; 449.000-519.050) ($p=0,027$).

Figura 4: Análise dos parâmetros hematológicos em pacientes com carcinoma mamário em relação ao tempo de sobrevida. A. Boxplot demonstrando que pacientes com carcinoma mamário com tempo de sobrevida menor ou igual à 9 meses apresentam menor HT(%) (36; 30,75-42,25) que pacientes com tempo de sobrevida maior que 9 meses (42;39-46) ($p=0,047$). B. Boxplot demonstrando que pacientes com carcinoma mamário com tempo de sobrevida menor ou igual à 6 meses apresentam maior contagem de leucócitos (18.050; 12.225-28.175) que pacientes com tempo de sobrevida maior que 6 meses (11.800; 10.150-17.550) ($p=0,029$). C. Boxplot demonstrando que pacientes com carcinoma mamário com tempo de sobrevida menor ou igual à 6 meses apresentam maior contagem de neutrófilos segmentados (15.050; 9.000-24.725) que pacientes com tempo de sobrevida maior que 6 meses (9.800; 7.100-13.600) ($p=0,047$). D. Análise de correlação. O tamanho do círculo indica a intensidade de correlação. Cores vermelhas indicam correlação negativa e cores azuis, correlação positiva. Foi observado correlação linear simples moderada e positiva entre o hematócrito e o tempo de sobrevida ($r=0,429$; $p=0,003$) e correlação simples linear e negativa entre a contagem de leucócitos ($r= -0,349$; $p= 0,018$) e contagem de neutrófilos segmentados ($r= -0,372$; $p= 0,011$). E – Forestplot da análise de razão de chances em pacientes com carcinoma mamário para os parâmetros hematológicos em relação ao tempo de sobrevida menor ou igual à 6 meses. Observa-se que animais com carcinoma mamário, trombocitose e pelo menos mais alguma alteração hematológica apresentam 7,36 vezes mais chances de evoluir à óbito em tempo menor ou igual à 6 meses ($p=0,034$), porém, na análise individual de cada alteração, não foi observado valores significativos.

Figura 5: Análise de hematócrito em animais com trombocitose e carcinoma de células escamosas em relação ao tempo de sobrevida. A. Boxplot demonstrando que pacientes com CCE com tempo de sobrevida menor ou igual à 9 meses apresentam maior hematócrito (%) (26 ; 24-32) que pacientes com tempo de sobrevida maior que 9 meses (42; 32,5-49,5) ($p=0,029$). B. Gráfico de dispersão. Correlação linear simples moderada e positiva entre a hematócrito e tempo de

sobrevida (mês) em pacientes com neoplasias malignas e trombocitose ($r = 0,684$; $p=0,006$).

Figura 6: Análise dos parâmetros hematológicos em pacientes com mastocitoma em relação ao tempo de sobrevida. A. Boxplot demonstrando tendência dos pacientes com mastocitoma em apresentarem tempo de sobrevida menor ou igual à 4 meses e apresentam maior contagem plaquetária (572.000; 533.837-779.500) que pacientes com tempo de sobrevida maior que 4 meses (486.000; 473.000-497.425) ($p=0,054$). B. Boxplot demonstrando que pacientes com mastocitoma com tempo de sobrevida menor ou igual à 4 meses apresentam menor hematócrito (%) (34; 31,5-34,5) que pacientes com tempo de sobrevida maior que 4 meses (41; 38-44) ($p=0,014$). C. Boxplot demonstrando que pacientes com mastocitoma com tempo de sobrevida menor ou igual à 7 meses apresentam maior contagem de neutrófilos segmentados (12.600; 11.750-16.425) que pacientes com tempo de sobrevida maior que 7 meses (9.800; 6.675-10.750) ($p=0,029$). D. Análise de correlação. O tamanho do círculo indica a intensidade de correlação. Cores vermelhas indicam correlação negativa e cores azuis, correlação positiva. Foi observado correlação linear simples moderada e positiva entre o hematócrito e o tempo de sobrevida ($r=0,616$; $p=0,01$) enquanto houve uma tendência de correlação simples linear e negativa entre a contagem plaquetária ($r= -0,461$; $p= 0,07$) e contagem de neutrófilos segmentados ($r= -0,493$; $p= 0,052$). E – Forestplot da análise de razão de chances em pacientes com mastocitoma para os parâmetros hematológicos em relação ao tempo de sobrevida menor ou igual à 4 meses. Observa-se que animais com mastocitoma apresentando trombocitose discreta tem menor chance de evoluir à óbito em tempo menor ou igual à 4 meses (OR = 0,07; $p=0,041$). Os demais parâmetros não apresentaram valores significativos ou apresentavam na tabela de contingência pelo menos um valor zero (Outras alterações e anemia).

Figura 7: Análise de parâmetros hematológicos em animais com trombocitose e hemangiossarcoma ou sarcoma em relação ao tempo de sobrevida. A. Boxplot demonstrando que pacientes com hemangiossarcoma com tempo de sobrevida menor ou igual à 15 meses apresentam maior contagem plaquetária (638.000; 540.000-742.000/ μ L) que pacientes com tempo de sobrevida maior que 15

meses (448.000; 442.000-449.000/ μ L) ($p=0,016$). B. Boxplot demonstrando que pacientes com sarcoma com tempo de sobrevida menor ou igual à 4 meses apresentam maior contagem leucócitos (17.200; 16.100-20.850/ μ L) que pacientes com tempo de sobrevida maior que 4 meses (10.900; 9.700-14.400/ μ L) ($p=0,014$). C. Boxplot demonstrando que pacientes com sarcoma com tempo de sobrevida menor ou igual à 4 meses apresentam maior contagem de neutrófilos segmentados (14.350; 12.900-18.350/ μ L) que pacientes com tempo de sobrevida maior que 4 meses (9.300; 7.400-10.400/ μ L) ($p=0,035$). D. Gráfico de dispersão. Correlação simples linear moderada e negativa entre a contagem de leucócitos e tempo de sobrevida (mês) ($p= 0,018$; $r= -0,709$) e contagem de neutrófilos segmentados e tempo de sobrevida (mês) ($p= 0,016$; $r= -0,718$) em pacientes com sarcoma e trombocitose.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Prevalências das neoplasias de acordo com o comportamento biológico, citotipo e/ou histogênese e técnica diagnóstica utilizadas.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
2. REVISÃO DE LITERATURA	17
3. OBJETIVOS	21
3.1 Geral	21
4. MATERIAL E MÉTODOS	22
4.1 Levantamento	22
4.2 Agrupamentos	23
4.3 Análise laboratorial	23
4.4 Organização dos dados e análise estatística	24
5. RESULTADOS	25
5.1 Relação da intensidade da trombocitose, sobrevida e parâmetros hematológicos	28
6. DISCUSSÃO	36
7. CONCLUSÕES	42
8. BIBLIOGRAFIA	42

Capítulo 1

1. INTRODUÇÃO

As plaquetas são vistas como fragmentos citoplasmáticos que atuam na hemostasia e trombose, entretanto na medicina humana está evidente outra função relacionada a contribuição na progressão do câncer e, por essa razão, tem se tornado uma área de grande interesse de investigação prognóstica e terapêutica (Bambace; Holmes, 2011; Lin; Afshar-kharghan; Schafer, 2014).

Pesquisas apresentam mecanismos e interações moleculares complexas entre as células neoplásicas e as plaquetas circulantes, evidenciando a influência plaquetária no desenvolvimento neoplásico e metastático (Kaushansky, 2008; Li *et al.*, 2024).

A ativação plaquetária favorece a liberação de grânulos alfa resultando na estimulação de diversos fatores que desempenham um papel crucial na regulação do microambiente tumoral, como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), $TGF\beta 1$, fator de crescimento de fibroblastos (FGF) e variedades de citocinas pró-inflamatórias. Esses elementos podem influenciar em aspectos fundamentais do tumor, como o crescimento celular, a metástase, a angiogênese, a inflamação e, até mesmo, a eficácia da quimioterapia (Olsson e Cedervall, 2018).

A trombocitose em pacientes humanos com câncer é amplamente reconhecida como um fator de mau prognóstico, caracterizando-se por uma correlação inversa entre o aumento na contagem de plaquetas e a sobrevida dos pacientes (Shoda *et al.*, 2015). Estudos demonstram que essa condição está associada a diversos tipos de câncer, incluindo neoplasias hepáticas (Hwang, 2004), gastrointestinais (Baranyai *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2017) e do sistema reprodutor feminino, como as neoplasias cervicais (Cheng *et al.*, 2017) e ovarianas (Hufnagel *et al.*, 2020).

A partir do estudo de Tao *et al.* (2021) acredita-se que os medicamentos que reduzem a contagem de plaquetas ou a ativação plaquetária, podem diminuir a progressão do câncer humano e melhorar os resultados na sobrevida dos pacientes.

Esta associação na medicina veterinária é raramente documentada ou pode estar potencialmente subnotificada (Childress, 2012). A partir de estudos retrospectivos em animais, a trombocitose mostrou-se ser uma condição comumente encontrada em cães com o diagnóstico de neoplasia (Hammer, 1991; Neel; Snyder; Grindem, 2012; Athanasiou et al., 2017; Woolcock et al., 2017; Rocha et al., 2019) mas o seu valor prognóstico em diferentes neoplasias ainda não está determinado.

A pesquisa foi incentivada devido à escassez de informações sobre a sobrevida de cães com neoplasia frente à intensidade da trombocitose em diferentes origens neoplásicas, podendo direcionar a futuros estudos que possam auxiliar em novas intervenções terapêuticas, visando prolongar a sobrevida dos animais acometidos.

Esse estudo tem como objetivo identificar se há uma relação entre a intensidade da trombocitose em pacientes caninos com neoplasia e sua menor sobrevida, tal qual ocorre em pacientes humanos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

As plaquetas são produzidas na medula óssea por meio dos megacariócitos que promovem longas extensões e fragmentações citoplasmática entre as células endoteliais sinusoidais e em seguida, disponibiliza-as via corrente sanguínea (Gader *et al.*, 2008).

São indispensáveis para o funcionamento normal da hemostasia, pois aderem-se ao local da lesão formando agregados plaquetários que obstruem o local evitando maiores perdas sanguíneas e secretando moléculas necessárias para coagulação e cicatrização de feridas, além de fornecer superfície primária da membrana para a geração de trombina, permitindo a formação de uma membrana rica em plaquetas (Julie Allen; Tracy Sokol, 2022).

A trombopoiese é regulada principalmente pelo hormônio trombopoetina (TPO), que é produzido constantemente pelo fígado e rins de animais adultos (Ribeiro et al., 2021). A TPO ao se ligar às plaquetas, sofre um processo fisiológico de degradação, entretanto, frente a uma trombocitopenia, essa degradação diminui e por consequência, aumenta a sua concentração e

disponibilidade. Com a TPO livre na corrente sanguínea, os megacariócitos são estimulados a produzirem plaquetas, sendo assim, um processo de autorregulação do organismo (Kaushansky, 2008).

Fatores de causas inflamatórias, infecciosas, imunomediadas, endócrinas e neoplásicas podem interferir na trombopoiese, promovendo a trombocitose secundária ou reativa (Athanasίου *et al.*, 2017).

Atualmente, compreende-se que um dos principais mediadores da trombocitose reativa é a interleucina-6 (IL-6) (Julie Allen; Tracy Sokol, 2022). Essa citocina também é secretada de forma parácrina pelas células tumorais, que estimula o fígado a produzir a TPO e consequentemente, à estimulação da megacariopoiese e a gênese plaquetária, promovendo o aumento na contagem de plaquetas circulantes (Blay *et al.*, 1997). A combinação desses eventos contribui para a trombocitose e hipercoagulabilidade em pacientes com câncer, conhecida como Síndrome de Trousseau (Haemmerle *et al.*, 2018).

No estudo de Lin *et al.* (2014) observou que pacientes humanos com câncer em região gastrointestinal, renal, próstata, ovário e de pulmão apresentavam, simultaneamente, altas contagens plaquetárias e altos níveis séricos de IL-6 e TPO. Resultado semelhante foi encontrado em um estudo em cães com carcinomas em região urotelial, nasal, brônquica e adenocarcinoma de glândula hepatoide, que apresentaram altos níveis de TPO, entretanto, as concentrações de IL-6 não foram diferentes entre cães com carcinoma e os saudáveis. Além disso, não houve diferença nas concentrações de TPO e IL-6 nos cães com carcinoma e trombocitose e nos cães com carcinoma e contagem plaquetária dentro da normalidade para espécie (Cheney *et al.*, 2022).

Na medicina veterinária, a partir de estudos retrospectivos realizados para entender as possíveis origens da trombocitose em cães, revelaram que a presença de neoplasia é uma das principais causas desta condição, (Hammer, 1991; Neel, Snyder e Grindem, 2012; Woolcock *et al.*, 2017). Mas a associação entre as plaquetas e as células tumorais na medicina veterinária permanece indefinida.

Estudos na medicina humana estão direcionados a compreender o papel das plaquetas no câncer (Li *et al.*, 2024; Shu *et al.*, 2024; Zou *et al.*, 2022).

A interação física das células cancerígenas com as plaquetas é mediada principalmente por meio da molécula de adesão P-selectina. Além de ajudar a proteger as células cancerígenas, como uma barreira física, as plaquetas podem interferir no reconhecimento das células cancerígenas pelas células NK (Tímár et al., 2005). Além disso, as plaquetas podem transferir moléculas de MHC classe I para superfície das células neoplásicas, tornando-as irreconhecíveis para o sistema imune, prejudicando a citotoxicidade e a produção de IFN- γ pelas células NK (Buergey et al., 2012).

Os microtrombos ou também denominado de agregados heterotípicos, são constituídos principalmente por plaquetas, que protegem e transportam as células neoplásicas pela corrente sanguínea, secretando mediadores e escapando do sistema imunológico, facilitando assim a transmigração e metástase (Plantureux et al., 2018).

Além disso, no microambiente tumoral, as plaquetas ativadas secretam fatores de crescimento como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento transformador (TGF- β), fator de crescimento epidérmico (EGF) e fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), promovendo crescimento, proliferação e diferenciação das células tumorais (Plantureux et al., 2018). A presença de elevados níveis séricos de PDGF estão associados a um grau significativamente maior de metástases e a uma menor sobrevida em pacientes com câncer de mama (Jansson et al., 2018) e foi proposto como um como marcador prognóstico no câncer colorretal (Nakamura et al., 2008).

As plaquetas atuam também na modulação da resposta inflamatória no câncer, influenciando no estado de ativação do endotélio e recrutamento leucocitário para os locais de tumores primários e metastáticos. (Franco, Corken e Ware, 2015).

O papel das plaquetas como reguladoras da inflamação está sendo cada vez mais reconhecido, visto que, pode modular o sistema imunológico e promover a regulação de vários aspectos na progressão do câncer (Thomas e Storey, 2015). A partir da degranulação das plaquetas ativadas, ocorre a liberação de citocinas pró-inflamatórias como a CXCL5, CXCL7 e a interleucina-

8 (IL-8), que são recrutadores e ativadores potentes de leucócitos, como neutrófilos e monócitos (Gay e Felding-Habermann, 2011).

Os leucócitos estão envolvidos na modulação do microambiente tumoral e, contribuem para a metástase. Estudos demonstraram que os neutrófilos e os macrófagos ajudam na sobrevivência e no crescimento de células tumorais metastáticas, promovendo a angiogênese (Nozawa, Chiu e Hanahan, 2006).

As células tumorais expressam fatores de transcrição como NF- κ B, STAT3 e KIF1 α , que contribuem para o aumento de citocinas como as IL-1, IL-6 e IL-8 e citocinas pro-angiogênicas, incluindo o fator de crescimento epidérmico (EGF) e o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), promovendo o recrutamento de neutrófilos e consequentemente o seu aumento no sangue periférico (Grivennikov, Greten e Karin, 2010). Sabe-se que os neutrófilos são responsáveis pela liberação de espécies reativas de oxigênio, que podem causar danos ao DNA e, consequentemente, favorecer o desenvolvimento tumoral (Mantovani *et al.*, 2008).

Através da liberação de citocinas dos grânulos plaquetários, ocorre a estimulação da formação de armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs) (Cedervall, Hamidi e Olsson, 2018). Recentemente, crescentes evidências sugerem que as NETs desempenham um papel significativo na progressão do câncer e na disseminação metastática em humanos e murinos (Masucci *et al.*, 2020).

As NETs exacerbam diretamente a agressividade do tumor ao aumentar a capacidade migratória e invasiva das células cancerígenas. Também possuem a capacidade de reativar células cancerígenas quiescentes, resultando em recidiva tumoral, além de promover o crescimento e a disseminação irrestrita do tumor. Além disso, as NETs podem capturar células cancerígenas circulantes, facilitando assim o processo de metástase (Demkow, 2021).

Na medicina humana, as pesquisas atuais estão se concentrando em entender se a redução da contagem de plaquetas e/ou a inibição de sua função poderiam bloquear a progressão tumoral associada às plaquetas (Julie Allen; Tracy Sokol, 2022; Li *et al.*, 2024). Demonstrou-se no estudo de Rothwell *et al.* (2018) que pacientes humanos utilizando aspirina para doenças

cardiovasculares, apresentaram um risco reduzido de metástase e modelos experimentais demonstraram que a terapia antiplaquetária com heparina diminuiu a chance de desenvolver doença metastática (Mierodzik et al., 1995; Borsig et al., 2001).

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar intensidade da trombocitose como um marcador prognóstico na sobrevida de cães com neoplasia.

Objetivos específicos

Comparar a sobrevida dos cães com neoplasia e trombocitose em subgrupos de acordo com:

- Comportamento biológico da neoplasia (benigno e maligno);
- Citotipo e/ou histogênese (epitelial, mesenquimal e células redondas);
- Correlação da intensidade de trombocitose, hematócrito, contagem total de leucócitos e neutrófilos segmentados com o tempo de sobrevida.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Levantamento

Foram solicitados prontuários da espécie canina do Hospital Veterinário (HV) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP/Botucatu, nos períodos de 2014 a 2023, que apresentavam trombocitose ($>430.000\mu\text{L}$; Meyer, D. J. & Harvey, J. W. Veterinary Laboratory Medicine, 2004).

O critério de inclusão foram animais com o diagnóstico citopatológico e/ou histopatológico de neoplasia com trombocitose.

Foi considerado apenas o primeiro hemograma realizado no HV. Por meio da consulta individual de cada prontuário, foi possível identificar o tempo de sobrevida dos animais e aqueles prontuários em que essa informação não constava, foram realizadas ligações telefônicas para os tutores responsáveis.

Os critérios de exclusão foram:

1. Tratamentos farmacológicos ou cirúrgicos que alterem a contagem plaquetária:
 - Uso de corticoides ou quimioterápicos;
 - Esplenectomia;
2. Animais sem informações ou incompletas de sobrevida;
3. Animais que morreram de outras causas não relacionadas a neoplasia;
4. Neoplasias que não se encaixavam nos citotipos propostos (epitelial, mesenquimal e células redondas).

4.2 Agrupamentos

Para análise estatística os pacientes foram subdivididos de acordo com:

- Grupo comportamento biológico da neoplasia: Benigno e maligno relacionado ao tempo de sobrevida;
- Grupo citotipo/histogênese sem definição do comportamento biológico: Os casos foram subdivididos de acordo com a origem (epitelial, mesenquimal e células redondas) e tempo de sobrevida;
- Grupo citotipo/histogênese com definição do comportamento biológico: Os casos foram subdivididos de acordo com a origem (epitelial, mesenquimal e células redondas), comportamento biológico (benigno e maligno) e tempo de sobrevida;
- Grupo diagnóstico: Os diagnósticos mais prevalentes foram avaliados individualmente em relação ao tempo de sobrevida.

Nos casos que pacientes apresentavam duas neoplasias sendo uma benigna e outra maligna, foi considerado somente a neoplasia maligna em todos os grupos.

Nos casos com duas ou mais neoplasias malignas os animais não foram considerados no grupo “citotipo/histogênese”.

Casos em que não foram possíveis concluir o comportamento biológico, mas concluiu-se a citotipo/histogênese, foram considerados no grupo citotipo/histogênese sem definição do comportamento biológico.

4.3 Análise laboratorial

Hemograma

As contagens de hemácias, leucócitos totais, plaquetas e determinação de hemoglobina, bem como volume corpuscular médio (VCM), concentração hemoglobínica corpuscular média (CHCM) e amplitude de distribuição eritrocitária (RDW) foram realizadas em contador automatizado de células veterinário, pelo método de impedância. O volume globular (VG) foi determinado pelo método do microcapilar de Strumia (12.000 rpm por 5 minutos). A contagem diferencial de leucócitos, juntamente com avaliação morfológica de hemácias, leucócitos e plaquetas, bem como estimativa de plaquetas por campo de 1.000x, foi realizada em esfregaço sanguíneo corado com corante hematológico comercial, Panótico®.

4.4 Organização dos dados e análise estatística

Para todos os grupos propostos, foi analisada a contagem de plaquetas em diferentes pontos de corte baseados no tempo de vida, variando entre 4 e 24 meses, com o objetivo de identificar o menor tempo em que os pacientes pudessem ser separados de forma estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

No grupo de diagnóstico, além da contagem plaquetária, foram avaliados outros parâmetros laboratoriais, incluindo o hematócrito (HT%), a contagem de leucócitos totais e a contagem de neutrófilos segmentados, buscando identificar o menor tempo de sobrevida em que as diferenças entre os grupos se tornassem significativas ($p < 0,05$).

Para essas análises, foi aplicado o teste de Mann-Whitney, e os resultados foram apresentados como valores de mediana, primeiro quartil e terceiro quartil (mediana, Q1–Q3).

Adicionalmente, em todos os casos foi realizada uma análise de correlação pelo método de Spearman entre os parâmetros avaliados e o tempo de sobrevida.

No grupo de diagnósticos, também foi realizada análise de qui-quadrado ou teste exato de Fisher, e para proporções com diferenças estatisticamente significativas, calculou-se a razão de chances (Odds Ratio).

A categorização dos pacientes foi feita com base no menor tempo de sobrevida identificado pelo teste de Mann-Whitney para pelo menos um dos parâmetros analisados. Os animais foram classificados de acordo com o hematócrito como “Anêmicos” ($HT < 37\%$) ou “Não anêmicos” ($HT \geq 37\%$); de acordo com a contagem de leucócitos como “Presença de leucocitose” ($> 17.000/\mu L$) ou “Sem leucocitose” ($\leq 17.000/\mu L$); de acordo com a contagem de neutrófilos segmentados como “Presença de neutrofilia” ($> 11.500/\mu L$) ou “Sem neutrofilia” ($\leq 11.500/\mu L$); e pela intensidade da trombocitose como discreta ($\leq 500.000/\mu L$) ou moderada a intensa ($> 500.000/\mu L$) (Jain, 1993; Meyer & Harvey, 2004). Os animais também foram agrupados em “Somente com trombocitose” ou “Com outras alterações hematológicas” (com pelo menos uma alteração em outro parâmetro hematológico avaliado).

Nas tabelas de contingência que apresentaram algum valor igual a zero, a análise de razão de chances foi desconsiderada.

Todas as análises foram realizadas no software R (versão 4.4.1), utilizando loops para automatizar o processamento das diversas combinações de parâmetros e categorias. Para todos os testes, foi considerado estatisticamente significativos valores de $p < 0,05$.

Capítulo 2

5. RESULTADOS

Durante o período de estudo, foram obtidos cinco mil prontuários dos quais, 166 cães se encaixavam nos critérios de inclusão e exclusão.

No presente estudo, o diagnóstico das neoplasias foi majoritariamente realizado por meio do exame histopatológico (107 casos), seguido do exame citopatológico (59 casos) (Tabela 1).

Tabela 1: Prevalências das neoplasias de acordo com o comportamento biológico, citotipo e/ou histogênese e técnica diagnóstica utilizadas.

Citotipo/Histogênese + Comportamento biológico	Citologia	Histopatologia	Total Geral
Epitelial	34	55	89
Benigna	3	7	10
Adenoma hepatóide	1		1
Adenoma mamário	1	3	4

Ameloblastoma		1	1
Epitelioma sebáceo	1	2	3
Tricoblastoma		1	1
Maligna	29	48	77
Adenocarcinoma sebáceo		1	1
Carcinoma adrenocortical		1	1
Carcinoma apócrino		2	2
Carcinoma de células escamosas	3	11	14
Carcinoma de glândula ceruminosa		1	1
Carcinoma de seio nasal	1	1	2
Carcinoma de tireóide		2	2
Carcinoma hepatocelular		1	1
Carcinoma hepatoide		3	3
Carcinoma mamário	23	22	45
Carcinoma mucoepidermoide		1	1
Carcinoma urotelial	1	1	2
Neoplasia epitelial maligna	1		1
Tricoepitelioma maligno		1	1
Sem conclusão do comportamento biológico	2		2
Tumor de glândula perianal	2		2
Mesenquimal	12	33	45
Benigna	4	5	9
Hemangioma	1	1	2
Lipoma	3	3	6
Neoplasia mesenquimal benigna		1	1
Maligna	8	28	36
Condrossarcoma		1	1
Fibrossarcoma		1	1
Hemangiossarcoma	1	9	10
Lipossarcoma		2	2
Melanoma	2	3	5
Sarcoma	4	7	11
Osteossarcoma	1	5	6
Redondas	11	12	23
Benigna	3		3
Tumor venéreo transmissível	3		3
Maligna	7	12	19
Linfoma	2	1	3
Mastocitoma	5	11	16
Sem conclusão do comportamento biológico	1		1
Neoplasia de células redondas	1		1
Diagnósticos de neoplasias malignas concomitantes	2	7	9
Maligna	2	7	9
Adenocarcinoma apócrino + Tumor de tecidos moles		1	1

Carcinoma mamário + Mastocitoma alto grau + Melanoma	1	1
Carcinoma mamário + Melanoma	1	1
Carcinoma mamário + Melanoma	1	1
Carcinoma mamário + Sarcoma	1	1
Carcinoma mamário + Mastocitoma alto grau	1	1
Carcinoma misto grau I + Mioepitelioma maligno	1	1
Carcinossarcoma	1	1
Mastocitoma alto grau + Hemangiossarcoma	1	1
Total Geral	59	107
		166

De acordo com o comportamento biológico, cerca de 141 casos eram de comportamento maligno (67,4% histopatológicos / 32,6% citopatológicos) e 22 casos eram de comportamento benigno (54,5% histopatológicos / 45,5% citopatológicos). Ainda, três casos não houve conclusão do seu comportamento biológico devido às limitações da técnica empregada para o diagnóstico (citopatologia) ou a necessidade de outros exames (e.g. exame imunohistoquímico).

A partir do citotipo e/ou histogênese, 89 casos eram de origem epitelial (61,7% histopatológicos / 38,3% citopatológicos), 45 casos de origem mesenquimal (73,3% histopatológicos / 26,7% citopatológicos) e 23 casos de células redondas (52,1% histopatológicos / 47,9% citopatológicos).

Ao analisar o comportamento biológico associado ao citotipo/histogênese, as neoplasias epiteliais apresentaram 77 (46,3%) casos malignos, 10 (6,02%) casos benignos e 2 (1,2%) casos não apresentavam a definição do comportamento biológico, sendo determinados apenas pelo exame citopatológico. Nas neoplasias mesenquimais, 36 (21,6%) casos eram malignos e 9 (5,4%) casos benignos. Os casos com o citotipo/histogênese de células redondas apresentaram 19 (11,4%) casos malignos e apenas três casos benignos, sendo estes, realizados apenas pelo exame citopatológico e com o diagnóstico de tumor venéreo transmissível (TVT).

As neoplasias de origem epitelial apresentaram maior prevalência (89 casos; 53,6%). As neoplasias de origem mamária representaram, aproximadamente 50% dos casos de neoplasias epiteliais, seguidas dos carcinomas de células escamosas (15,7%).

As neoplasias mesenquimais representaram 27,1% (45 casos) dos casos, em que, 26,6% eram neoplasias vasculares (hemangioma ou hemangiossarcoma), seguido de sarcomas não diferenciado (17,7%).

Por fim, as neoplasias de células redondas com 13,8% (23/166) dos casos, foram representadas, majoritariamente, pelo mastocitoma (69,5%).

Dentre as neoplasias mais prevalentes do nosso estudo está o carcinoma mamário com 45 casos (48,8% histopatológicos / 51,9% citopatológicos), seguido do mastocitoma com 16 casos (68,7% histopatológicos / 31,3% citopatológicos), carcinoma de células escamosas com 14 casos (78,5% histopatológicos / 21,4% citopatológicos), hemangiossarcoma com 10 casos (90% histopatológicos / 10% citopatológico) e sarcoma não diferenciado com 11 casos (70% histopatológicos / 40% citopatológico).

5.1 Relação da intensidade da trombocitose, sobrevida e parâmetros hematológicos

Ao avaliar o efeito do comportamento biológico das neoplasias (benigno ou maligno) associadas à intensidade da trombocitose e uma menor sobrevida em cães com neoplasia, revelou diferença nas neoplasias de comportamento maligno ($p=0,04$) com menor sobrevida no período de 15 meses (Figura 1A). Além disso, observou-se correlação linear simples fraca e negativa ($p=0,025$; $r=-0,18$), indicando que quanto maior a intensidade da trombocitose, menor a sobrevida de cães com neoplasia de comportamento maligno (Figura 1B).

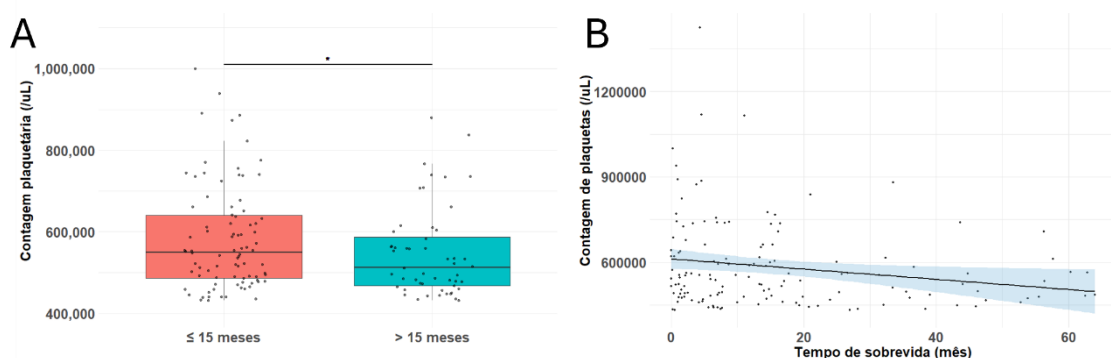


Figura 1: Análise de contagem plaquetária em animais com trombocitose e neoplasia maligna em relação ao tempo de sobrevida. A. Boxplot demonstrando que pacientes com neoplasias malignas com tempo de sobrevida menor ou igual à 15 meses apresentam maior contagem plaquetária (554.000; 488.000-661.550) que pacientes com tempo de sobrevida maior que 15 meses (513.050; 467.500-587.500) ($p=0,045$). B. Gráfico de dispersão. Correlação linear simples

fraca e negativa entre a contagem plaquetária e tempo de sobrevida (mês) em pacientes com neoplasias malignas e trombocitose ($r = -0,18$; $p=0,025$).

Ao avaliar a intensidade da trombocitose com a sobrevida de cães com classificações a partir dos citotipos/histogêneses (epitelial, mesenquimal e células redondas), observou-se diferença significativa no citotipo de células redondas na menor sobrevida de quatro meses ($p=0,015$) (Figura 2A) e com correlação linear simples moderada e negativa ($p= 0,006$; $R^2= -0,552$) (Figura 2B), e na de origem epitelial em um tempo de sobrevida de 17 meses ($p=0,017$) (Figura 2C), porém sem correlação significativa ($p=0,4$).

Nessa análise, nove animais não foram incluídos no “grupo origem” por apresentarem dois citotipos/histogêneses diferentes de neoplasias malignas concomitantes.

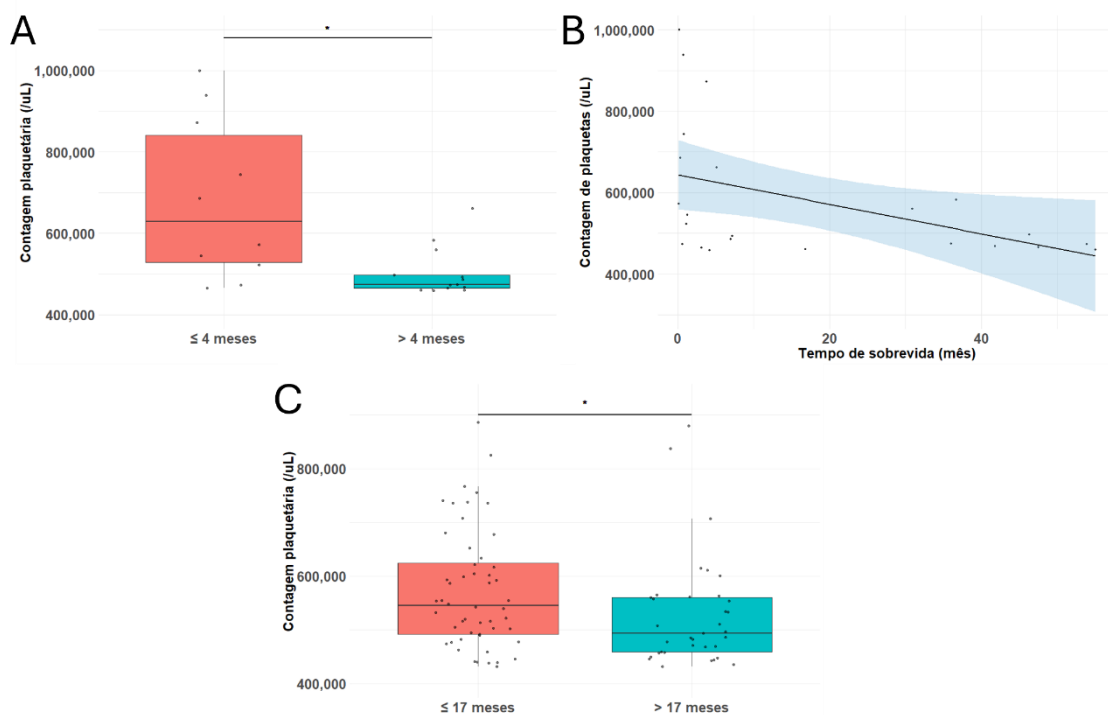


Figura 2: Análise de contagem plaquetária em animais com trombocitose e neoplasia de acordo com o citotipo/histogênese em relação ao tempo de sobrevida. A. Boxplot demonstrando que pacientes com neoplasias de células redondas com tempo de sobrevida menor ou igual à 4 meses apresentam maior contagem plaquetária (629.000; 528.256-840.750) que pacientes com tempo de sobrevida maior que 4 meses (474.000; 466.000-497.425) ($p=0,015$). B. Gráfico de dispersão. Correlação linear simples moderada e negativa entre a contagem plaquetária e tempo de sobrevida (mês) em pacientes com neoplasias de células redondas e trombocitose ($r = -0,552$; $p=0,006$). C. Boxplot demonstrando que pacientes com neoplasias epiteliais com tempo de sobrevida menor ou igual à 17 meses apresentam maior contagem plaquetária (551.000; 492.750-647.443) que pacientes com tempo de sobrevida maior que 17 meses (494.000; 458.500-560.500) ($p=0,017$).

Ao avaliar a citotipo/histogênese (epitelial, mesenquimal e células redondas) concomitante ao comportamento biológico (maligno e benigno), observamos uma diferença significativa nas neoplasias de células redondas malignas na sobrevida de 4 meses ($p=0,010$) (Figura 3A) e com a correlação linear simples moderada e negativa ($p= 0,007$; $R^2= -0,559$) (Figura 3B), e nas mesenquimais malignas com sobrevida de 16 meses ($p=0,027$) (Figura 3C).

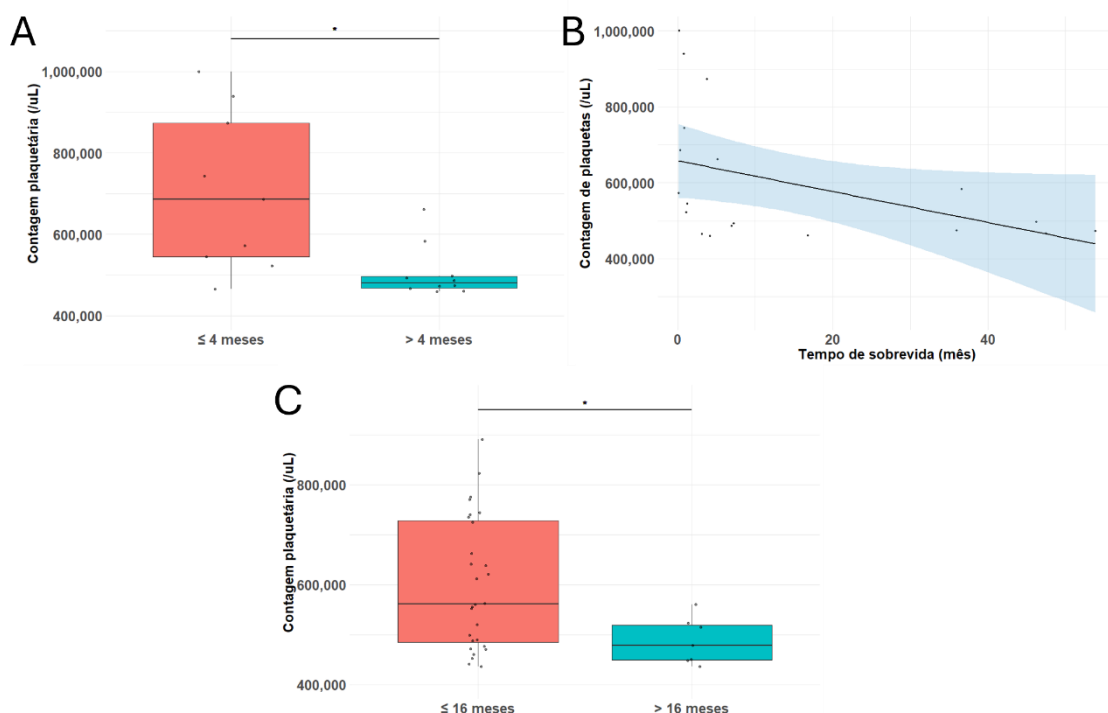


Figura 3: Análise de contagem plaquetária em animais com trombocitose e neoplasia de acordo com o citotipo/histogênese e comportamento biológico em relação ao tempo de sobrevida. A. Boxplot demonstrando que pacientes com neoplasias de células redondas malignas com tempo de sobrevida menor ou igual à 4 meses apresentam maior contagem plaquetária (686.000; 545.000-873.000) que pacientes com tempo de sobrevida maior que 4 meses (480.000; 467.750-496.318) ($p=0,01$). B. Gráfico de dispersão. Correlação linear simples moderada e negativa entre a contagem plaquetária e tempo de sobrevida (mês) em pacientes com neoplasias de células redondas malignas e trombocitose ($r = -0,559$; $p=0,007$). C. Boxplot demonstrando que pacientes com neoplasias mesenquimais malignas com tempo de sobrevida menor ou igual à 16 meses apresentam maior contagem plaquetária (562.000; 488.000-735.000) que pacientes com tempo de sobrevida maior que 16 meses (479.000; 449.000-519.050) ($p=0,027$).

Para a análise relacionada aos diagnósticos específicos, foram avaliadas somente as neoplasias mais prevalentes do nosso estudo, representando 56% de todas as neoplasias analisadas: carcinoma mamário ($n=45$) carcinoma de células escamosas ($n=14$), mastocitoma ($n=16$), sarcoma ($n=11$) e hemangiossarcoma ($n=10$).

Para esses conjuntos de dados, foi analisado, além da trombocitose e sua intensidade, os parâmetros hematológicos como o hematócrito, contagem total de leucócitos e contagem de neutrófilos segmentados.

Para o carcinoma mamário, demonstrou-se que a intensidade da trombocitose não tem diferença significativa na sobrevida dos cães em nenhum dos tempos avaliados. Entretanto, observou-se que o hematócrito apresentou separação com diferença significativa em um tempo de 9 meses ($p=0,047$), sendo que animais com sobrevida ≤ 9 meses apresentaram um hematócrito de 36% (30.75-42.25%) e >9 meses, 42% (39 a 46%) (Figura 4A). Foi observado correlação simples linear moderada e positiva entre o hematócrito e o tempo de sobrevida ($p=0,003$; $r=0,429$) (Figura 4D), portanto, animais com maior hematócrito, apresentaram um maior tempo de sobrevida.

Já o efeito da contagem de leucócitos totais e neutrófilos segmentados, revelaram uma separação com diferença significativa em ambos com um tempo de 6 meses. Os animais com a sobrevida ≤ 6 meses apresentaram uma contagem de leucócitos totais 18.050/ μL (12.225 a 21.175/ μL), e neutrófilos segmentados 15.050/ μL (9.000 a 24.725/ μL). Enquanto pacientes que sobreviveram mais de 6 meses, 11.800 (10.150 a 17.550/ μL) e 9.800/ μL (7.100 a 13.600/ μL), respectivamente (Figura 4B-C).

Além disso, observou-se uma correlação linear simples moderada e negativa para contagem de leucócitos ($p= 0,018$; $r= -0,349$) e neutrófilos segmentados ($p= 0,011$; $r= -0,372$) (Figura 4D), indicando que quanto maior a contagem desses parâmetros em cadelas com carcinoma mamário e trombocitose, menor é a sobrevida.

Foi realizado uma análise de razão de chance para o menor tempo obtido (6 meses), em que foi possível identificar que cadelas com carcinoma mamário e trombocitose, apresentando qualquer outro parâmetro hematológico alterado (anemia, leucocitose ou neutrofilia) apresentavam sete vezes mais chance de evoluir ao óbito em um tempo ≤ 6 meses ($p=0,034$; OR = 7,36) do que os cães com carcinoma e nenhuma outra alteração hematológica que não a trombocitose (Figura 4E). Entretanto, a análise para cada um desses parâmetros

hematológicos individualmente e a intensidade da trombocitose, não apresentaram significância estatística.

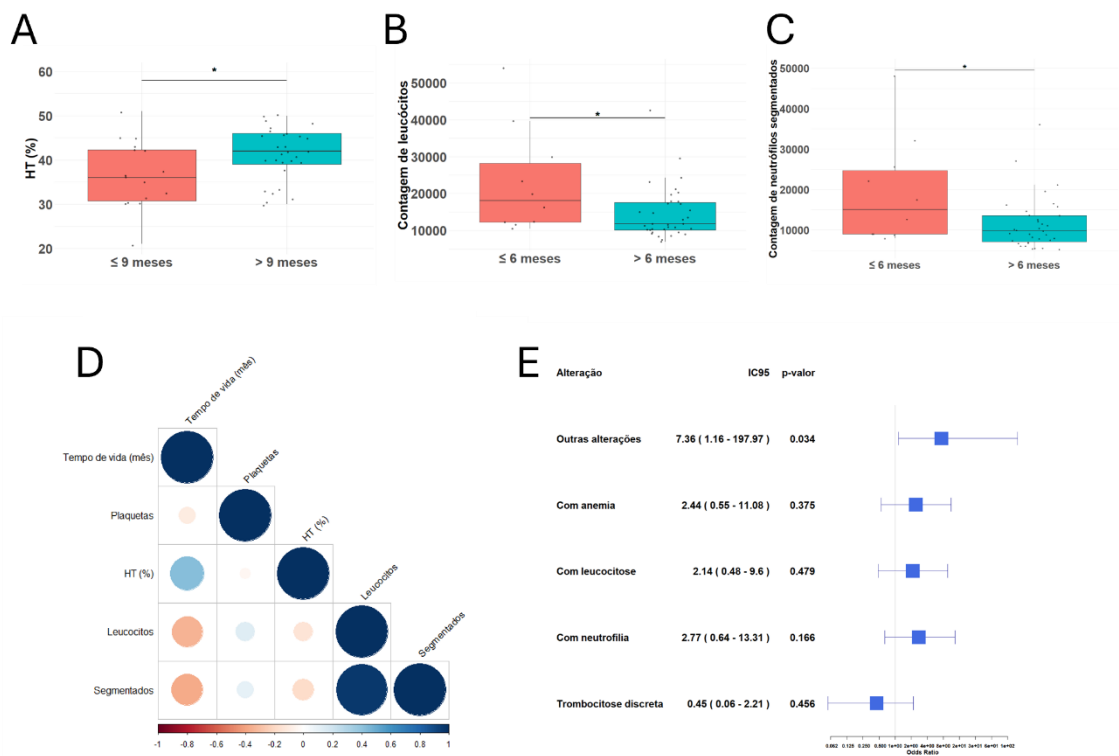


Figura 4: Análise dos parâmetros hematológicos em pacientes com carcinoma mamário em relação ao tempo de sobrevida. A. Boxplot demonstrando que pacientes com carcinoma mamário com tempo de sobrevida menor ou igual à 9 meses apresentam menor HT(%) (36; 30,75-42,25) que pacientes com tempo de sobrevida maior que 9 meses (42;39-46) ($p=0,047$). B. Boxplot demonstrando que pacientes com carcinoma mamário com tempo de sobrevida menor ou igual à 6 meses apresentam maior contagem de leucócitos (18.050; 12.225-28.175) que pacientes com tempo de sobrevida maior que 6 meses (11.800; 10.150-17.550) ($p=0,029$). C. Boxplot demonstrando que pacientes com carcinoma mamário com tempo de sobrevida menor ou igual à 6 meses apresentam maior contagem de neutrófilos segmentados (15.050; 9.000-24.725) que pacientes com tempo de sobrevida maior que 6 meses (9.800; 7.100-13.600) ($p=0,047$). D. Análise de correlação. O tamanho do círculo indica a intensidade de correlação. Cores vermelhas indicam correlação negativa e cores azuis, correlação positiva. Foi observado correlação linear simples moderada e positiva entre o hematócrito e o tempo de sobrevida ($r=0,429$; $p=0,003$) e correlação simples linear e negativa entre a contagem de leucócitos ($r= -0,349$; $p= 0,018$) e contagem de neutrófilos segmentados ($r= -0,372$; $p= 0,011$). E – Forestplot da análise de razão de chances em pacientes com carcinoma mamário para os parâmetros hematológicos em relação ao tempo de sobrevida menor ou igual à 6 meses. Observa-se que animais com carcinoma mamário, trombocitose e pelo menos mais alguma alteração hematológica apresentam 7,36 vezes mais chances de evoluir à óbito em tempo menor ou igual à 6 meses ($p=0,034$), porém, na análise individual de cada alteração, não foi observado valores significativos.

De forma semelhante, em animais com carcinoma de células escamosas, a trombocitose não apresentou diferença significativa na sobrevida dos cães em nenhum dos tempos avaliados. Porém, foi observado que somente o hematócrito

foi capaz de separar em grupos com diferença significativa, sendo o menor tempo de 9 meses ($p=0,029$) (Figura 5A).

Esses pacientes que apresentaram tempo de sobrevida ≤ 9 meses tinham hematócrito de 26% (24 a 32%) e >9 meses com 42% (32.5 a 49.5%). A correlação linear foi moderada e positiva ($p=0,006$; $r=0,684$), demonstrando que quanto maior o valor do hematócrito, maior foi a sobrevida (Figura 5B). Na análise de razão de chances, nenhum resultado apresentou valor significativo.

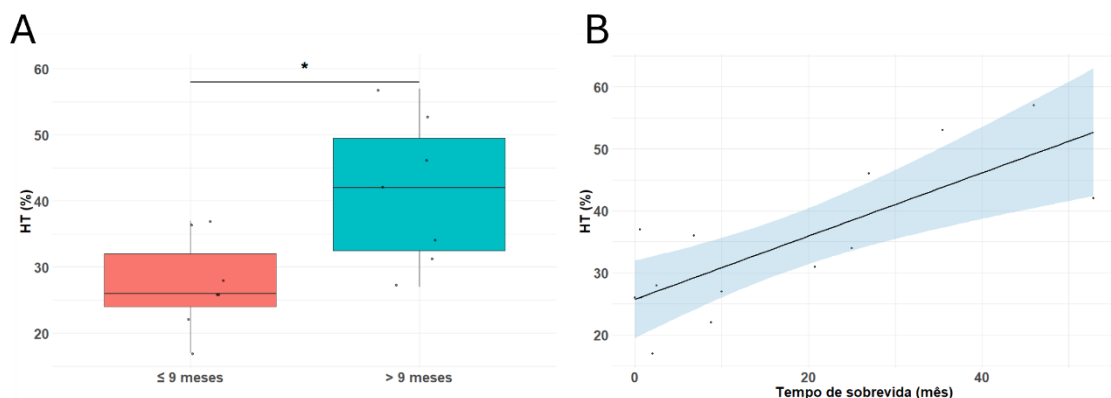


Figura 5: Análise de hematócrito em animais com trombocitose e carcinoma de células escamosas em relação ao tempo de sobrevida. A. Boxplot demonstrando que pacientes com CCE com tempo de sobrevida menor ou igual à 9 meses apresentam maior hematócrito (%) (26; 24-32) que pacientes com tempo de sobrevida maior que 9 meses (42; 32,5-49,5) ($p=0,029$). B. Gráfico de dispersão. Correlação linear simples moderada e positiva entre a hematócrito e tempo de sobrevida (mês) em pacientes com neoplasias malignas e trombocitose ($r = 0,684$; $p=0,006$).

Nos animais com diagnóstico de mastocitoma, observou-se uma tendência ($p=0,054$) no menor tempo avaliado (4 meses) (Figura 6A), por outro lado, o hematócrito foi capaz de separar em grupos com diferença significativa nesse mesmo tempo ($p=0,014$), em que pacientes que tiveram tempo de sobrevida ≤ 4 meses apresentaram hematócrito de 34% (31.5 a 34.5) enquanto, pacientes com tempo >4 meses, 41% (38 a 44%) (Figura 6B). A correlação linear foi moderada e positiva ($p= 0,010$; $r= 0,616$) (Figura 6D).

Além disso, a contagem de neutrófilos segmentados também separou os grupos, de forma significativa, com o menor tempo de 7 meses ($p=0,029$). Animais com sobrevida ≤ 7 meses apresentavam contagem de $12.600/\mu\text{L}$ (11.750 a $24.725/\mu\text{L}$) e >7 meses de $9.800/\mu\text{L}$ (7.100 a $13.000/\mu\text{L}$) (Figura 6C).

A análise de razão de chances, agrupando esses animais com o menor tempo de sobrevida obtido (4 meses), revelou que, dentre os parâmetros

analisados, somente a intensidade da trombocitose apresentava um impacto no desfecho desse paciente, indicando que animais com trombocitose discreta apresentavam uma menor chance (OR = 0,07; $p=0,04$) de evoluir à óbito em um tempo ≤ 4 meses (Figura 6E).

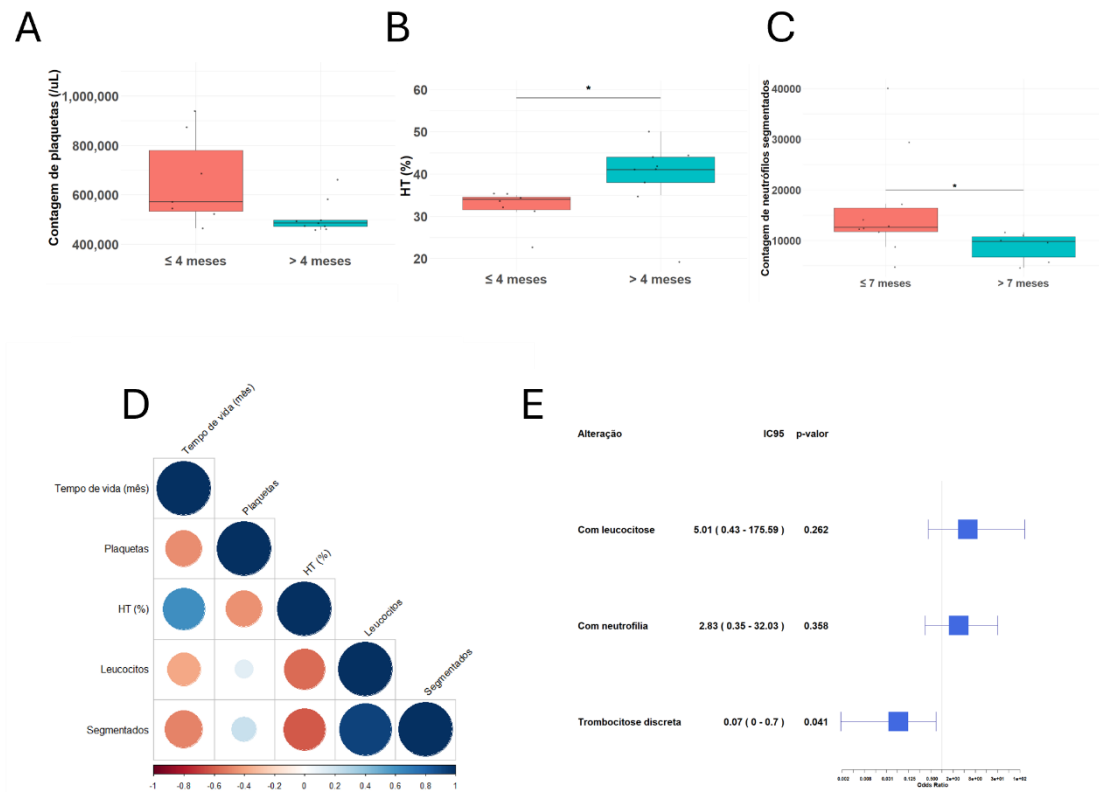


Figura 6: Análise dos parâmetros hematológicos em pacientes com mastocitoma em relação ao tempo de sobrevida. A. Boxplot demonstrando tendência dos pacientes com mastocitoma em apresentarem tempo de sobrevida menor ou igual à 4 meses e apresentam maior contagem plaquetária (572.000; 533.837-779.500) que pacientes com tempo de sobrevida maior que 4 meses (486.000; 473.000-497.425) ($p=0,054$). B. Boxplot demonstrando que pacientes com mastocitoma com tempo de sobrevida menor ou igual à 4 meses apresentam menor hematócrito (%) (34; 31,5-34,5) que pacientes com tempo de sobrevida maior que 4 meses (41; 38-44) ($p=0,014$). C. Boxplot demonstrando que pacientes com mastocitoma com tempo de sobrevida menor ou igual à 7 meses apresentam maior contagem de neutrófilos segmentados (12.600; 11.750-16.425) que pacientes com tempo de sobrevida maior que 7 meses (9.800; 6.675-10.750) ($p=0,029$). D. Análise de correlação. O tamanho do círculo indica a intensidade de correlação. Cores vermelhas indicam correlação negativa e cores azuis, correlação positiva. Foi observado correlação linear simples moderada e positiva entre o hematócrito e o tempo de sobrevida ($r=0,616$; $p=0,01$) enquanto houve uma tendência de correlação simples linear e negativa entre a contagem plaquetária ($r= -0,461$; $p= 0,07$) e contagem de neutrófilos segmentados ($r= -0,493$; $p= 0,052$). E – Forestplot da análise de razão de chances em pacientes com mastocitoma para os parâmetros hematológicos em relação ao tempo de sobrevida menor ou igual à 4 meses. Observa-se que animais com mastocitoma apresentando trombocitose discreta tem menor chance de evoluir à óbito em tempo menor ou igual à 4 meses (OR = 0,07; $p=0,041$). Os demais parâmetros não apresentaram valores significativos ou apresentavam na tabela de contingência pelo menos um valor zero (Outras alterações e anemia).

Animais com hemangiossarcoma apresentaram tempo de sobrevida ≤ 15 meses quando apresentavam contagem plaquetária de 638.000 (540.000 a

742.000) e maior tempo de sobrevida quando a contagem plaquetária era de 448.000 (442.000 a 449.000) ($p=0,016$) (Figura 7A), porém não houve correlação significativa entre nenhum parâmetro. A análise de razão de chances também não apresentou resultados significantes.

Em animais com diagnóstico de sarcoma o efeito das contagens dos leucócitos totais ($p=0,017$) e de neutrófilos segmentados ($p=0,017$) revelaram em ambos uma separação significativa em ≤ 4 meses, valores de contagem de leucócitos e neutrófilos segmentados de 17.200/ μL (16.100 a 20.850/ μL) e 14.350/ μL (12.900 a 18.350/ μL), respectivamente, em animais com tempo de sobrevida ≤ 4 meses (Figura 7B).

Os animais com sobrevida >4 meses obtiveram contagem de leucócitos totais de 10.900/ μL (9.700 a 14.400/ μL) e neutrófilos segmentados de 9.300/ μL (7.400 a 10.400/ μL) (Figura 7C). Além disso, na contagem total de leucócitos foi obtido uma correlação linear simples moderada e negativa ($p=0,018$; $r=-0,709$) e na contagem de neutrófilos segmentados ($p=0,016$; $r=-0,718$), demonstrando serem inversamente proporcional ao tempo de sobrevida. Na análise de razão de chances, nenhum resultado apresentou valor significativo (Figura 7D).

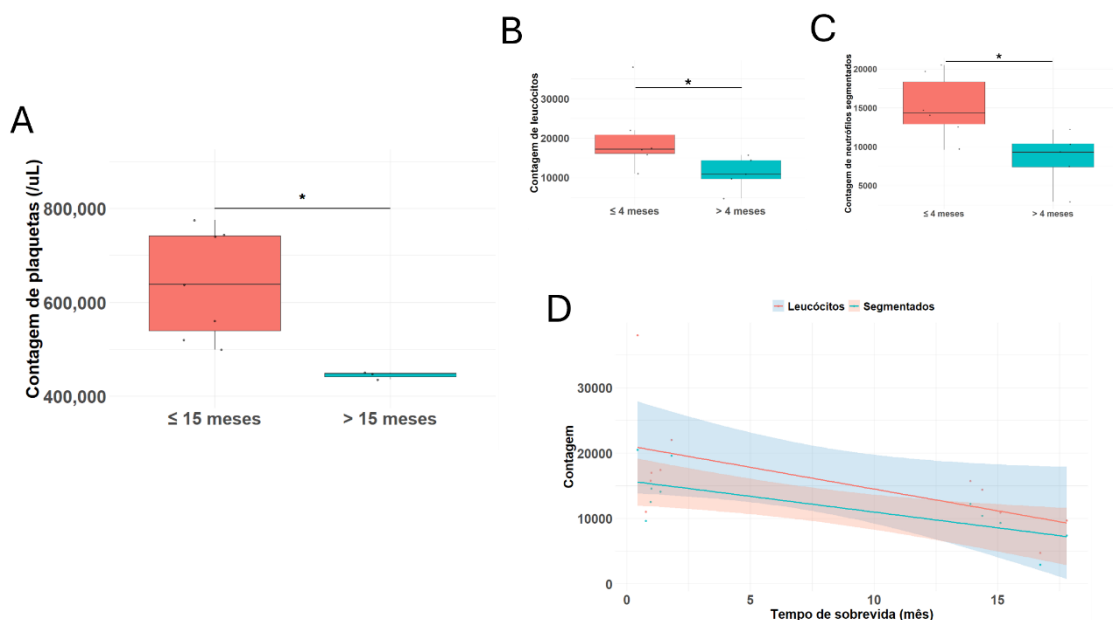


Figura 7: Análise de parâmetros hematológicos em animais com trombocitose e hemangiossarcoma ou sarcoma em relação ao tempo de sobrevida. A. Boxplot demonstrando que pacientes com hemangiossarcoma com tempo de sobrevida menor ou igual à 15 meses apresentam maior contagem plaquetária (638.000; 540.000-742.000/ μL) que pacientes com tempo de sobrevida maior que 15 meses (448.000; 442.000-449.000/ μL) ($p=0,016$). B. Boxplot demonstrando que pacientes com sarcoma com tempo de sobrevida menor ou igual à 4 meses

apresentam maior contagem leucócitos (17.200; 16.100-20.850/ μ L) que pacientes com tempo de sobrevida maior que 4 meses (10.900; 9.700-14.400/ μ L) ($p=0,014$). C. Boxplot demonstrando que pacientes com sarcoma com tempo de sobrevida menor ou igual à 4 meses apresentam maior contagem de neutrófilos segmentados (14.350; 12.900-18.350/ μ L) que pacientes com tempo de sobrevida maior que 4 meses (9.300; 7.400-10.400/ μ L) ($p=0,035$). D. Gráfico de dispersão. Correlação simples linear moderada e negativa entre a contagem de leucócitos e tempo de sobrevida (mês) ($p= 0,018$; $r= -0,709$) e contagem de neutrófilos segmentados e tempo de sobrevida (mês) ($p= 0,016$; $r= -0,718$) em pacientes com sarcoma e trombocitose.

6. DISCUSSÃO

Nosso estudo demonstrou associação entre a intensidade da trombocitose e sobrevida de cães com neoplasias de comportamento maligno, em que, quanto maior a intensidade da trombocitose menor foi a sobrevida ($p= 0,025$; $r= -0,18$), revelando que a intensidade da trombocitose pode ser um fator prognóstico importante em cães com diagnóstico de neoplasia maligna.

Na medicina humana esta associação já é uma realidade a ser considerada como fator de mau prognóstico para pacientes com câncer (Symbas et al., 2000; Bensalah et al., 2006; Bonardi et al., 2010). Inclusive, no estudo de Bornardi et al. (2010) foi demonstrado que a contagem de plaquetas aumentadas no pré-operatório tende a ser útil para identificar pacientes com prognóstico desfavorável. Além disso, o aumento da contagem de plaquetas foi revelado como um preditor de câncer em pacientes com malignidade oculta (Bailey et al., 2017).

Em humanos, como demonstrado no estudo de Balamurugan et al. (2021), as neoplasias malignas podem se beneficiar de fatores angiogênicos e de crescimento celular/tecidual das plaquetas, como o componente do grânulo alfa das plaquetas, o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF). Durante o processo de ativação plaquetária, esse componente é secretado e atua como potente fator pró-angiogênico (Manzat Saplacan et al., 2017).

Os PDGF são expressos em vários tipos celulares e tecidos tumorais malignos e demonstrou-se participar da proliferação, angiogênese, migração e invasão de muitos tumores, especialmente tumores malignos (Balamurugan et al., 2021). A alta expressão dos PDGF em neoplasias pode causar resistência à terapia, enquanto sua inibição suprime a proliferação, metástase, invasão e angiogênese do câncer (Thies et al., 2021).

Na medicina humana, novos métodos terapêuticos surgiram a partir da via PDGF para tratamento de câncer e a maioria dos medicamentos demonstrou ser eficaz e tolerado, entretanto outros compostos demonstraram ter menos eficácia e exibiram potenciais toxicidades em ensaios clínicos (Zou *et al.*, 2022).

Quando avaliamos os grupos estratificando, não somente ao comportamento tumoral, mas também com sua origem, foi possível observar que, dentre os citotipos/histogêneses avaliados, a contagem plaquetária teve maior influência em neoplasias redondas, especialmente as de comportamento maligno ($p=0,007$; $r=-0,559$), que compuseram 82,6% das neoplasias redondas obtidas, podendo isso ter influenciado os resultados quando não estratificado o comportamento.

Além disso, é possível observar que nas análises de comparação desses grupos, em ambos os casos, pacientes com melhor prognóstico apresentaram, em sua maioria contagem plaquetária abaixo de $500.000/\mu\text{L}$, indicando que para essas neoplasias, as trombocitoses moderadas a acentuadas têm um efeito negativo no prognóstico desses pacientes.

Diante dessas análises, identificamos que o mastocitoma foi a neoplasia mais prevalente das neoplasias de células redondas (69,5%). A análise individual para esse único diagnóstico, demonstrou uma tendência ($p=0,054$) na capacidade de separar os animais com tempo de sobrevida $\leq$ ou $>$ que quatro meses de acordo com a contagem plaquetária, sendo novamente observado que pacientes com trombocitose discreta ($<500.000/\mu\text{L}$) apresentavam melhor prognóstico.

Tal fato é comprovado na análise de razão de chance, demonstrando que pacientes com trombocitose discreta têm 0,07 menos chances de evoluir a um prognóstico desfavorável (≤ 4 meses), indicando a importância da análise desse parâmetro em pacientes com mastocitoma.

Atualmente na literatura, existem resultados dúbios referente a prevalência de trombocitose em cães com mastocitoma, como no estudo de Amaral *et al.* (2016) cinco dos seis casos de mastocitoma apresentaram contagens de plaquetas dentro dos valores de referência e apenas um apresentava trombocitose discreta.

Já nos estudos de Neel et al. (2012) e Hammer *et al.* (1991), a trombocitose esteve presente principalmente em neoplasias de células redondas, dentre elas o mastocitoma, porém, os cães destes estudos faziam uso de corticoide, sendo um medicamento que promove o aumento da contagem de plaquetas pela diminuição da fagocitose dos macrófagos (Pete W. Christopherson; Marjory B. Brooks, 2022).

Por outro lado, nenhum desses estudos avaliaram o impacto da trombocitose nesses pacientes, corroborando com a necessidade de realização de mais estudos para compreender a relação prognóstica entre a trombocitose e o mastocitoma canino, uma vez que o mastocitoma é uma das neoplasias de células redondas mais prevalentes na rotina clínica de pequenos animais (Withrow e Macewen's, 2020).

Em cães com o citotipo/histogênese de neoplasia epitelial, foi evidenciado que a contagem plaquetária em cães com trombocitose também apresentava uma capacidade de separação dos animais, porém, nesse caso, a separação foi de um tempo mínimo de 17 meses (um ano e cinco meses).

Avaliando essas neoplasias quanto o comportamento tumoral, benignas e malignas, não foi identificado diferença significativa em nenhum tempo analisado, indicando que esse parâmetro isolado pode não representar importância prognóstica nesses tumores.

A maioria das neoplasias epiteliais avaliadas neste estudo foram de origem mamária, sendo o carcinoma mamário o mais prevalente (50,5%). Observamos que o prognóstico dos animais com carcinoma mamário frente a intensidade da trombocitose também não apresentou associação.

Nesse contexto, a intensidade de trombocitose pode não ser um parâmetro hematológico relevante para essa neoplasia, por outro lado, ainda deve-se considerar que não comparamos grupos de pacientes sem trombocitose, e por essa razão, estudos voltados a presença ou não de trombocitose nesses pacientes devem ser realizados.

Além disso, mais da metade dos diagnósticos de carcinoma mamário da nossa pesquisa foram diagnosticados por meio do exame citopatológico, uma técnica conhecida por sua menor acurácia em comparação ao exame

histopatológico para esse tipo de neoplasia (Cuellar *et al.*, 2024). Provavelmente, a não concordância desses diagnósticos pode ter influenciado nos resultados, ou seja, animais que foram classificados como carcinoma no exame citopatológico, podem ser na verdade adenomas, visto que, a inflamação pode promover displasias celulares e consequentemente, resultados equivocados (Raskin, 2012). Por utilizarmos também fichas de animais com apenas o diagnóstico citopatológico no nosso estudo, ocorre limitações na precisão diagnóstica dessas neoplasias.

Na medicina humana, pacientes com câncer de mama tiveram pior prognóstico e apresentaram sobrevida de um ano apresentando trombocitopenia, provavelmente devido a coagulopatia de consumo crônico (Garmi *et al.*, 2022). Já nos estudos encontrados na medicina veterinária de Grindem *et al.* (1994) e Ribas *et al.* (2015) a ocorrência de trombocitose em cadelas com carcinoma e adenocarcinoma mamário foi mais comumente encontrada, quando comparada com a presença de trombocitopenia.

A partir dos diagnósticos específicos das neoplasias de origem epitelial, o carcinoma mamário e o carcinoma de células escamosas, revelaram que a presença de hematócritos menores nos cães com trombocitose está associada a um pior prognóstico, com a menor sobrevida de ambas ≤ 9 meses, quando comparada com os animais com hematócritos maiores (> 9 meses). Os animais do nosso estudo com os maiores hematócritos apresentaram maior tempo de sobrevida ($p=0,003$; $r=0,429$ / $p=0,006$; $r=0,684$). Destaca-se que, todos animais com o diagnóstico de carcinoma de células escamosas que tiveram a menor sobrevida, apresentavam anemia.

No carcinoma mamário, a maioria dos animais que apresentaram contagens mais elevadas de leucócitos e neutrófilos segmentados apresentaram uma sobrevida ≤ 6 meses, quando comparado com os animais com menores contagens (> 6 meses). Já nos animais com carcinoma de células escamosas, esses parâmetros não apresentaram relevância na sobrevida, provavelmente, devido ao baixo número de casos, sendo necessário mais estudos sobre.

No estudo de Silva *et al.* (2014) as cadelas que estavam em estádios mais avançado de neoplasia mamária apresentaram anemia e/ou leucocitose por

neutrofilia, assim como, essas foram as alterações mais encontradas no estudo recente com cadelas diagnosticadas com neoplasias mamárias (Caixeta, Souza e Wanderley, 2022).

Essas alterações hematológicas podem ser ocasionadas por efeito de síndromes paraneoplásicas, sendo uma consequência da ação indireta das células neoplásicas que secretam substâncias como citocinas (IL-1, IL-6 e TNF) e fatores de crescimento, desencadeando mecanismos como o sequestro de ferro, redução de meia vida das hemácias e redução da secreção de eritropoietina tal como ocorre na anemia da inflamação ou da doença crônica, que está comumente associada ao câncer (Stockham, 2008).

Além disso, as células neoplásicas são responsáveis também pela indução de fatores estimuladores de granulócitos e macrófagos (G-CSF e GM-CSF) promovendo estímulo à medula óssea e consequentemente o aumento de leucócitos na corrente sanguínea (Behling-Kelly, 2011)

Essas alterações são importantes para melhor direcionar o prognóstico de pacientes, tal como foi determinado no estudo com linfoma, em que a presença de neutrofilia afetou negativamente a taxa de resposta e o tempo de sobrevivência livre de progressão de cães com linfoma (Veluvolu, Pellin e Vos, 2021).

Portanto, os animais com carcinoma mamário, trombocitose e qualquer outro parâmetro hematológico alterado apresenta sete vezes mais chance de evoluir a óbito em um tempo ≤ 6 meses ($p=0,034$; $OR=7,36$), ao comparar com os animais que apresentavam apenas trombocitose.

Em cães com trombocitose e neoplasia de citotipo/histogênese mesenquimal maligna, a contagem plaquetária demonstrou capacidade de separar os pacientes em um período mínimo de 16 meses ($p=0,027$). Dentre esses, os sarcomas não apresentaram uma associação significativa como um grupo diagnóstico específico, o que pode ter sido influenciado pela metodologia adotada, na qual tumores de tecido mole e sarcomas pouco diferenciados de diferentes localizações (por exemplo, cutâneo, ocular e ósseo) foram agrupados sob o mesmo diagnóstico de sarcoma. Idealmente, os tumores deveriam ser classificados com base em exames histopatológicos e/ou imuno-histoquímicos e categorizados conforme sua localização anatômica. No entanto, o número

limitado de casos em nosso estudo impediu que essa avaliação fosse realizada de forma separada. Dessa forma, os resultados obtidos podem apresentar algumas limitações, enfatizando a necessidade de investigações adicionais para proporcionar uma avaliação prognóstica mais precisa.

Já os animais com hemangiossarcoma apresentaram sobrevida ≤ 15 meses, quando apresentavam maior contagem plaquetária ($p=0,016$). No estudo de Asa et al (2012) foi evidenciado que cães com hemangiossarcoma demonstravam alta expressão de receptores dos fatores de crescimento derivado de plaquetas, principalmente o do tipo beta (PDGFR- β), e esta condição está comumente associada à progressão de tumores.

A partir da ativação dos receptores PDGFRs eventos moleculares podem ser desencadeados, como a estimulação do crescimento celular, reorganização da actina, inibição da comunicação intercelular, sendo processos essenciais para a modulação da resposta celular e consequentemente, contribuindo para a progressão do tumor (Heldin e Westermark, 1999).

A expectativa de vida de cães diagnosticados com hemangiossarcoma é influenciada pelo local do tumor, com variações significativas dependendo do órgão afetado (Page e Thrall, 2004). No nosso estudo, a prevalência do hemangiossarcoma foi predominantemente observada na região cutânea (9/10), enquanto apenas um caso foi identificado no baço.

O comportamento biológico do hemangiossarcoma não visceral é influenciado pela localização do tumor (cutâneo, subcutâneo e muscular) e pelo grau de invasão do tecido, sendo o estadiamento clínico um fator prognóstico crucial para determinar a gravidade e a evolução da doença (Nardi, De et al., 2023).

No estudo realizado por Szivek et al. (2011) de forma retrospectiva, demonstrou que cães diagnosticados com HSAs cutâneas que foram submetidos exclusivamente a tratamento cirúrgico apresentaram uma sobrevida global que variou entre 25 e 32 meses. Já pacientes com hemangiossarcoma esplênico, tratados com esplenectomia, apresentou sobrevida de um ano e seis meses (Wendelburg et al., 2015).

Entretanto, mais estudos devem ser realizados para entender a influência plaquetária em animais com trombocitose e o diagnóstico de hemangiossarcoma, visto que, em nosso estudo conseguimos separar os animais em um menor tempo de sobrevida ao comparar com outros estudos, ressaltando que a contagem plaquetária pode ser mais um parâmetro importante para avaliar o prognóstico desses pacientes.

Já nos animais com trombocitose e com o diagnóstico final de sarcoma, apenas nas contagens de leucócitos totais e de neutrófilos segmentados revelaram, em ambos, o tempo de sobrevida ≤ 4 meses, quando apresentava maior contagem plaquetária ($p=0,017$). Tal qual, demonstraram que quanto maior eram suas contagens, menor era a sobrevida ($p=0,021$; $r= -0,809$).

Estudos na medicina humana ressaltaram que a presença de contagens elevadas de neutrófilos em pacientes com diferentes neoplasias, está associada a resultados prognósticos desfavoráveis. Isso sugere que essas células podem desempenhar um papel significativo na promoção do crescimento tumoral (Dumitru, Lang e Brandau, 2013; Swierczak et al., 2015).

Portanto, o foco de estudo da medicina humana tornou-se necessário entender os mecanismos que modulam as mudanças na biologia e nas funções dos neutrófilos no contexto do microambiente tumoral (Singhal et al., 2024).

A elucidação desses mecanismos pode abrir novas perspectivas para intervenções terapêuticas e estratégias de tratamento mais eficazes, tal como, já estão fazendo com as plaquetas (Li et al., 2024).

7. CONCLUSÕES

A intensidade da trombocitose representa um importante indicador prognóstico em cães com neoplasias malignas, principalmente no mastocitoma e no hemangiossarcoma. Além disso, a trombocitose pode ser correlacionada com uma menor sobrevida com outras alterações hematológicas, como anemia, leucocitose e neutrofilia, promovendo novas perspectivas prognósticas na medicina veterinária.

8. BIBLIOGRAFIA

- ATHANASIOU, L. V. *et al.* Magnitude of reactive thrombocytosis and associated clinical conditions in dogs. **Veterinary Record**, v. 181, n. 10, 9 set. 2017.
- BAILEY, S. E. R. *et al.* **How useful is thrombocytosis in predicting an underlying cancer in primary care? A systematic review** *Family Practice* Oxford University Press, , 1 fev. 2017.
- BALAMURUGAN, K. *et al.* Structural insights into the modulation of PDGF/PDGFR- β complexation by hyaluronan derivatives. **Biological Chemistry**, v. 402, n. 11, p. 1441–1452, 1 out. 2021.
- BAMBACE, N. M.; HOLMES, C. E. **The platelet contribution to cancer progression** *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, fev. 2011.
- BARANYAI, Z. *et al.* **Paraneoplastic thrombocytosis in gastrointestinal cancer** *Platelets* Taylor and Francis Ltd, , 18 maio 2016.
- BEHLING-KELLY, E. **Paraneoplastic production of GM-CSF** *Veterinary Clinical Pathology*, jun. 2011.
- BENSALAH, K. *et al.* Prognostic value of thrombocytosis in renal cell carcinoma. **Journal of Urology**, v. 175, n. 3, p. 859–863, mar. 2006.
- BLAY, J.-Y. *et al.* **ROLE OF INTERLEUKIN-6 IN THE PARANEOPLASTIC INFLAMMATORY SYNDROME ASSOCIATED WITH RENAL-CELL CARCINOMA** *Int. J. Cancer*. [s.l.] Wiley-Liss, Inc, 1997.
- BONARDI, R. DE A. *et al.* Trombocitose como fator prognóstico no câncer colorretal. **Revista Brasileira de Coloproctologia**, v. 30, n. 2, p. 128–133, jun. 2010.
- BUERGY, D. *et al.* **Tumor-platelet interaction in solid tumors** *International Journal of Cancer*, 15 jun. 2012.
- CAIXETA, M. L. DE D.; SOUZA, M. A. DE; WANDERLEY, B. A. Alterações no hemograma de cadelas diagnosticadas com neoplasias mamárias atendidas no Centro Clínico Veterinário do UNIPAM. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 1, p. e39311125064, 9 jan. 2022.
- CEDERVALL, J.; HAMIDI, A.; OLSSON, A. K. Platelets, NETs and cancer. **Thrombosis Research**, v. 164, p. S148–S152, 1 abr. 2018.
- CHENEY, A. *et al.* Interleukin-6 and thrombopoietin concentrations in dogs with carcinoma with and without thrombocytosis. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 36, n. 1, p. 227–233, 1 jan. 2022.
- CHENG, J. *et al.* **The association of pretreatment thrombocytosis with prognosis and clinicopathological significance in cervical cancer: a**

systematic review and meta-analysisOncotarget. [s.l: s.n.]. Disponível em:
<www.impactjournals.com/oncotarget/>.

CHILDRESS, M. O. **Hematologic Abnormalities in the Small Animal Cancer PatientVeterinary Clinics of North America - Small Animal Practice**, jan. 2012.

Coagulograma de 35 cadelas com neoplasias mamárias. [s.d.].

CUELLAR, P. A. M. *et al.* Breast carcinoma in a dog: sensitivity and specificity between cytopathology and histopathology. **Brazilian Journal of Veterinary Medicine**, v. 46, p. e003024, 2024.

DEMKOW, U. **Neutrophil extracellular traps (NETs) in cancer invasion, evasion and metastasisCancersMDPI**, , 1 set. 2021.

DUMITRU, C. A.; LANG, S.; BRANDAU, S. **Modulation of neutrophil granulocytes in the tumor microenvironment: Mechanisms and consequences for tumor progressionSeminars in Cancer Biology**, jun. 2013.

FRANCO, A. T.; CORKEN, A.; WARE, J. Platelets at the interface of thrombosis, inflammation, and cancer. **Blood**, v. 126, n. 5, p. 582–588, 30 jul. 2015.

GADER, A. G. M. A. *et al.* The ultrastructure of camel blood platelets: A comparative study with human, bovine, and equine cells. **Platelets**, v. 19, n. 1, p. 51–58, fev. 2008.

GARMI, N. *et al.* Platelets and Breast Cancer. **Israel Medical Association Journal**, v. 22, 2022.

GAY, L. J.; FELDING-HABERMANN, B. **Contribution of platelets to tumour metastasisNature Reviews Cancer**, fev. 2011.

GRIVENNIKOV, S. I.; GRETEN, F. R.; KARIN, M. **Immunity, Inflammation, and CancerCell**, mar. 2010.

HAEMMERLE, M. *et al.* **The Platelet Lifeline to Cancer: Challenges and OpportunitiesCancer CellCell Press**, , 11 jun. 2018.

HAMMER, A. S. **HAEMATOLOGY INTERNATIONAL Original Article Thrombocytosis in Dogs and Cats: A Retrospective StudyComparative Haematology International.** [s.l: s.n.].

HELDIN, C.-H.; WESTERMARK, B. Mechanism of Action and In Vivo Role of Platelet-Derived Growth Factor. **Physiological Reviews**, v. 79, n. 4, p. 1283–1316, 10 jan. 1999.

HWANG, S.-J. Thrombocytosis: A paraneoplastic syndrome in patients with hepatocellular carcinoma. **World Journal of Gastroenterology**, v. 10, n. 17, p. 2472, 2004.

JANSSON, S. *et al.* The PDGF pathway in breast cancer is linked to tumour aggressiveness, triple-negative subtype and early recurrence. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 169, n. 2, p. 231–241, 1 jun. 2018.

KAUSHANSKY, K. **Historical review: megakaryopoiesis and thrombopoiesis.** [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://ashpublications.org/blood/article-pdf/111/3/981/1307322/zh800308000981.pdf>>.

KRÜGER AMARAL, D. VON *et al.* PLAQUETOMETRIA EM CÃES COM NEOPLASIA. **Archives of Veterinary Science**, v. 21, n. 4, 30 dez. 2016.

LI, S. *et al.* **The dynamic role of platelets in cancer progression and their therapeutic implications** *Nature Reviews Cancer* *Nature Research*, , 1 jan. 2024.

LIN, R. J.; AFSHAR-KHARGHAN, V.; SCHAFER, A. I. Paraneoplastic thrombocytosis: The secrets of tumor self-promotion. **Blood**, v. 124, n. 2, p. 184–187, 10 jul. 2014a.

_____. Paraneoplastic thrombocytosis: The secrets of tumor self-promotion. **Blood**, v. 124, n. 2, p. 184–187, 10 jul. 2014b.

MANTOVANI, A. *et al.* **Cancer-related inflammation** *Nature*, 24 jul. 2008.

MANZAT SAPLACAN, R. M. *et al.* **The Role of PDGFs and PDGFRs in Colorectal Cancer** *Mediators of Inflammation* *Hindawi Publishing Corporation*, , 2017.

MASUCCI, M. T. *et al.* **The Emerging Role of Neutrophil Extracellular Traps (NETs) in Tumor Progression and Metastasis** *Frontiers in Immunology* *Frontiers Media S.A.*, , 16 set. 2020.

NAKAMURA, Y. *et al.* PDGF-BB is a novel prognostic factor in colorectal cancer. **Annals of Surgical Oncology**, v. 15, n. 8, p. 2129–2136, ago. 2008.

NARDI, A. B. DE *et al.* **Diagnosis, Prognosis, and Treatment of Canine Hemangiosarcoma: A Review Based on a Consensus Organized by the Brazilian Association of Veterinary Oncology, ABROVET** *Cancers* *MDPI*, , 1 abr. 2023.

NEEL, J. A.; SNYDER, L.; GRINDEM, C. B. Thrombocytosis: A retrospective study of 165 dogs. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 41, n. 2, p. 216–222, jun. 2012.

NOZAWA, H.; CHIU, C.; HANAHAN, D. **Infiltrating neutrophils mediate the initial angiogenic switch in a mouse model of multistage carcinogenesis** *PNAS* **August**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0601807103>.

- OLSSON, A. K.; CEDERVALL, J. **The pro-inflammatory role of platelets in cancer** Platelets Taylor and Francis Ltd, , 18 ago. 2018.
- PLANTUREUX, L. *et al.* Effects of platelets on cancer progression. **Thrombosis Research**, v. 164, p. S40–S47, 1 abr. 2018.
- RASKIN, R. E. **Citologia clínica de cães & gatos Atlas colorido e guia de interpretação 2ª edição** Saunders Elsevier Charles River Preclinical Services. [s.l: s.n.].
- RIBEIRO, L. M. *et al.* **ALTERAÇÕES QUANTITATIVAS DAS PLAQUETAS EM PEQUENOS ANIMAIS: REVISÃO DE LITERATURA** Iana Vilela Resende 2. [s.l: s.n.].
- ROCHA, M. N. A. *et al.* Thrombocytosis: A retrospective study of 573 dogs (2016–2017). **Ciencia Animal Brasileira**, v. 20, 2019.
- SHU, C. *et al.* Revisiting the association between pretreatment thrombocytosis and cancer survival outcomes: an umbrella review of meta-analyses. **BMC cancer**, v. 24, n. 1, p. 1246, 1 dez. 2024.
- SILVA, A. H. C. DA *et al.* Alterações no hemograma de cadelas com neoplasia mamária. **Ciencia Animal Brasileira**, v. 15, n. 1, p. 87–92, 2014.
- SINGHAL, S. *et al.* Human Tumor–Associated Macrophages and Neutrophils Regulate Antitumor Antibody Efficacy through Lethal and Sublethal Trophocytosis. **Cancer Research**, v. 84, n. 7, p. 1029–1047, 1 abr. 2024.
- SWIERCZAK, A. *et al.* Neutrophils: important contributors to tumor progression and metastasis. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 34, n. 4, p. 735–751, 1 dez. 2015.
- SYMBAS, N. P. *et al.* **Poor prognosis associated with thrombocytosis in patients with renal cell carcinoma.** [s.l: s.n.].
- TAO, D. L. *et al.* Aspirin and antiplatelet treatments in cancer. **Blood**, v. 137, n. 23, p. 3201–3211, 10 jun. 2021.
- THIES, K. A. *et al.* Stromal Platelet–Derived Growth Factor Receptor- β Signaling Promotes Breast Cancer Metastasis in the Brain. **Cancer Research**, v. 81, n. 3, p. 606–618, 1 fev. 2021.
- THOMAS, M. R.; STOREY, R. F. The role of platelets in inflammation. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 114, n. 3, p. 449–458, 2015.
- TÍMÁR, J. *et al.* **Platelet-mimicry of cancer cells: Epiphenomenon with clinical significance** Oncology, set. 2005.

VELUVOLU, S.; PELLIN, M.; VOS, N. Evaluation of neutrophilia as a prognostic factor in dogs with multicentric lymphoma treated with a cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone–based chemotherapy protocol. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 259, n. 5, p. 494–502, 1 set. 2021.

WANG, Y. H. *et al.* The pretreatment thrombocytosis may predict prognosis of patients with colorectal cancer: A systematic review and meta-analysis. **Biomarkers in Medicine**, v. 11, n. 2, p. 195–210, 1 fev. 2017.

WENDELBURG, K. M. *et al.* Survival time of dogs with splenic hemangiosarcoma treated by splenectomy with or without adjuvant chemotherapy: 208 cases (2001–2012). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 247, n. 4, p. 393–403, 15 ago. 2015.

WOOLCOCK, A. D. *et al.* Thrombocytosis in 715 Dogs (2011–2015). **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 31, n. 6, p. 1691–1699, 1 nov. 2017.

ZOU, X. *et al.* **Targeting the PDGF/PDGFR signaling pathway for cancer therapy: A review** *International Journal of Biological Macromolecules* Elsevier B.V., , 31 mar. 2022.

Capítulo 3

Trabalho a ser enviado para revista “Veterinary and Comparative Oncology”, seguindo as seguintes normas: <https://onlinelibrary.wiley.com/page/journal/14765829/homepage/forauthors.html#submission>

Fator de Impacto: 2.3

Investigation of the intensity of thrombocytosis as a prognostic indicator of neoplasia in dogs

Letícia Souto¹ | Teng Fwu Shing¹ | Susana Vieira¹ | Regina Takahira¹

¹São Paulo State University (UNESP), Campus Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, Botucatu, Brazil

Correspondence: Letícia Souto (gondim.souto@unesp.br)

Keywords: Platelets, Cancer, Survival, Metastasis.

Abstract

Platelets are classically associated with hemostasis and thrombosis; however, studies in human medicine have highlighted another role related to their contribution to cancer progression. Thrombocytosis in human cancer patients is widely recognized as a poor prognostic factor; however, this association is rarely documented in veterinary medicine or may be potentially underreported. A total of 166 canine medical records from the Veterinary Hospital (HV) of the School of Veterinary Medicine and Animal Science – UNESP/Botucatu, spanning from 2014 to 2023, were selected. These records exhibited thrombocytosis, a diagnosis of neoplasia, and survival time information. Our study demonstrated that the intensity of thrombocytosis could serve as a prognostic indicator in malignant neoplasms, with a survival time of 15 months or less ($p = 0.045$), showing that higher platelet counts were associated with shorter survival ($r = -0.18$; $p = 0.025$). When evaluated by specific diagnoses, dogs with mast cell tumors presenting with mild thrombocytosis ($430\text{--}500,000/\mu\text{L}$) had a lower likelihood of dying within 4 months or less ($\text{OR} = 0.07$; $p = 0.041$), while patients with hemangiosarcoma and a survival time of 15 months or less showed higher platelet counts ($638,000/\mu\text{L}$) (range: $540,000$ to $742,000/\mu\text{L}$) ($p = 0.016$). The intensity of thrombocytosis represents a significant prognostic indicator in dogs with malignant neoplasms, particularly in mast cell tumors and hemangiosarcoma, thus providing new prognostic perspectives in veterinary medicine.

Introduction

Platelets are often viewed as cytoplasmic fragments involved only in hemostasis and thrombosis. However, in human medicine, another critical role has become evident: their contribution to cancer progression.

For this reason, platelets have emerged as a significant area of interest for prognostic and therapeutic investigations^{1,2} since it has revealed complex mechanisms and molecular interactions between neoplastic cells and circulating platelets, highlighting the influential role of platelets in neoplastic development and metastasis^{3,4}.

It is currently understood that one of the main mediators of reactive thrombocytosis is interleukin-6 (IL-6)⁵. This cytokine is secreted by tumor cells,

which stimulates the liver to produce TPO and consequently, to stimulate megakaryopoiesis and platelet genesis, promoting an increase in circulating platelet count⁶. The combination of these events contributes to thrombocytosis and hypercoagulability in cancer patients, known as Trousseau Syndrome⁷.

Platelet activation promotes the release of alpha granules, resulting in the stimulation of various factors that play a crucial role in tumor microenvironment. These elements can influence fundamental aspects of the tumor, such as cell growth, metastasis, angiogenesis, inflammation, and even the effectiveness of chemotherapy⁸.

The factors include vascular endothelial growth factor (VEGF), transforming growth factor (TGF- β), epidermal growth factor (EGF) and platelet-derived growth factor (PDGF), promoting growth, proliferation and differentiation of tumor cells⁹. The presence of high serum levels of PDGF are associated with a significantly higher degree of metastases and shorter survival in patients with breast cancer¹⁰ and has been proposed as a prognostic marker in colorectal cancer¹¹.

Concomitantly, the physical interaction between cancer cells and platelets can occur, primarily mediated by the adhesion molecule P-selectin. This interaction not only provides a physical barrier that protects cancer cells but also interferes with their recognition by natural killer (NK) cells¹². Additionally, platelets can transfer class I major histocompatibility complex (MHC) molecules to the surface of cancer cells, rendering them unrecognizable to the immune system, thereby impairing NK cell cytotoxicity and reducing IFN- γ production¹³.

Thrombocytosis in human cancer patients is widely recognized as a poor prognostic factor, characterized by an inverse correlation between increased platelet count and patient survival¹⁴. Studies have shown that this condition is associated with various types of cancer, including hepatic neoplasms¹⁵, gastrointestinal cancers^{16,17}, and cancers of the female reproductive system, such as cervical¹⁸ and ovarian neoplasms¹⁹.

Current research is focusing on understanding whether reducing platelet counts and/or inhibiting their function could block platelet-associated tumor progression^{20,21}.

From the study of Tao et al. (2021)²² it has been observed that medications that reduce platelet count or platelet activation may decrease cancer progression in humans and improve patient survival outcomes. In the study by Borsig et al. (2021)²³, human patients using aspirin for cardiovascular diseases showed a reduced risk of metastasis. Additionally, experimental models demonstrated that antiplatelet therapy with heparin reduced the likelihood of developing metastatic disease²⁴.

This association in veterinary medicine is rarely documented or potentially underreported²⁵. Based on retrospective studies in animals, thrombocytosis has been shown to be a commonly observed condition in dogs diagnosed with neoplasia^{26–30} although, its prognostic value across different types of neoplasms remains undetermined.

The research was motivated by the lack of information regarding the survival of dogs with neoplasia in relation to the severity of thrombocytosis across different neoplastic origins and behaviours. This gap in knowledge highlights the potential for future studies to guide new therapeutic interventions aimed at improving the survival of affected animals.

This study aims to determine whether there is a relationship between the severity of thrombocytosis in canine patients with neoplasia and survival time, similar to what has been observed in human patients.

Methods

Data collection

Medical records of canine patients from the Veterinary Hospital (HV) of the School of Veterinary Medicine and Animal Science – UNESP/Botucatu were requested for the period between 2014 and 2023. Records selected included cases with thrombocytosis ($>430,000/\mu\text{L}$)³¹ and animals with cytopathological and/or histopathological diagnoses of neoplasia.

Exclusion criteria included:

- Pharmacological or surgical treatments affecting platelet count:
 - Use of corticosteroids or chemotherapy;
 - Splenectomy.

- Incomplete or missing survival data.
- Animals that died from causes unrelated to the neoplasia.
- Neoplasms not fitting the proposed cytotypes (epithelial, mesenchymal, and round cell tumors).

Data organization and statistical analysis

For statistical analysis, the patients were subdivided as follows:

1. Biological Behavior Group: Patients were categorized as having benign or malignant neoplasms and evaluated in relation to survival time.
2. Cytotype/Histogenesis Group without Defined Biological Behavior: Cases were divided based on tumor origin (epithelial, mesenchymal, and round cell tumors) and survival time.
3. Cytotype/Histogenesis Group with Defined Biological Behavior: Cases were divided based on tumor origin (epithelial, mesenchymal, and round cell tumors), biological behavior (benign or malignant), and survival time.
4. Diagnostic Group: The most prevalent diagnoses were individually evaluated concerning survival time.

For patients with two neoplasms, one benign and the other malignant, only the malignant neoplasm was considered across all groups. In cases with two or more malignant neoplasms, animals were excluded from the "cytotype/histogenesis" group analysis. Cases where biological behavior could not be determined but cytotype/histogenesis was concluded were included in the "cytotype/histogenesis without defined biological behavior" group.

For each proposed group, platelet counts were analyzed across various survival time cutoffs, ranging from 4 to 24 months, aiming to identify the shortest interval in which the patient separation was statistically significant ($p < 0.05$). The Mann-Whitney test was applied, and the results were reported as median, first quartile, and third quartile (median, Q1–Q3). Additionally, a correlation analysis was performed using Spearman's method to evaluate the relationship between the assessed parameters and survival time.

In the group of most prevalent diagnoses, the chi-square test or Fisher's exact test was used. For proportions with significant associations, the Odds Ratio was calculated. Patient categorization was based on the shortest survival time identified by the Mann-Whitney test and on the intensity of thrombocytosis, classified as mild ($\leq 500,000$ / μ L) or moderate to severe ($> 500,000$ / μ L)

All analyses were conducted using R software (version 4.4.1), with loops implemented to automate the processing of parameter and category combinations. P-values < 0.05 were considered statistically significant. The raw data are in the supplemental data (Table S1) and the analysis codes are available at https://github.com/TengFwu/Statistical_analysis_Gondim_Souto_2025.

Results

Prevalence

In this study, the diagnosis of neoplasms (n=166) was primarily performed through histopathological examination (107 cases), followed by cytopathological examination (59 cases).

Based on biological behavior, approximately 141 cases were classified as malignant, while 22 cases were classified as benign. Additionally, three cases lacked conclusive determination of their biological behavior due to diagnostic limitations, such as cytopathology or the need for complementary tests, like immunohistochemistry.

From the perspective of cytotype and/or histogenesis, 89 cases were of epithelial origin, 45 cases were of mesenchymal origin, and 23 cases were of round cell origin.

Epithelial neoplasms represented 46.3% (77 cases) with malignant behavior, 6.02% (10 cases) with benign behavior, and 1.2% (2 cases) without defined biological behavior. Among the mesenchymal neoplasms, 21.6% (36 cases) were malignant, and 5.4% (9 cases) were benign. The round cell neoplasms comprised 11.4% (19 cases) with malignant behavior and three benign cases, all cytopathologically diagnosed as transmissible venereal tumors (TVT).

Epithelial neoplasms had the highest prevalence, representing 53.6% (89 cases), with mammary neoplasms accounting for approximately 50% of these cases, followed by squamous cell carcinomas (15.7%). Mesenchymal neoplasms represented 27.1% (45 cases), with vascular neoplasms, such as hemangiomas and hemangiosarcomas, accounting for 26.6%, and sarcomas for 17.7%. Round cell neoplasms accounted for 13.8% (23 cases), predominantly mast cell tumors (69.5%).

Among the most prevalent neoplasms in this study, mammary carcinoma had the highest occurrence with 45 cases, followed by mast cell tumors with 16 cases, squamous cell carcinoma with 14 cases, sarcoma with 11 cases and hemangiosarcoma with 10 cases.

Assessment of thrombocytosis in survival time

When assessing the effect of the biological behavior of neoplasms (benign or malignant) associated with the intensity of thrombocytosis and shorter survival in dogs with neoplasia, a significant difference was observed only in malignant neoplasms.

Patients with malignant neoplasms and a survival time of 15 months or less showed a higher platelet count (554,000; 488,000–661,550) compared to those with a survival time greater than 15 months (513,050; 467,500–587,500) ($p = 0.045$) (Figure 1A). Additionally, a weak negative linear correlation was observed ($p = 0.025$; $r = -0.18$), indicating that the greater the intensity of thrombocytosis, the shorter the survival time of dogs with malignant neoplasms (Figure 1B).

When evaluating the intensity of thrombocytosis in relation to the survival time of dogs accorded to cytotypes/histogenesis (epithelial, mesenchymal, and round cells), it was observed that patients with round cell tumors and a survival time of 4 months or less had a higher platelet count (629,000; 528,256–840,750) compared to those with a survival time greater than 4 months (474,000; 466,000–497,425) ($p = 0.015$) (Figure 2A). Furthermore, a moderate negative linear correlation was observed ($p = 0.006$; $R^2 = -0.552$) (Figure 2B).

Patients with epithelial neoplasms and a survival time of 17 months or less exhibited higher platelet counts (551,000; 492,750–647,443) compared to those with a survival time greater than 17 months (494,000; 458,500–560,500) ($p = 0.017$), although no significant correlation was observed ($p = 0.4$) (Figure 2C).

On the other hand, considering only the cytotype, thrombocytosis did not influence the survival time of patients with mesenchymal neoplasms.

In the analysis of cytotype/histogenesis (epithelial, mesenchymal, and round cells) combined with biological behavior (malignant and benign), a significant difference in platelet counts was observed for animals with malignant round cell neoplasms. Similar to the findings for round cell neoplasms alone, the group with a shorter survival time of 4 months was distinguished by higher platelet counts ($p = 0.010$) (Figure 3A). Furthermore, a moderate negative linear correlation was identified ($p = 0.007$; $R^2 = -0.559$) (Figure 3B).

Additionally, patients with malignant mesenchymal neoplasms and a survival time of 16 months or less exhibited higher platelet counts (562,000; 488,000–735,000) compared to those with a survival time greater than 16 months (479,000; 449,000–519,050) ($p = 0.027$) (Figure 3C).

For the analysis related to specific diagnoses, only the most prevalent neoplasms in our study were evaluated, representing 56% of all analyzed neoplasms: mammary carcinoma ($n = 45$), squamous cell carcinoma ($n = 14$), mast cell tumor ($n = 16$), sarcoma ($n = 11$), and hemangiosarcoma ($n = 10$).

For mammary carcinoma, squamous cell carcinoma, and sarcomas, the intensity of thrombocytosis did not significantly impact the survival time of the affected dogs in this study.

In contrast, in animals diagnosed with mast cell tumor, thrombocytosis showed a trend ($p = 0.054$) in its ability to separate animals based on the proposed shorter survival time (4 months) (Figure 4A). Additionally, odds ratio analysis, categorizing these animals by survival time and thrombocytosis intensity, revealed that the intensity of thrombocytosis impacted the outcomes of these patients. It indicated that animals with mild thrombocytosis had a lower chance ($OR = 0.07$; $p = 0.04$) of dying within ≤ 4 months.

Furthermore, animals with hemangiosarcoma had a survival time of ≤ 15 months when platelet counts were 638,000 (540,000 to 742,000) and longer survival times when platelet counts were 448,000 (442,000 to 449,000) ($p = 0.016$) (Figure 4B). However, the odds ratio and correlation analysis did not yield significant results.

Discussion

Our study demonstrated an association between the intensity of thrombocytosis and the survival of dogs with malignant neoplasms, where higher thrombocytosis intensity was associated with shorter survival ($p = 0.025$; $r = -0.18$). This finding suggests that the intensity of thrombocytosis may be an important prognostic factor in dogs diagnosed with malignant neoplasms.

In human medicine, this association is already recognized as a prognostic factor for cancer patients^{32–34}. Bornardi et al. (2010)³³ demonstrated that elevated platelet counts in preoperative exams tend to be useful for identifying patients with an unfavorable prognosis. Furthermore, increased platelet counts have been revealed as a predictor of cancer in patients with occult malignancies³⁵.

In humans, as demonstrated by Balamurugan et al (2021)³⁶ malignant neoplasms can benefit from the angiogenic and tissue/cellular growth factors derived from platelets, such as platelet-derived growth factor (PDGF), a component of platelet alpha granules that is secreted and acts as a potent pro-angiogenic factor³⁷.

Platelet-derived growth factors (PDGFs) are expressed in various cell types and malignant tumor tissues and have been shown to participate in proliferation, angiogenesis, migration, and invasion of many tumors, particularly malignant ones³⁶.

In human medicine, novel therapeutic methods targeting the PDGF pathway have emerged for cancer treatment since high PDGF expression in neoplasms can lead to therapy resistance, whereas its inhibition suppresses cancer proliferation, metastasis, invasion, and angiogenesis³⁸. While most drugs have proven effective and well-tolerated, others have shown lower efficacy and displayed potential toxicities in clinical trials³⁹.

When the groups were evaluated not only by tumor behavior but also by their origin, it was observed that platelet count had the greatest influence on round cell neoplasms, especially those of malignant behavior ($p = 0.007$; $r = -0.559$), which accounted for 82.6% of the round cell neoplasms analyzed. This prevalence may have influenced the results when behavior was not stratified.

Additionally, it was noted in the comparative analyses of these groups that in both cases, patients with a better prognosis mostly had platelet counts below 500,000/ μ L. This indicates that, for these neoplasms, moderate to severe thrombocytosis has a negative effect on the prognosis of these patients.

From these analyses, it was identified that mast cell tumor was the most prevalent among round cell neoplasms (69.5%). The individual analysis of this diagnosis demonstrated a trend ($p = 0.054$) in its ability to differentiate animals with survival times $\leq$ or $>$ four months based on platelet count. Once again, it was observed that patients with discrete thrombocytosis ($<500,000/\mu$ L) had a better prognosis.

This finding is further supported by the odds ratio analysis, which showed that patients with discrete thrombocytosis are 0.07 times less likely to have an unfavorable prognosis (≤ 4 months), highlighting the importance of evaluating this parameter in patients with mast cell tumors.

Currently, the literature presents conflicting results regarding the prevalence of thrombocytosis in dogs with mast cell tumors. For instance, in the study by Amaral et al. (2016)⁴⁰, five out of six cases of mast cell tumors showed platelet counts within the reference range, with only one case presenting discrete thrombocytosis.

Conversely, in studies by Neel et al. (2012)²⁷ and Hammer et al (1991)⁴¹, thrombocytosis was observed primarily in round cell neoplasms, including mast cell tumors. However, the dogs in these studies were under corticosteroid treatment, a medication known to increase platelet counts by reducing macrophage phagocytosis³¹ and frequently used in clinical therapy of cutaneous mast cell tumor⁴².

On the other hand, none of these studies assessed the impact of thrombocytosis on the prognosis of these patients. This highlights the need for further research to understand the prognostic relationship between thrombocytosis and canine mast cell tumors. Such research is particularly important since mast cell tumors are among the world^{43–45}.

In dogs with epithelial neoplasm, platelet counts in animals with thrombocytosis also demonstrated the ability to differentiate survival times. However, in this case, the stratification corresponded to a minimum survival time of 17 months (one year and five months).

When evaluating these neoplasms based on tumor behavior (benign and malignant), no significant differences were identified at any analyzed time point, suggesting that this parameter alone may not hold prognostic significance in these tumors.

Most epithelial neoplasms assessed in this study were of mammary origin, with mammary carcinoma being the most prevalent (50.5%). It was observed that the prognosis of animals with mammary carcinoma was not associated with thrombocytosis intensity.

In this context, thrombocytosis intensity may not be a relevant hematological parameter for this type of neoplasia. However, it should still be considered that we did not compare groups of patients without thrombocytosis. Thus, studies focusing on the presence or absence of thrombocytosis in these patients are needed to clarify its potential prognostic value.

Furthermore, more than half of the mammary carcinoma diagnoses in our study were obtained through cytopathological examination, a technique known to have lower accuracy compared to histopathologic type of neoplasia⁴⁶.

While the diagnostic discrepancies may have influenced the results, a reassessment using only histopathological diagnoses of mammary carcinomas yielded similar results (data not shown).

In human medicine, breast cancer patients with thrombocytopenia were found to have worse prognoses, with one-year survival likely impacted by chronic consumptive coagulopathy⁴⁷. Conversely, in veterinary studies by Neel et al.

(2012)²⁷ and Ribas et al. (2014)⁴⁸ occurrence of thrombocytosis in female dogs with mammary carcinoma and adenocarcinoma was more commonly observed compared to thrombocytopenia.

In dogs with thrombocytosis and malignant mesenchymal neoplasms, platelet counts demonstrated the ability to stratify patients with a minimum survival time of 16 months ($p = 0.027$). Among these, sarcomas did not show a significant association with a specific diagnostic group, which may have been due to our methodology, in which soft tissue tumors and poorly differentiated sarcomas from different locations (e.g. cutaneous, ocular and bone tissues) were all grouped under the same sarcoma diagnosis.

Although, ideally, tumors should be classified based on histopathological and/or immunohistochemical examination and categorized according to their anatomical location, the limited number of cases in our study prevented this assessment from being conducted separately. Therefore, the results obtained may present some uncertainties, highlighting the need for further studies to achieve a more precise prognostic evaluation.

However, dogs with hemangiosarcoma had a survival time of 15 months or less when presenting higher platelet counts ($p=0.016$). In the study by Abou et al. (2012)⁴⁹, it was shown that dogs with hemangiosarcoma exhibited high expression of platelet-derived growth factor receptor (PDGFR) types, particularly PDGFR- β , which is commonly associated with tumor progression.

Activation of PDGFRs can trigger molecular events such as cellular growth stimulation, actin rearrangement, and inhibition of intercellular communication, all of which are essential processes for modulating cellular responses and, consequently, contribute to tumor progression⁵⁰.

The life expectancy of dogs diagnosed with hemangiosarcoma is influenced by the location of the tumor, with significant variations depending on the affected organ⁵¹. In our study, hemangiosarcoma was predominantly observed in the cutaneous region (9/10 cases), with only one case identified in the spleen.

The biological behavior of non-visceral hemangiosarcoma is influenced by tumor location (cutaneous, subcutaneous, and muscular) and the degree of

tissue invasion. Clinical staging is a crucial prognostic factor for determine disease progression⁵¹.

In a retrospective study by Szivek et al. (2012)⁵², dogs diagnosed with cutaneous hemangiosarcoma who underwent surgery exclusively had a median survival of 25 to 32 months. In contrast, dogs with splenic hemangiosarcoma treated with splenectomy had a median survival of one year and six months⁵³.

Therefore, further studies are needed to better understand the influence of platelet count in animals with thrombocytosis and a diagnosis of cutaneous hemangiosarcoma since in our study, we were able to distinguish animals with shorter survival times when compared to other studies, emphasizing that platelet count could serve as an additional parameter for assessing the prognosis of these patients.

Conclusion

The intensity of thrombocytosis may represent an important prognostic indicator in dogs with malignant neoplasms, particularly in mast cell tumors and cutaneous hemangiosarcoma. Further studies should be conducted on these neoplasms to determine the influence of thrombocytosis on the prognosis of these patients.

References

- [1] Bambace NM, Holmes CE. The platelet contribution to cancer progression. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2011;9(2):237-249. doi:10.1111/j.1538-7836.2010.04131.x
- [2] Lin RJ, Afshar-Kharghan V, Schafer AI. Paraneoplastic thrombocytosis: The secrets of tumor self-promotion. *Blood*. 2014;124(2):184-187. doi:10.1182/blood-2014-03-562538
- [3] Kaushansky K. *Historical Review: Megakaryopoiesis and Thrombopoiesis.*; 2008. <http://ashpublications.org/blood/article-pdf/111/3/981/1307322/zh800308000981.pdf>
- [4] Li S, Lu Z, Wu S, Chu T, Li B, Qi F, et al. The dynamic role of platelets in cancer progression and their therapeutic implications. *Nat Rev Cancer*. 2024;24(1):72-87. doi:10.1038/s41568-023-00639-6

- [5] Kaser A, Brandacher G, Steurer W, Kaser S, Offner FA, Zoller H, et al. Interleukin-6 stimulates thrombopoiesis through thrombopoietin: role in inflammatory thrombocytosis. *Blood*. 2001;98(9):2720-2725. doi:10.1182/blood.V98.9.2720
- [6] Blay JY, Rossi JF, Wijdenes J, Menetrier-Caux C, Schemann S, Négrier S, et al. *ROLE OF INTERLEUKIN-6 IN THE PARANEOPLASTIC INFLAMMATORY SYNDROME ASSOCIATED WITH RENAL-CELL CARCINOMA*. Vol 72. Wiley-Liss, Inc; 1997.
- [7] Haemmerle M, Stone RL, Menter DG, Afshar-Kharghan V, Sood AK. The Platelet Lifeline to Cancer: Challenges and Opportunities. *Cancer Cell*. 2018;33(6):965-983. doi:10.1016/j.ccell.2018.03.002
- [8] Olsson AK, Cedervall J. The pro-inflammatory role of platelets in cancer. *Platelets*. 2018;29(6):569-573. doi:10.1080/09537104.2018.1453059
- [9] Plantureux L, Crescence L, Dignat-George F, Panicot-Dubois L, Dubois C. Effects of platelets on cancer progression. *Thromb Res*. 2018;164:S40-S47. doi:10.1016/j.thromres.2018.01.035
- [10] Jansson S, Aaltonen K, Bendahl PO, Falck AK, Karlsson M, Pietras K, et al. The PDGF pathway in breast cancer is linked to tumour aggressiveness, triple-negative subtype and early recurrence. *Breast Cancer Res Treat*. 2018;169(2):231-241. doi:10.1007/s10549-018-4664-7
- [11] Nakamura Y, Tanaka F, Yoshikawa Y, Mimori K, Inoue H, Yanaga K, et al. PDGF-BB is a novel prognostic factor in colorectal cancer. *Ann Surg Oncol*. 2008;15(8):2129-2136. doi:10.1245/s10434-008-9943-9
- [12] Tímár J, Tóvári J, Rásó E, Mészáros L, Bereczky B, Lapis K. Platelet-mimicry of cancer cells: Epiphenomenon with clinical significance. *Oncology*. 2005;69(3):185-201. doi:10.1159/000088069
- [13] Buergy D, Wenz F, Groden C, Brockmann MA. Tumor-platelet interaction in solid tumors. *Int J Cancer*. 2012;130(12):2747-2760. doi:10.1002/ijc.27441
- [14] Shoda Katsutoshi, Komatsu Shuhei, Daisuke Ichikawa, Toshiyuki Kosuga, Kazuma Okamoto, Tomohiro Arita, et al. Thrombocytosis Associated with Poor Prognosis in Patients with Gastric Cancer. *Gan To Kagaku Ryoho*. 2015;42(12):1980-1982.
- [15] Hwang SJ. Thrombocytosis: A paraneoplastic syndrome in patients with hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*. 2004;10(17):2472. doi:10.3748/wjg.v10.i17.2472
- [16] Baranyai Z, Jósá V, Tóth A, Szilasi Z, Tihanyi B, Zaránd A, et al. Paraneoplastic thrombocytosis in gastrointestinal cancer. *Platelets*. 2016;27(4):269-275. doi:10.3109/09537104.2016.1170112

- [17] Wang YH, Deng SJ, Yang YD, Yao N, Zhao JM, Min GT, et al. The pretreatment thrombocytosis may predict prognosis of patients with colorectal cancer: A systematic review and meta-analysis. *Biomark Med.* 2017;11(2):195-210. doi:10.2217/bmm-2016-0214
- [18] Cheng J, Zeng Z, Ye Q, Zhang Y, Yan R, Liang C, et al. *The Association of Pretreatment Thrombocytosis with Prognosis and Clinicopathological Significance in Cervical Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis.* Vol 8.; 2017. www.impactjournals.com/oncotarget/
- [19] Hufnagel DH, Cozzi GD, Crispens MA, Beeghly-Fadiel A. Platelets, thrombocytosis, and ovarian cancer prognosis: Surveying the landscape of the literature. *Int J Mol Sci.* 2020;21(21):1-18. doi:10.3390/ijms21218169
- [20] Shu C, Wang X, Li C, Huang J, Xie X, Li H, et al. Revisiting the association between pretreatment thrombocytosis and cancer survival outcomes: an umbrella review of meta-analyses. *BMC Cancer.* 2024;24(1):1246. doi:10.1186/s12885-024-13027-6
- [21] Zhou L, Zhang Z, Tian Y, Li Z, Liu Z, Zhu S. The critical role of platelet in cancer progression and metastasis. *Eur J Med Res.* 2023;28(1). doi:10.1186/s40001-023-01342-w
- [22] Tao DL, Tassi Yunga S, Williams CD, McCarty OJT. Aspirin and antiplatelet treatments in cancer. *Blood.* 2021;137(23):3201-3211. doi:10.1182/blood.2019003977
- [23] Rothwell PM, Cook NR, Gaziano JM, Price JF, Belch JFF, Roncaglioni MC, et al. Effects of aspirin on risks of vascular events and cancer according to bodyweight and dose: analysis of individual patient data from randomised trials. *The Lancet.* 2018;392(10145):387-399. doi:10.1016/S0140-6736(18)31133-4
- [24] Borsig L, Wong R, Feramisco J, Nadeau DR, Varki NM, Varki A. Heparin and cancer revisited: Mechanistic connections involving platelets, P-selectin, carcinoma mucins, and tumor metastasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2001;98(6):3352-3357. doi:10.1073/pnas.061615598
- [25] Childress MO. Hematologic Abnormalities in the Small Animal Cancer Patient. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice.* 2012;42(1):123-155. doi:10.1016/j.cvsm.2011.09.009
- [26] Hammer AS. *HAEMATOLOGY INTERNATIONAL Original Article Thrombocytosis in Dogs and Cats: A Retrospective Study.* Vol 1.; 1991.
- [27] Neel JA, Snyder L, Grindem CB. Thrombocytosis: A retrospective study of 165 dogs. *Vet Clin Pathol.* 2012;41(2):216-222. doi:10.1111/j.1939-165X.2012.00416.x

- [28] Athanasiou L V., Polizopoulou ZS, Papavasileiou EG, Mpairamoglou EL, Kantere MC, Rousou XA. Magnitude of reactive thrombocytosis and associated clinical conditions in dogs. *Veterinary Record*. 2017;181(10). doi:10.1136/vr.104042
- [29] Woolcock AD, Keenan A, Cheung C, Christian JA, Moore GE. Thrombocytosis in 715 Dogs (2011–2015). *J Vet Intern Med*. 2017;31(6):1691-1699. doi:10.1111/jvim.14831
- [30] Rocha MNA, De Sousa Rocha MC, Kawasaki ML, Rodrigues JY, De Souza WF, Mendonça AJ. Thrombocytosis: A retrospective study of 573 dogs (2016-2017). *Ciencia Animal Brasileira*. 2019;20. doi:10.1590/1089-6891v20e-51837
- [31] Dennis J. Meyer, John W. Harvey. *Veterinary Laboratory Medicine: Interpretation and Diagnosis*. In: Saunders StLM, ed. *Library Catalog*. 3rd ed. ; 2004:351.
- [32] Symbas NP, Townsend MF, El-Galley R, Keane TE, Graham SD, Petros JA. *Poor Prognosis Associated with Thrombocytosis in Patients with Renal Cell Carcinoma*.
- [33] Bonardi R de A, Graciosa K, Melchiorretto EF, Furlani LF, Sartor MC, Baldin Jr A. Trombocitose como fator prognóstico no câncer colorretal. *Revista Brasileira de Coloproctologia*. 2010;30(2):128-133. doi:10.1590/S0101-98802010000200002
- [34] Bensalah K, Leray E, Fergelot P, Rioux-Leclercq N, Tostain J, Guillé F, et al. Prognostic value of thrombocytosis in renal cell carcinoma. *Journal of Urology*. 2006;175(3):859-863. doi:10.1016/S0022-5347(05)00526-4
- [35] Bailey SER, Ukoumunne OC, Shephard E, Hamilton W. How useful is thrombocytosis in predicting an underlying cancer in primary care? A systematic review. *Fam Pract*. 2017;34(1):4-10. doi:10.1093/fampra/cmw100
- [36] Balamurugan K, Koehler L, Dürig JN, Hempel U, Rademann J, Hintze V, et al. Structural insights into the modulation of PDGF/PDGFR- β complexation by hyaluronan derivatives. *Biol Chem*. 2021;402(11):1441-1452. doi:10.1515/hsz-2021-0173
- [37] Manzat Saplacan RM, Balacescu L, Gherman C, Chira RI, Craiu A, Mircea PA, et al. The Role of PDGFs and PDGFRs in Colorectal Cancer. *Mediators Inflamm*. 2017;2017. doi:10.1155/2017/4708076
- [38] Thies KA, Hammer AM, Hildreth BE, Steck SA, Spehar JM, Kladney RD, et al. Stromal Platelet-Derived Growth Factor Receptor- β Signaling Promotes Breast Cancer Metastasis in the Brain. *Cancer Res*. 2021;81(3):606-618. doi:10.1158/0008-5472.CAN-19-3731
- [39] Zou X, Tang XY, Qu ZY, Sun ZW, Ji CF, Li YJ, et al. Targeting the PDGF/PDGFR signaling pathway for cancer therapy: A review. *Int J Biol Macromol*. 2022;202:539-557. doi:10.1016/j.ijbiomac.2022.01.113

- [40] Von Krüger Amaral D, Drulla Brandão AP, Maffezzolli G, Vogel Seixas S, Silva de Sousa R, Locatelli Dittrich R. PLAQUETOMETRIA EM CÃES COM NEOPLASIA. *Archives of Veterinary Science*. 2016;21(4). doi:10.5380/avs.v21i4.45743
- [41] Hammer AS. *HAEMATOLOGY INTERNATIONAL Original Article Thrombocytosis in Dogs and Cats: A Retrospective Study*. Vol 1.; 1991.
- [42] Camps-Palau MA, Leibman NF, Elmslie R, Lana SE, Plaza S, McKnight JA, et al. Treatment of canine mast cell tumours with vinblastine, cyclophosphamide and prednisone: 35 cases (1997–2004). *Vet Comp Oncol*. 2007;5(3):156-167. doi:10.1111/j.1476-5829.2006.00125.x
- [43] GAMLEM H, NORDSTOGA K, GLATTRE E. Canine neoplasia – Introductory paper. *APMIS*. 2008;116(s125):5-18. doi:10.1111/j.1600-0463.2008.125m2.x
- [44] Pakhrin B, Kang MS, Bae IH, Park MS, Jee H, You MH, et al. Retrospective study of canine cutaneous tumors in Korea. *J Vet Sci*. 2007;8(3):229. doi:10.4142/jvs.2007.8.3.229
- [45] Warland J, Dobson J. Breed predispositions in canine mast cell tumour: A single centre experience in the United Kingdom. *Veterinary Journal*. 2013;197(2):496-498. doi:10.1016/j.tvjl.2013.02.017
- [46] Cuellar PAM, Rocha NS, Souza NF de, Dinau FC. Breast carcinoma in a dog: sensitivity and specificity between cytopathology and histopathology. *Brazilian Journal of Veterinary Medicine*. 2024;46:e003024. doi:10.29374/2527-2179.bjvm003024
- [47] Garimi N, Nasrallah S, Baram Y, Katz A, Koren A, First M, et al. Platelets and Breast Cancer. *Israel Medical Association Journal*. 2022;22.
- [48] da Silva AHC, da Silva DM, Ribas CR, Dittrich RL, Dornbusch PT, Guérios SD. Alterações no hemograma de cadelas com neoplasia mamária. *Ciencia Animal Brasileira*. 2014;15(1):87-92. doi:10.5216/cab.v15i1.20144
- [49] Abou Asa S, Mori T, Maruo K, Khater A, El-sawak A, Abd el-Aziz E, et al. Analysis of genomic mutation and immunohistochemistry of platelet-derived growth factor receptors in canine vascular tumours. *Vet Comp Oncol*. 2015;13(3):237-245. doi:10.1111/vco.12035
- [50] Heldin CH, Westermark B. Mechanism of Action and In Vivo Role of Platelet-Derived Growth Factor. *Physiol Rev*. 1999;79(4):1283-1316. doi:10.1152/physrev.1999.79.4.1283
- [51] De Nardi AB, de Oliveira Massoco Salles Gomes C, Fonseca-Alves CE, de Paiva FN, Linhares LCM, Carra GJU, et al. Diagnosis, Prognosis, and Treatment of Canine Hemangiosarcoma: A Review Based on a Consensus Organized by the Brazilian

Association of Veterinary Oncology, ABROVET. *Cancers (Basel)*. 2023;15(7). doi:10.3390/cancers15072025

- [52] Szivek A, Burns RE, Gericota B, Affolter VK, Kent MS, Rodriguez CO, et al. Clinical outcome in 94 cases of dermal haemangiosarcoma in dogs treated with surgical excision: 1993-2007. *Vet Comp Oncol*. 2012;10(1):65-73. doi:10.1111/j.1476-5829.2011.00282.x
- [53] Wendelburg KM, Price LL, Burgess KE, Lyons JA, Lew FH, Berg J. Survival time of dogs with splenic hemangiosarcoma treated by splenectomy with or without adjuvant chemotherapy: 208 cases (2001–2012). *J Am Vet Med Assoc*. 2015;247(4):393-403. doi:10.2460/javma.247.4.393

Figures

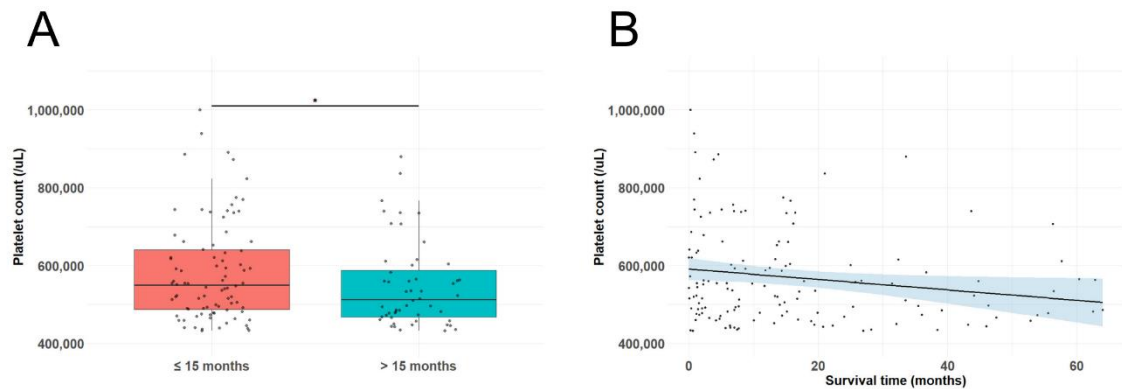


Figure 1. Evaluation of thrombocytosis intensity in patients with malignant neoplasms. (A) Patients with a survival time of ≤ 15 months exhibit higher platelet counts than those with a survival time > 15 months ($p = 0.045$). (B) A moderate negative linear correlation between survival time (months) and platelet count ($p = 0.025$; $r = -0.18$).

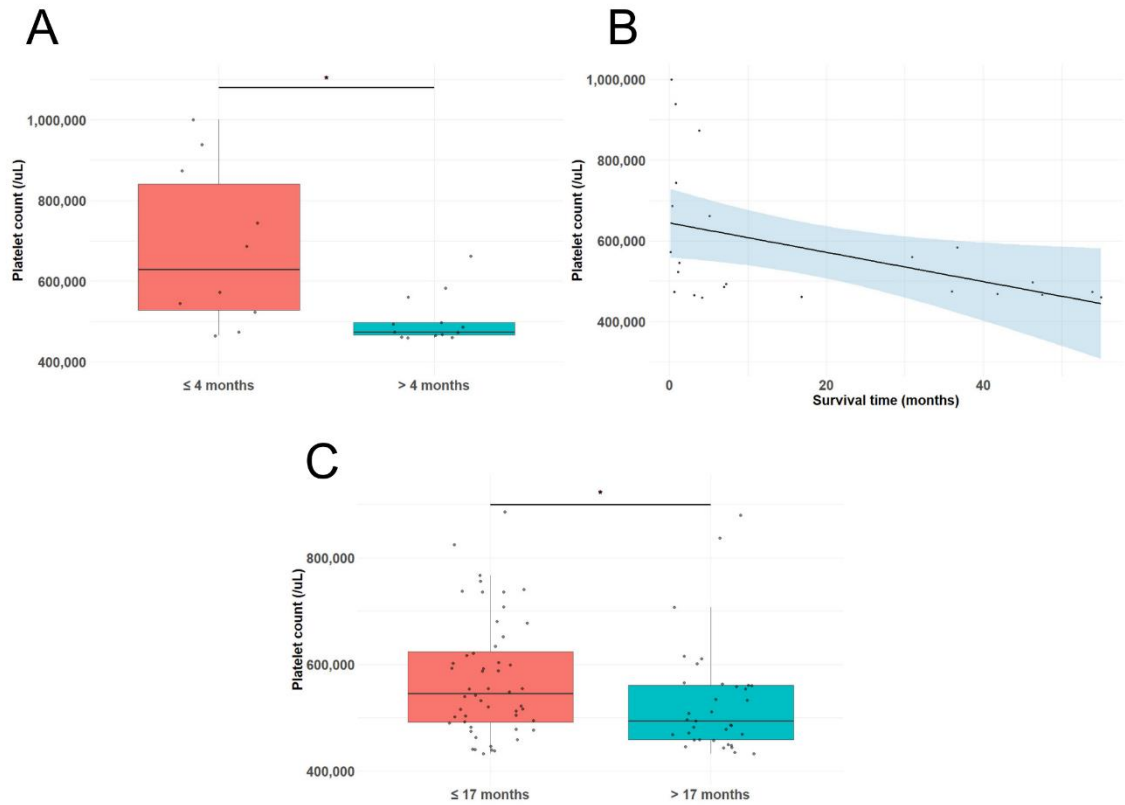


Figure 2. Evaluation of thrombocytosis intensity in patients with round cell (A, B) and epithelial neoplasms (C). (A) Patients with a survival time of ≤ 4 months exhibit higher platelet counts than those with a survival time > 4 months ($p = 0.015$). (B) A moderate negative linear correlation between survival time (months) and platelet count ($p = 0.006$; $R^2 = -0.552$). (C) Patients with a survival time of ≤ 17 months exhibit higher platelet counts than those with a survival time > 17 months ($p = 0.4$).

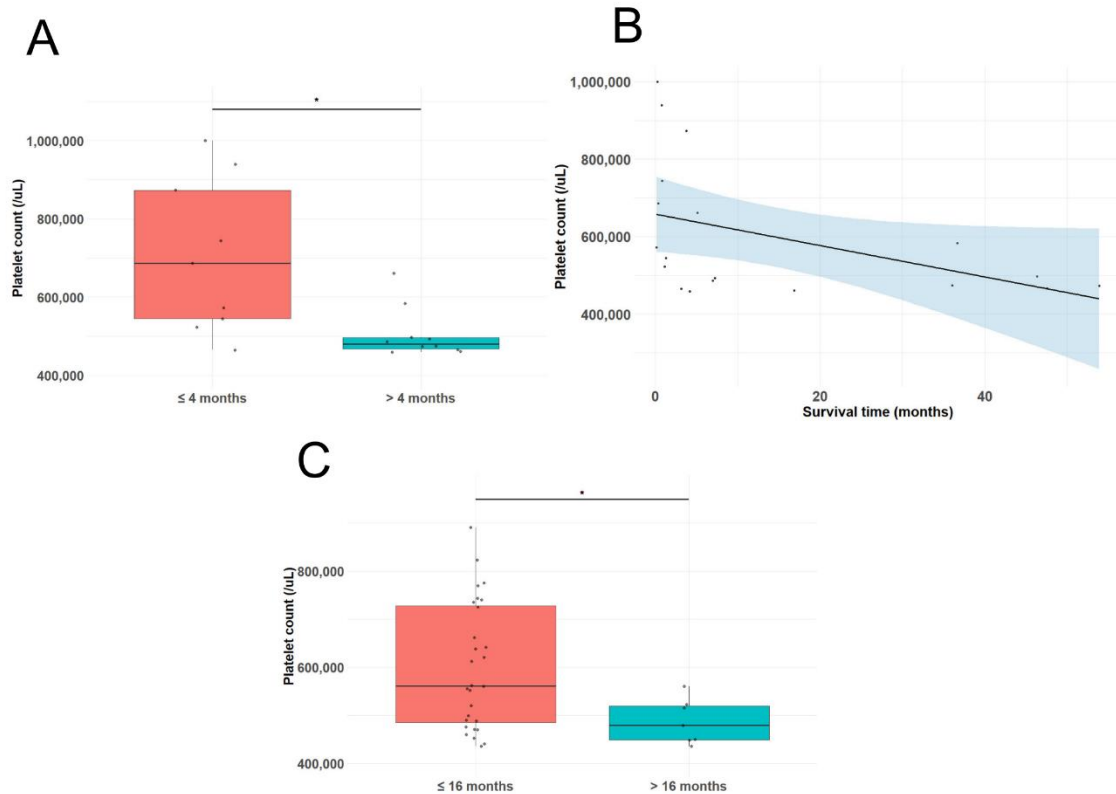


Figure 3. Evaluation of thrombocytosis intensity in patients with malignant round cell neoplasms (A, B) and malignant mesenchymal neoplasms (C). (A) Patients with a survival time of ≤ 4 months exhibit higher platelet counts than those with a survival time > 4 months ($p = 0.010$). (B) A moderate negative linear correlation between survival time (months) and platelet count ($p = 0.007$; $R^2 = -0.559$). (C) Patients with a survival time of ≤ 16 months exhibit higher platelet counts than those with a survival time > 16 months ($p = 0.027$).

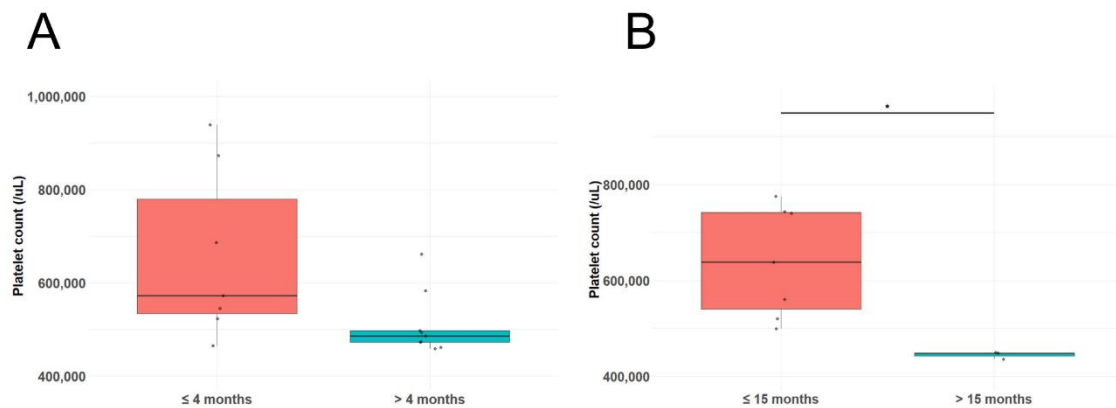
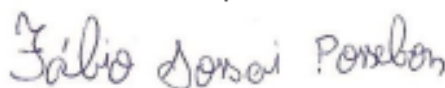


Figure 4. Evaluation of thrombocytosis intensity in patients with mast cell tumor (A) and hemangiosarcoma (B). (A) Patients with a survival time of ≤ 4 months show a trend toward higher platelet counts than those with a survival time > 4 months ($p = 0.054$). (B) Patients with a survival time of ≤ 15 months exhibit higher platelet counts than those with a survival time > 15 months ($p = 0.016$).

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada TROMBOCITOSE COMO INDICADOR DE MAU PROGNÓSTICO DE NEOPLASIAS EM CÃES – ESTUDO RETROSPECTIVO DE 2014 A 2023, registrada com o nº 000.202, sob a responsabilidade de Leticia Gondim Souto e do(a) Prof(a). Dr(a) Regina Kiomi Takahira - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA, e foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, em reunião de 10/09/2024.

Finalidade	Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	01/09/2024 a 26/09/2024
Espécie/linhagem/raça	-
Número de animais	-
Sexo	-
Origem	-

A handwritten signature in blue ink, reading "Fábio Sossai Possebon", is centered below the table.

Fábio Sossai Possebon
Presidente da CEUA
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Botucatu