

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS JABOTICABAL

**EXPRESSÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DO FATOR DE
CRESCIMENTO ENDOTELIAL VASCULAR EM
MASTOCITOMAS CANINOS E SUAS METÁSTASES**

Alice Corrêa Rassele Merísio

Médica Veterinária

2022

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS JABOTICABAL

**EXPRESSÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DO FATOR DE
CRESCIMENTO ENDOTELIAL VASCULAR EM
MASTOCITOMAS CANINOS E SUAS METÁSTASES**

Alice Correa Rassele Merísio

Orientador: Prof. Dr. Andriago Barboza de Nardi

Coorientador: Prof. Dr. Rodrigo dos Santos Horta

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutora em Medicina Veterinária

2022

M562e

Merísio, Alice Corrêa Rassele

Expressão imunohistoquímica do Fator de Crescimento Endotelial Vascular em Mastocitomas Caninos e suas metástases / Alice Corrêa Rassele Merísio. -- Jaboticabal, 2023

66 p.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientador: Andrégo Barboza de Nardi

Coorientador: Rodrigo dos Santos Horta

1. Mastocitoma. 2. Oncologia veterinária. 3. Câncer quimioterapia. 4. Imunohistoquímica. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Registro de Impacto

Impacto potencial desta pesquisa:

Esta tese teve por objetivo detectar a expressão de Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF) nos mastocitomas caninos primários e metástases linfonodais. Com os resultados obtidos, foi possível observar a expressão de VEGF em alguns casos, mas não tiveram correlação com o prognóstico.

Impact Record

Potential impact of this research:

This thesis aimed to detect the expression of Vascular Endothelial Growth factor (VEGF) in primary canine mast cell tumors and lymph node metastases. With the results obtained, it was possible to observe the expression of VEGF in some cases, but they did not correlate with the prognosis.


CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: EXPRESSÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DO FATOR DE CRESCIMENTO ENDOTELIAL VASCULAR EM MASTOCITOMAS CANINOS E SUAS METÁSTASES

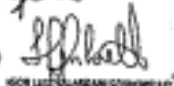
AUTORA: ALICE CORRÊA RASSELE MERISIO
ORIENTADOR: ANDRIGO BARBOZA DE NARDI
COORIENTADOR: RODRIGO DOS SANTOS HORTA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em MEDICINA VETERINÁRIA, área: Clínica Médica Veterinária pela Comissão Examinadora:

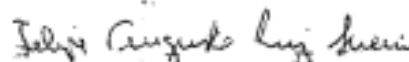
Prof. Dr. RODRIGO DOS SANTOS HORTA (Participação Virtual)
Universidade Federal de Minas Gerais/UFMG / Belo Horizonte/MG



Prof. Dr. IGOR LUIZ SALARDANI SENHORELLO (Participação Virtual)
Universidade Vila Velha - UVV / Vila Velha/ES



Pesquisador Dr. FELIPE AUGUSTO RUIZ SUEIRO (Participação Virtual)
VETPAT- Patologia e Biologia Molecular Veterinária / Campinas/SP



Profa. Dra. ANNELESE CARLA CAMPLESI DOS SANTOS (Participação Virtual)
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Profa. Dra. PAOLA CASTRO MORAES (Participação Virtual)
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Jaboticabal, 16 de agosto de 2022

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Alice Corrêa Rassele, nascida Vitória (ES), 29 de setembro de 1985. Graduada em Medicina Veterinária pela Universidade Vila Velha– ES (2008 - 2012). Especialista Lato Sensu na Modalidade Residência no Programa de Medicina Veterinária, na área de Clínica Médica de Pequenos Animais na Universidade Vila Velha - ES (2013 - 2015). Mestre em Ciência Animal pela Universidade Vila Velha (ES) (2016 – 2018). Atualmente, é doutoranda do programa de Medicina Veterinária, na área de Clínica Médica de Pequenos Animais na Universidade Estadual Paulista – Campus Jaboticabal - SP, atuando na área de Oncologia Veterinária com linha de pesquisa em novos marcadores prognósticos para mastocitomas caninos, sob orientação do Prof. Dr. Andriago Barboza de Nardi e coorientação do Prof. Dr. Rodrigo dos Santos Horta.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, Pedro e Erlice que investiram tantos anos em meus estudos, permitindo que eu chegasse aonde estou agora. Sempre desejando o melhor para mim. Se estou onde estou hoje, devo tudo a vocês.

Ao meu esposo e companheiro Thiago, por sempre me apoiar, ajudar e dar força em todos os momentos.

Aos cães que participaram deste projeto, suas histórias auxiliaram na confecção deste projeto, tornando-o possível. Aos animais com os quais vivi, tanto na minha vida pessoal como profissional, desde a graduação e até os dias de hoje. Agradeço especialmente àqueles que perdi, permitindo que eu aprendesse mais para salvar tantos outros.

Agradeço meu orientador Andriago Barboza de Nardi pelas oportunidades, ensinamentos e confiança e meu coorientador Rodrigo dos Santos Horta por aguentar minhas crises, incentivar e ensinar sempre com calma e muito conhecimento. Você é uma inspiração para mim.

À minha amiga Mayara que embarcou nessa aventura comigo e sempre sendo meu braço direito nesta jornada e na rotina da Oncologia Veterinária.

Agradeço a Deus que sempre guiou os meus passos, sempre esteve comigo e nunca me abandonou. “Os seus sonhos são maiores que os meus sonhos”.



Centro Universitário Vila Velha

Comissão de Ética, Bioética e Bem Estar Animal (CEUA-UVV)

DECLARAÇÃO – CEUA / UVV

Vila Velha, 21 de fevereiro de 2019.

Declaro para os devidos fins que o projeto intitulado “Perfil da proteína ativadora de fibroblastos e metaloproteínas de membranas em mastocitomas caninos e respectivas metástases nodais” encontra adequado e satisfatoriamente de acordo com as exigências das Resoluções que regem esse Comitê, por se tratar de uma continuidade do projeto previamente aprovado sob o nome de “ Mastocitoma canino: caracterização histológica, imunofenotípica e genética do tumor primário e metástases, e impacto no prognóstico”, com registro de parecer 376/2016. Essa adequação é válida visto que a nova atividade usará de material previamente coletado e processado no para uso em histologia e não haverá necessidades de novas coletas.

Pesquisadores Responsáveis: **Rodrigo dos Santos Horta / Andriago Barbosa de Nardi**

Instituição onde será desenvolvido: **UVV- Hospital Veterinário Prof. Ricardo Alexandre Hippler / Unesp - Jaboticabal**

Assim, mediante a importância social e científica que o projeto apresenta, a sua aplicabilidade e conformidade com os requisitos éticos, sou de parecer favorável à realização do projeto classificando-o como **APROVADO**, pois o mesmo atende aos Requisitos Fundamentais da Normas de Conduta para a Utilização de Animais no Ensino, Pesquisa e Extensão no Centro Universitário Vila.

Vila Velha , 21 de fevereiro de 2019.

Prof. Moacir Carretta Júnior
Relator da CEUA-UVV.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1. Mastocitomas.....	2
2.2. Angiogense.....	9
2.3. Metástase	14
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	15
3.1. Avaliação histopatológica.....	15
3.2. Avaliação imunohistoquímica	16
3.3. Análise estatística.....	17
4. RESULTADOS.....	18
5. DISCUSSÃO.....	28
6. CONCLUSÃO.....	32
7. REFERENCIAS.....	32
8. ANEXO 1	53

EXPRESSÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DO FATOR DE CRESCIMENTO ENDOTELIAL VASCULAR EM MASTOCITOMAS CANINOS E SUAS METÁSTASES

RESUMO – O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) é um importante regulador da angiogênese, sendo apontado como um fator de crescimento autócrino para células neoplásicas de diversos tumores. O objetivo do presente estudo foi avaliar a expressão de VEGF em mastocitomas caninos e sua metástase regional como marcador de prognóstico. Foram selecionadas 28 pacientes com mastocitoma com metástase em linfonodo regional confirmada e as amostras foram submetidas a análise por imunohistoquímica. Dos pacientes avaliados apenas 14,3% expressaram VEGF em tumor e metástase, com concordância leve. Houve uma correlação fraca entre o tamanho tumoral. Não houve diferença de sobrevida entre positivos em tumor primário e metástase e os negativos. A expressão de VEGF não apresentou correlação com a sobrevida dos pacientes, no entanto, pacientes com expressão positiva pode se beneficiar com terapia inibidora deste fator.

Palavras-chave: Neoplasia, cão, prognóstico, tratamento, disseminação.

IMMUNOHISTOCHEMICAL EXPRESSION OF VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR FOR CANINE MAST CELL TUMORS AND THEIR METASTASES

ABSTRACT

Vascular endothelial growth factor (VEGF) is an important regulator of angiogenesis, being indicated as an autocrine growth factor for neoplastic cells of several tumors. The aim of the present study was to evaluate VEGF expression in canine mast cell tumors and its regional metastasis as a prognostic marker. Twenty-eight patients with mast cell tumors with confirmed regional lymph node metastasis were selected and the samples were submitted to immunohistochemical analysis. Of the patients evaluated, only 14.3% expressed VEGF in tumor and metastasis, with mild agreement. There was a weak correlation between tumor size. There was no difference in survival between positives in primary tumor and metastasis and negatives. VEGF expression did not correlate with patient survival, however, patients with positive expression may benefit from inhibitor therapy of this factor.

Key words: Neoplasm, dog, prognosis, treatment, dissemination.

1. Introdução

A incidência das neoplasias em animais de companhia vem aumentando em decorrência da maior expectativa de vida. Na maioria das espécies as neoplasias envolvendo mastócitos são incomuns, entretanto em cães o mastocitoma representa cerca de 21% das neoplasias cutâneas (Rotwell et al., 1987; O'Keef, 1990; Welle et al., 2008; Blackwood et al., 2012), no Brasil representa de 20,9 a 22,4% (De Nardi et al., 2022).

Esta neoplasia exibe uma variação em seu comportamento biológico, desde indolente a altamente invasiva e metastática (Patnaik et al., 1984; Rotwell et al., 1987; O' Keef, 1990; Misdorp, 2004; Welle et al., 2008; London&Thamm, 2020). Sua graduação é geralmente realizada pelas características histomorfológicas. As características histopatológicas sugerem seu comportamento, entretanto, nota-se uma grande heterogeneidade, tornando complexa a definição prognóstica e terapêutica (Misdorp, 2004; Welle et al., 2008; Kiupel et al., 2011, Blackwood et al., 2012).

Apesar de ser um dos tumores cutâneos mais comuns em cães, ainda existem vários pontos a serem debatidos, considerando o comportamento biológico imprevisível. Diante deste cenário, diversos estudos têm sido conduzidos investigando em conjunto as análises histológicas, imunohistoquímica e a expressão gênica a fim de aprimorar a precisão do prognóstico (Zemke et al., 2002; Vascellari et al., 2012; Horta et al., 2018).

Na tentativa de encontrar outras formas de prever o prognóstico de cães com mastocitoma novos indicadores estão sendo pesquisados. O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF, "*vascular endothelial growth factor*") e seu receptor são descritos como reguladores da angiogênese em vários órgãos (Siemeister et al., 1998; Veikkola & Alitalo, 1999; Ferrara et al., 2003). O VEGF é um fator mitogênico seletivo para o endotélio de artérias, veias e vasos linfáticos (Ferrara e Davis-Smith, 1997; Dvorak, et al., 1999). Esse fator é responsável por induzir estímulos necessários à proliferação das células do endotélio vascular, bem como pela migração destas para formação de tubos capilares que darão origem a vasos de maior calibre (Nicosia, 1998). A sinalização para o início da angiogênese ocorre por meio da ligação do VEGF

aos receptores VEGFR-1, codificado pelo gene Flt-1 (“*c-FMS-like tyrosine kinase*”) e VEGFR-2, codificado pelo gene Flk-1 (“*fetal liver kinase*”) ou, em seres humanos, KDR (“*kinase-insert domain-containing receptor*”) (Veikkola et al., 2000). Estudos apontam que além das células endoteliais, os receptores Flt-1 e Flk-1 também estão localizados no epitélio glandular e no estroma endometrial humano (Meduri et al., 2000). O VEGF também interage com uma família de co-receptores, as neuroporinas, NP1 e NP2, aumentando a afinidade dos receptores VEGFR-1 e 2 (Soker et al., 1998; Ferrara, 2004).

Alguns estudos apontam que o VEGF atua como um mediador da angiogênese ou como um regulador de crescimento autócrino de células com diferentes graus de malignidade (Siemeister et al., 1998; Veikkola & Alitalo, 1999; Ferrara et al., 2003; Shinkaruk et al., 2003). Nas neoplasias caninas, o VEGF e seu receptor também foram detectados, se tornando potenciais alvos para terapias medicamentosas (Giantin et al., 2012). Entretanto, até o presente momento pouco se sabe sobre a expressão do VEGF nos mastocitomas caninos e suas metástases, uma compreensão mais profunda sobre o papel do VEGF e outros fatores de crescimento na angiogênese tumoral pode contribuir para o desenvolvimento de novas terapias.

Este estudo teve como objetivo avaliar a expressão imuno-histoquímica de VEGF em mastocitomas e suas metástases em linfonodo para determinar a concordância dessa expressão e a correlação com outros fatores prognósticos e com a sobrevida desses pacientes.

2. Revisão de Literatura

2.1. Mastocitoma

O mastocitoma canino (MCT) é uma neoplasia de células redondas, sendo um dos tumores mais comumente encontrados na espécie canina, representando 11-27% dos tumores cutâneos malignos nesta espécie (Rotwell et al., 1987; O’Keef, 1990; Strefazzi et al., 2003; Welle et al., 2008; Blackwood et al., 2012). Em estudos realizados no Brasil, foi apontado como a segunda neoplasia mais frequente em cães, com uma incidência de 20,9% e 22,4% (De Nardi et al., 2002; Meirelles et al., 2010; de Nardi et al., 2022),

Embora mastócitos sejam encontrados de forma abundante nos pulmões e trato gastrointestinal, a grande maioria dos MCT ocorrem na derme e tecido subcutâneo. (Bostock, 1973; Rothwell et al., 1987). Geralmente se apresentam de forma solitária, apesar de que cerca de 10% a 15% dos cães podem apresentar tumores múltiplos (Hottenford& Nielsen, 1966). Cerca de metade ocorrem na região de tronco e perianal, 40% nos membros e apenas 10% no pescoço e cabeça (Hottenford& Nielsen, 1966; Thamm& London, 2020).

O aspecto clínico desses tumores é extremamente variável, não sendo possível identificar uma lesão cutânea como MCT apenas por sua aparência (Bostock, 1973). O potencial metastático é igualmente variável e, enquanto os tumores bem diferenciados raramente provocam metástase, cerca de 10%, enquanto em moderadamente diferenciados ocorre em 5 a 22% das neoplasias, já os tumores pouco diferenciados possuem potencial metastático em 55% a 95% dos casos (De Nardi et al., 2022). As metástases podem ocorrer por via linfática, sendo na maioria das vezes o linfonodo regional seu primeiro sítio de metástase. A disseminação por via hematogênica também pode ocorrer, mais tardiamente, em baço, fígado e outros órgãos (Murphy et al., 2006; Mullins et al., 2006, De Nardi, 2022). Na doença sistêmica disseminada pode se observar mastócitos circulantes em sangue periférico e medula óssea. A forma visceral, em geral, é precedida por uma manifestação do tumor indiferenciado cutâneo (Longley et al., 2001), entretanto a literatura descreve casos primários (Matsuda et al., 2009). Em alguns casos, pode se disseminar pela pele, dando origem a lesões satélites locais. (Blackwood et al., 2012)

A determinação do prognóstico dos MCTs, em muitos casos, é bastante complicada e diversos fatores de prognósticos foram identificados a fim de prever o prognóstico, bem como direcionar a terapia (London & Seguin, 2008; Welle et al., 2008). No estudo publicado por Horta et al. (2018) foram apontados como fatores prognósticos maiores, relacionados a maior risco de óbito relacionado ao mastocitoma, o histórico de recidiva tumoral e o estadiamento avançado. Sendo assim, recomenda-se que a primeira abordagem terapêutica seja mais agressiva, podendo melhorar o prognostico do paciente (Blackwood et al., 2012; Thamm & London, 2020). Vários sistemas foram propostos para o estadiamento clínico do mastocitoma canino, sendo o estadiamento proposto pela OMS o mais utilizado

(Tabela 1) classificando-os de 0 a IV e, recentemente, foi proposto um sistema de estadiamento por Horta et al. (2018) com classificação de I a V (Tabela 2). Entretanto, embora alguns autores apontem que a presença de múltiplos nódulos podem estar associados a um pior prognóstico, no estudo realizado por Murphy et al (2006) não foram evidenciadas piora no prognóstico dos pacientes acometidos por múltiplos nódulos, sendo o tempo de sobrevivência similar aos que possuíam um único nódulo. Ao contrário, o acometimento do linfonodo, com perda da arquitetura do órgão, ou metástase avançada, conforme proposto por Weishaar et al. (2014), relaciona-se a um prognóstico desfavorável (Horta et al., 2018).

Tabela 1 – Sistema de estadiamento clínico para o mastocitoma canino, segundo a Organização mundial de saúde (OMS).

Estádio	Característica
0	tumor único, excisado da derme incompletamente, identificado histologicamente e sem envolvimento de linfonodos regionais. subestadio a: sem sinais de doença sistêmica subestadio b: com sinais de doença sistêmica
I	tumor único restrito à derme e sem envolvimento dos linfonodos regionais. subestadio a: sem sinais de doença sistêmica subestadio b: com sinais de doença sistêmica
II	tumor único restrito à derme com envolvimento dos linfonodos regionais. subestadio a: sem sinais de doença sistêmica subestadio b: com sinais de doença sistêmica
III	tumor dérmico múltiplo ou tumor amplamente infiltrado, com ou sem envolvimento dos linfonodos regionais. subestadio a: sem sinais de doença sistêmica subestadio b: com sinais de doença sistêmica
IV	qualquer tumor com metástases a distância ou recidiva com metástases, incluindo envolvimento sanguíneo ou da medula óssea

Tabela 2 – Proposta de estadiamento para o mastocitoma cutâneo e subcutâneo em cães segundo Horta et al. (2018)

Estádio	Característica
I	Tumor único sem envolvimento de linfonodos regionais.

II	Múltiplos tumores maiores (≥ 3) sem envolvimento de linfonodos regionais
III	Tumor único com envolvimento de linfonodos regionais
IV	Tumores grandes e infiltrados, sem delimitação ou múltiplos tumores com envolvimento de linfonodos
V	Qualquer tumor com metástase a distância, incluindo invasão de medula óssea e presença de mastócitos no sangue periférico

No estudo de Horta et al. (2018) foram associados a um risco intermediário de óbito relacionado ao tumor a graduação histopatológica elevada, organização tumoral em manto, alto índice mitótico e imunexpressão de Ki-67, imunexpressão citoplasmática difusa de KITr (KIT III) e presença de duplicação interna em tandem no exon 11 do gene *c-KIT*.

A graduação histopatológica segue sendo o método de eleição para prever o comportamento biológico deste tumor. Historicamente, o sistema de graduação histopatológico mais utilizado para classificar o mastocitoma canino cutâneo foi descrito por Patnaik et al. (1984), avaliando as características das células neoplásicas, número de figuras de mitose e extensão da invasão do tumor nos tecidos subjacentes, conforme Tabela 3 (London & Seguin, 2003).

Tabela 3 – Sistema de graduação histopatológica do mastocitoma canino cutâneo proposto por Patnaik et al. (1984)

Graduação	Microscopia
I	Mastócitos bem diferenciados com bordas citoplasmáticas claramente definidas com núcleos regulares esféricos ou ovóides; figuras mitóticas são raras ou ausentes; os grânulos são grandes, de coloração profunda e abundantes; células confinadas à derme e espaços interfoliculares
II	Células compactadas com limites citoplasmáticos indistintos; relação nuclear / citoplasmática menor que a anaplásica; figuras mitóticas infrequentes; mais grânulos do que anaplásico; infiltração de células neoplásicas ou substituir o tecido dérmico inferior e subcutâneo
III	Limites citoplasmáticos indiferenciados, altamente celulares, com tamanho e formato irregulares dos núcleos; figuras mitóticas frequentes;

baixo número de grânulos citoplasmáticos; tecido neoplásico substitui o tecido subcutâneo e profundo

Kiupel et al. (2011) propõe a adoção de um sistema de dois níveis, fundamentado em critérios microscópicos precisos, classificando-os em alto e baixo grau, conforme a Tabela 4.

Tabela 4 - Sistema de dois níveis para graduação histopatológica do mastocitoma canino cutâneo. Adaptado de Kiupel et al. (2011)

Mastocitoma de alto grau	Presença de qualquer dos seguintes critérios: 1) sete ou mais figuras mitóticas em 10 campos de alta ampliação; 2) três ou mais células multinucleadas com três ou mais núcleos em 10 campos de alta ampliação; 3) três ou mais núcleos bizarros em 10 campos de alta ampliação; 4) cariomegalia e anisocariose, definido pela variação de pelo menos duas vezes dos diâmetros nucleares de pelo menos 10% das células neoplásicas. Observação: para avaliar os diferentes parâmetros devem ser escolhidos os campos com maior atividade mitótica ou com o maior grau de anisocariose
Mastocitoma de baixo grau	Ausência dos critérios 1 a 4

O ki-67 é uma proteína expressa durante todas as fases do ciclo celular e pode ser identificada através da imuno-histoquímica. O número relativo desta proteína em um determinado tecido é utilizado para indicar o número de células envolvidas no ciclo de replicação celular. A meia vida desta proteína é curta, pois é degradado aproximadamente uma hora após a mitose (Scase et al., 2006). O Ki-67 é composto por duas subunidades de proteínas presentes nas células durante o ciclo celular, porém ausente durante o repouso. Em um estudo recente comparando os índices de Ki-67 em mastocitomas cutâneos graduados em ambos os sistemas, Patnaik e Kiupel, foi observado o valor mediano no índice de Ki-67 de 2.5, 6.0 e 20.6 para os tumores graduados no sistema de Patnaik como grau I, II e III, respectivamente. Já no sistema de dois níveis de Kiupel foi observado um índice de Ki-67 significativamente menor em mastocitomas de baixo grau quando comparados com os de alto grau. Ainda neste

estudo foi verificado que um alto índice de Ki-67 foi significativamente associado a uma alta incidência de mortalidade relacionada a essa enfermidade (Vascellari et al., 2012).

Os oncogenes derivam de proto-oncogenes, que regulam o crescimento celular e diferenciações de células normais. Diversos produtos dos oncogenes vem sendo estudados, uma vez que os receptores de fatores de crescimento podem estar ativados constantemente ou super expressos no câncer (Kumar et al., 2005)

O KITr é um receptor do fator de crescimento de superfície, normalmente expresso em mastócitos e codificado pelo proto-oncogene *c-KIT*. (Galli et al., 1994). O KITr apresenta um domínio extracelular de ligação ao ligante, uma região transmembranar e uma cauda citoplasmática com atividade tirosina quinase dependente de ligante. Quando o receptor é ativado fosforila proteínas do substrato intracelular, iniciando uma cascata de sinalizações ocasionando diversas atividades biológicas como proliferação, migração, maturação e sobrevivência das células-tronco hematopoiéticas, mastócitos, melanócitos e células de linhagem germinativas (Galli et al., 1994; Serve et al., 1995; Linnekin et al., 1997; Ma et al., 1999;). O ligante para KITr é o fator de células-tronco (SCF), também conhecido ligante KIT ou fator de crescimento de mastócitos (Huang et al., 1990; Zsebo et al., 1990)

A expressão de KITr foi demonstrada através de imuno-histoquímica tanto em mastócitos normais como os neoplásicos, no entanto, foi observada maior expressão em tumores pouco diferenciados (London et al., 1996, Morrini et al., 2004; Webster et al., 2006). A expressão membranar de KITr é ubíqua em mastócitos neoplásicos e não neoplásicos, mas a expressão aberrante, citoplasmática, KIT II ou III, foi associada a pior prognóstico (Kiupel et al., 2004; Webster et al, 2006; Webster et al., 2007) Kiupel et al. (2004) observaram que marcação de KIT apenas na perimembrana de mastocitomas cutâneos caninos não estavam associados à redução no tempo de sobrevida ou recorrência. Em contrapartida, os mastocitomas com marcações de KITr difusas no citoplasma apresentavam menor tempo de sobrevida e altas taxas de recidivas. Desta forma, os autores sugerem que uma nova classificação dos mastocitomas, baseada na localização da expressão do KITr (Tabela 5). Os padrões KIT-II e KIT-III estão correlacionados à maiores taxas de recidiva e menor tempo de

sobrevida dos animais, no entanto, no estudo de Horta et al. (2018) apenas o padrão KIT III se relacionou a pior prognóstico. Newman et al, (2007) não encontrou relação entre a localização do KITr e o prognóstico de pacientes com mastocitomas subcutâneos.

Tabela 5 – Classificação dos mastocitomas baseada na localização da expressão de KITr segundo Kiupel *et al.* (2004)

KIT-I	Apresentam predominantemente citoplasmática, com citoplasmática	marcação em membrana mínima marcação
KIT-II	Intensa marcação citoplasmáticas em focos ou em pontilhados	
KIT-III	Marcação difusa obscurecendo outras citoplasmáticas	citoplasmática, características

No estudo conduzido por Webster et al. (2006) nem todos os pacientes que apresentavam localização aberrante do KIT possuíam mutação em *c-KIT*

As mutações de *c-KIT* não se correlacionam ao padrão de expressão de KITr, mas podem levar a ativação constitutiva do KITr na ausência de ligante (Zemke et al., 2002; Pryer et al., 2003). Diversas anormalidades foram identificadas no mastocitoma canino, principalmente no exon 11, que codifica a região justamembranar, incluindo mutações pontuais e duplicações em tandem internos (London et al., 1999; Ma et al., 1999; Zemke et al., 2002; Riva et al., 2005. Webster et al., 2006). Também foram descritas duplicações em tandem nos exons 8 e 9 do *c-KIT* em mastocitomas cutâneos (Letard et al., 2008). Entretanto, não foram identificadas mutações em outras regiões, como no domínio quinase *c-KIT*, onde comumente ocorre as mutações de mastocitomas em seres humanos. Estudos evidenciaram que cerca de 15 a 40% dos mastocitomas caninos são afetados por mutações do c-kit (London et al., 1999; Ma et al., 1999; Zemke et al., 2002; Jones et al., 2004; Riva et al., 2005; Webster et al., 2006).

No estudo conduzido por Zemke et al. (2002) foi observado grande correlação entre as mutações e o grau histopatológico do tumor, sendo observados uma alta taxa de mutação nos tumores grau II e III, e, nenhuma mutação foi observada nos tumores grau I. Sendo assim, sugere-se que a expressão e as mutações do *c-KIT* podem estar correlacionadas a gênese e progressão tumoral. (London & Seguin, 2003).

. Foram associadas as mutações do *c-KIT* e a localização aberrada da proteína KIT a um aumento da expressão de AgNORs e Ki-67 (Webster et al., 2007). Sendo assim, a avaliação em conjunto de grau histopatológico, padrão da localização de KIT, AgNOR e Ki-67 é a melhor forma de caracterizar o comportamento biológico do mastocitoma.

De qualquer forma, em torno de 60% dos mastocitomas caninos podem não apresentar defeito genético no *c-kit*, sugerindo que as mutações neste gene podem estar associadas ao desenvolvimento ou progressão, porém outras mutações podem estar envolvidas na iniciação e progressão dos mastocitomas caninos (Welle et al., 2008)

2.2. Angiogênese

Para uma célula sair do seu estado normal e assumir características neoplásicas são necessárias a ocorrência de uma série de etapas e transformações. Em 2000 foi proposto pela primeira vez seis características principais, que seriam um conjunto de capacidades funcionais, adquiridas pelas células à medida que sofrem processo de transformação neoplásica, sendo elas a autonomia do sinal de crescimento, a insensibilidade aos sinais inibidores de crescimento, capacidade de invasão de tecidos e metástase, potencial ilimitado de multiplicação, estímulo a angiogênese e bloqueio dos mecanismos naturais de morte celular (Hanahan & Weinberg, 2000). Mais tarde, em 2011, outras quatro características foram incluídas, sendo a reprogramação do metabolismo celular e evasão do sistema imune considerado características principais enquanto a instabilidade genômica e promoção da inflamação pelo tumor consideradas capacidades funcionais (Hanahan & Weinberg, 2011) Recentemente foram propostas quatro novas características:

desbloqueio da plasticidade fenotípica, reprogramação epigenética não mutacional, microbiomas polifórmicos e senescência celular (Hanahan, 2022).

Estudos recentes apontam que a microbiota residente em diferentes tipos de tecido ou colonizando neoplasias incipientes possuem capacidade de contribuir ou interferir com a aquisição de outras capacidades funcionais, além da imunomodulação e mutação do genoma, podendo estimular diretamente na sinalização proliferativa, e de forma não muito clara, parece contribuir para as outras capacidades funcionais do câncer, como evitar a morte celular, induzir a angiogênese e estimular a invasão e metástase. A senescência foi considerada por muito tempo como um mecanismo de proteção contra a neoplasia, no entanto, evidências recentes apontam que, em certos contextos, as células senescentes estimulam o desenvolvimento de tumores e sua progressão. Acredita-se que o principal mecanismo pelo qual as células senescentes promovem fenótipos tumorais seja o fenótipo secretório associado a senescência (SASP, "*senescence associated secretory phenotype*"), capaz de transmitir, de forma parácrina, para células cancerígenas viáveis nas proximidades, bem como para outras células no microambiente tumoral, moléculas sinalizadoras que podem modular outras características funcionais do câncer, sendo demonstrado em sistemas experimentais contribuir para a sinalização proliferativa, evitando a apoptose e induzindo a angiogênese (Hanahan, 2022). Levando em consideração essas propriedades, um importante processo para que um determinado grupo de células consiga manter o crescimento ao ponto de originar um tumor é necessário que exista um aporte sanguíneo específico e constante. Conforme a pesquisa de Folkman (1971), que propôs o importante papel da microvascularização para o processo de crescimento tumoral além de 0,2mm. A partir daí, diversos estudos foram realizados demonstrando a dependência do desenvolvimento tumoral a neovascularização específica, que ocorre em decorrência de diversos fatores locais, como a hipóxia, elevação de CO₂ ou óxido nítrico (Poon et al., 2001; Wang et al., 2005)

A angiogênese é um processo rigorosamente controlado em condições fisiológicas, enquanto no desenvolvimento do tumor a desregulação das células endoteliais vasculares é uma característica essencial do crescimento tumoral e metástase (Ferrara e Davis-Smyth, 1997). É caracterizada pela formação de capilares através da germinação ou divisão (intussuscepção) de capilares pré-existentes,

chamados de angiogênese germinativa ou não germinativa, respectivamente (Risau, 1997). Esse processo é regulado por fatores pró-angiogênicos, como o fator de crescimento fibroblástico, fator de crescimento derivado das plaquetas, fatores de necrose tumoral, moléculas de adesão como integrinas e caderinas, fator de transformação de crescimento alfa, interleucinas 1, 6 e 8, fator de crescimento endotelial, metaloproteinases, fator indutor de hipóxia, COX-2 e as angiopoietinas 1 e 2, bem como os fatores antiangiogênicos locais, como fator plaquetário 4, fator de crescimento transformante beta, inibidores teciduais de metaloproteinases, interferon alfa, prolactina, angiostatina, interleucina 10 e endostatina. Ambas são liberadas tanto pelas células endoteliais, pericitos, células do sistema imunológico, e ainda, pelo tumor (Salcedo, 2003; Rosen, 2005).

O equilíbrio entre as sinalizações proangiogênica e antiangiogênica favorecem a vasculatura na maioria dos tecidos. Nos tumores uma situação semelhante ocorre, levando a um tumor não angiogênico, como um carcinoma “in situ”. No entanto, os tumores que apresentam neovascularização frequentemente expressam maiores níveis de proteínas pró-angiogênicas, com destaque para o VEGF (Folkman, 2002). Essa expressão aumentada pode ser induzida por diversos fatores, incluindo a hipóxia, ativação de oncogenes ou inativação de genes supressores de tumor (Semenza, 2000; Laughner et al., 2001). Frequentemente é observado aumento das metaloproteinases de matriz próangiogênicos em tumores vasculares (Arbiser et al., 1997; Bergers et al., 2000).

O VEGF é um regulador essencial do processo de angiogênese em diversos órgãos na saúde e na doença (Siemeister et al., 1998; Veikkola et al., 2000; Ferrara et al., 2003), atualmente cinco fatores foram evidenciados (VEGF-A, B, C, D e E). Possui atividade mitogênica, angiogênica e aumento da permeabilidade vascular específica para as células endoteliais o que possibilita a proliferação de células endoteliais, conseqüentemente promove o surgimento de vasos a partir de microvasos pré-existentes. Esses efeitos são mediados através de receptores de alta afinidade VEGFR-1 / Flt-1, VEGFR-2 / Flk / KDR e VEGFR-3 / Flt-4 (McMahon, 2000; Veikkola et al., 2000). O VEGFR-1 e VEGFR-2 são expressos, principalmente, no endotélio vascular, enquanto o VEGFR-3 é restrito ao endotélio linfático (Kaipainen et al., 1995; Neufeld et al., 1999). Oncogenes também estimulam a expressão de VEGF, como

membros das famílias Ras e erbB (Okada et al., 1998). Em um estudo recente com cancer de mama humano demonstrou que o estradiol regula o VEGF em células cancerosas (Hyder, 2002).

Diversos estudos recentes verificaram a atuação do VEGF no processo da angiogênese relacionada à doença e/ou como um regulador de crescimento autócrino de células neoplásicas em diversos tumores (Siemeister et al., 1998; Veikkola et al., 2000; Giles, 2001; Gerber & Ferrara, 2003; Shinkaruk et al., 2003) e desempenha um papel na formação de metástases à distância (Guang-Wu, 2000). Na Medicina foram demonstrados em diversos estudos que as células neoplásicas expressavam VEGF, assim como receptores de VEGF, sendo assim, podem utilizar VEGF como um fator de crescimento autócrino (Giles, 2001; Gerber & Ferrara, 2003; Shinkaruk et al., 2003).

Em neoplasias caninas, o VEGF e seu receptor também foram detectados e atualmente são alvos de estudos (Restucci et al., 2002; Wergin & Werginkaser-Hotz 2004). Embora seja caracterizado que os mastócitos normais possam liberar VEGF em várias espécies sob determinadas circunstâncias (ativação celular) e que o VEGF derivado de mastócitos está envolvido na regulação da cicatrização e angiogênese (Boesiger et al., 1998; Artuc et al., 1999), pouco se sabe até o momento sobre a expressão de VEGF em MCTs e sua importância. Porém, ao contrário de outras neoplasias, as células do MCT aparentemente não utilizam o VEGF como regulador de crescimento autócrino (Rebuzzi et al., 2007).

Em estudo realizado por Rebuzzi et al. (2007) foram analisados 18 MCTs com diferentes graduações e avaliado a expressão de VEGF e os receptores Flt-1 e KDR. O estudo revelou que o VEGF foi expresso em todos os MCTs, independentemente do grau histopatológico. No entanto, a intensidade da coloração dos mastócitos e a porcentagem de células positivas variaram entre os pacientes. Foi observado que 91,6% dos pacientes com grau II ou III que a expressão de VEGF estava presente na grande maioria dos mastócitos (n=11), enquanto 60% dos pacientes com doença de grau I, o VEGF foi expresso apenas em um subconjunto menor de mastócitos. Sendo assim, o estudo concluiu que os MCTs caninos expressam VEGF e receptores, no entanto, não utilizam como um regulador de crescimento autócrino. Um resultado

semelhante foi observado no estudo conduzido por Amorim et al. (2009), em que foram analisados 53 MCTs de diferentes graduações e os tumores com desacordo entre graduações foram revisados pelo grupo para chegar a um consenso e, posteriormente, avaliados com imuno-histoquímica para KITr para confirmar diagnóstico. Foi demonstrado que os três graus de mastocitoma não diferiram na proporção ou intensidade da imunomarcção de VEGF, sugerindo também que este não seria um biomarcador adequado para malignidade em MCTs caninos.

No entanto, em um estudo realizado por Giantin et al (2012), em que foram avaliados 35 MCTs quanto a expressão de VEGF, metaloproteinases e inibidores teciduais de metaloproteinases. O VEGF-A foi medido através da qPCR e imuno-histoquímica, demonstrando que ambos os métodos confirmaram a expressão constitutiva de VEGF-A, tanto no mRNA quanto a nível de proteína, nos MCTs. Além disso, observou-se aumento progressivo, mas não significativo, da expressão de mRNA MMP-9 e VEGF-A de acordo com o grau histopatológico, enquanto o TIMP-2 diminuiu. Correlacionando, assim, que a expressão destes são possíveis indicadores de malignidade.

Um resultado semelhante foi encontrado em estudo ainda mais recente, no qual foram analisados 33 cães que foram estadiados de acordo com a classificação da Organização Mundial de Saúde (OMS; IN28) e fatores prognósticos negativos investigados durante o exame físico correlacionando a imunorreatividade mais forte de VEGF ao grau histopatológico do tumor e apontado como um marcador potencial de malignidade e um indicador de prognóstico. Este resultado também foi observado nos mastocitomas cutâneos. No entanto, não foi observado correlação entre a expressão de VEGF e formação de metástase ou comprometimento de margens cirúrgicas (Melo et al., 2021).

O uso de inibidores de angiogênese tumoral vem sendo um grande alvo na terapia contra o câncer. Diversos componentes antiangiogênicos têm sido desenvolvidos, sendo a maioria associada ao VEGF e seus receptores. Sendo assim, determinar a expressão do VEGF em neoplasias pode auxiliar como fator prognóstico ou orientação terapêutica (Panayiotis et al., 2005)

2.3. Metástases

Embora, em grande parte, as alterações genéticas das células malignas controlem as características intrínsecas da invasividade, os componentes moleculares e celulares podem desempenhar um importante papel na invasão e metástase do câncer (Hanahan, 2022) e a angiogênese desempenha uma importante ação no processo de formação e desenvolvimento de metástases (Folkman, 1971).

O processo de metástase hematogênica é complexo, envolvendo interações íntimas entre células malignas com diversas células do hospedeiro. Sendo que, as células do tumor primário devem intravasalar pela parede do vaso e ganhar a circulação, e este processo requer interações entre as células tumorais e células perivasculares, como os pericitos, células endoteliais e, possivelmente, células inflamatórias (Pollard, 2004; Joyce e Pollard, 2009; Psaila e Lynden, 2009). Além disso, é necessário que as células tumorais e hospedeiras produzam diversas moléculas sinalizadoras que modulam a morfologia celular, migração, proliferação, produção de proteases e moléculas de adesão. Ao chegar em seu destino, as células tumorais precisam novamente interagir com células endoteliais e perivasculares para sofrer extravasamento (Gupta e Massangué, 2006).

A metástase linfonodal representa o primeiro passo da disseminação tumoral de alguns tumores (Kyzas, 2005; Achen e Stacker, 2008). O processo ainda não está muito claro, no entanto, acredita-se que as células tumorais invadam os vasos linfáticos pré existente na periferia tumoral ou induzem crescimento e dilatação dos vasos através da produção de fatores de crescimento (He et al., 2005; Giampieri et al., 2009). Em tumores, a expressão de fatores linfangiogênico, como o VEGF-C e D, correlacionaram-se com invasão linfática, acometimento de linfonodo e metástase à distância a um pior prognóstico (Tammela e Alitalo, 2010). Em estudos realizados com camundongos, a expressão de VEGF-C induziu brotamento linfático, e, com as alterações induzidas pelo VEGF-C nos capilares linfáticos, promoveu a entrada de células tumorais em linfonodos (He, et al., 2005; Tammela et al., 2010).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Em caráter retrospectivo, foram avaliadas amostras de MCTs primários coletadas por oncologistas da grande Vitória/ES que foram processadas pelo laboratório de patologia Maylla Gava, em Vila Velha/ES e incluídas as que tinham diagnóstico de mastocitomas com metástase suspeita, inicial ou confirmada, em linfonodo regional, totalizando 28 pacientes. As amostras foram coletadas entre abril de 2020 e dezembro de 2021, descartando pacientes com mais de um nódulo e apresentação multicêntrica ou subcutânea. Foram coletadas informações quanto a raça, idade, sexo, localização do tumor primário, linfonodo acometido, tamanho e superfície tumoral. Os acompanhamentos clínicos foram realizados na clínica Oncopet ou por telefone com o oncologista responsável pelo atendimento do paciente.

3.1. Avaliação Histopatológica

As amostras foram avaliadas pelo mesmo patologista (Maylla Garshagen Gava).

As bordas do fragmento do tumor primário foram pintadas com tinta nanquim e utilizadas para avaliação microscópica das margens cirúrgicas, conforme descrito por Meuten (2017): margem limpa (2-5 mm) ou próxima (1-2 mm), sem margem de segurança (<1mm) e margem infiltrada (comprometida). Cortes longitudinais de 2 mm foram realizados para inclusão em parafina, para o tumor primário e linfonodo (incluindo a gordura perilinfonodal). As lâminas foram preparadas em micrótomo e coradas pelo azul de toluidina e hematoxilina-eosina (HE). A avaliação microscópica dos tumores primários incluiu a avaliação das margens cirúrgicas e contagem de figuras mitóticas (em 10 campos de maior aumento). A graduação foi realizada de acordo com critérios histomorfológicos definidos por dois estudos distintos: Patnaik et al. (1984) e Kiupel et al. (2011). A avaliação dos linfonodos seguiu os critérios propostos por Weishaar et al. (2014), considerando o nível de comprometimento do linfonodo pelo mastocitoma em três categorias: suspeito (HN1), metástase inicial (HN2) ou evidente (HN3).

3.2. Avaliação Imuno-histoquímica

A imuno-histoquímica foi realizada usando anticorpos contra VEGF (clone VG1, DakoCytomation). Os tumores foram seccionados em frações de 3 µm de espessura e montado em lâminas revestidas com 3-amino-propiltriétoxissilano. As lâminas foram desparafinizadas e reidratadas em uma série de etanol graduada.

O tratamento foi realizado com EDTA pré-aquecido, pH 5,6. Os anticorpos foram diluídos em diluente de anticorpo na proporção de 1:200. A expressão VEGF foi medida em todas as amostras e a coloração foi avaliada conforme a Tabela 6. Sendo a coloração foi marcada como '0' (nenhuma coloração detectada nas células tumorais); '+' (<10% da área do tumor mostrou coloração positiva); '+' (10–25% corado), '++' (>25–50% corado) ou '+++' (>51% corado). A expressão foi definida como negativo quando a marcação citoplasmática foi menor do que 10% e positivas quando marcadas em um valor maior ou igual a 10%. A intensidade da coloração não foi pontuada neste método (Chan et al, 2007).

Tabela 6 – Método de avaliação de VEGF.

Coloração	Pontuação	Resultado
0	-	Negativo
<10%	+/	Negativo
10-25%	+	Positivo
25-50%	++	Positivo
>51%	+++	Positivo

3.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A concordância da expressão de VEGF no tumor primário e linfonodo foi avaliada pelo teste Kappa de Cohen (introduzido por Jacob Cohen no Journal Educational and Psychological Measurement em 1960). Para a interpretação considerou-se resultados variando de concordância discreta a quase perfeita, de acordo com a tabela com os valores das concordâncias abaixo (Tabela 7). (Cohen, 1960; McHugh, 2012).

Tabela 7 – Teste Kappa de Cohen's.

Valores	Concordância
0,01 – 0,20	Discreta
0,21 – 0,40	Leve
0,41 – 0,60	Moderada
0,61 – 0,80	Substancial
0,81 – 1,00	Quase perfeita

Também foi realizado a correlação de Pearson, sendo considerado significativo com $p < 0,05$ e $R < 0,3$ fraca correlação, 0,3 a 0,7 moderada e $> 0,7$ forte.

A sobrevida, avaliada da cirurgia até o óbito, censurados os que perderam acompanhamento ou vieram a óbito por razões não relacionadas ao tumor, foram estimadas pela curva de Kaplan-Meier. As comparações de acordo com a expressão de VEGF, mas também graduação de Patnaik e Kiupel, classificação do linfonodo de Weishaar e realização de terapia adjuvante sistêmica foram realizadas pelo teste de longrank. Foram consideradas significativas as diferenças com $p < 0,05$. Todas as análises estatísticas foram realizadas no GraphPadPrism v. 6.02.

4. RESULTADOS

No que diz respeito às características individuais foram observadas que dos 28 pacientes, 42,8% (16/28) eram fêmeas e 57,1% (12/28) eram machos, a idade variou entre 4 e 14 anos, com uma média de 9 anos. Os cães sem raça definida representaram 25% (7/28) dos pacientes, Bulldogue Frânces e Labrador Retriever representaram 10,7% (3/28) individualmente, Pitbull e Boxer 7,1% (2/28) seguido do Beagle, Dogo Argentino, Lhasa Apso, Maltês, Pinscher, Poodle, Schnauzer, Sharpei, Shih-tsu, Teckel e Yorkshire Terrier que representaram 3,6% cada (1/28).

Os tumores primários foram avaliados conforme localização, características da superfície, presença de necrose ou ulceração e tamanho. A Localização dos tumores primários foi bastante variada, 25% (7/28) estavam localizados em região de

membros, 21,4% (6/28) em bolsa escrotal, a região labial representou 10,7% (3/28) dos casos, as mamas, tórax, dorso e dígitos corresponderam a 7,1% cada (2/28) dos pacientes, respectivamente. Já as regiões de abdome, base de orelha, interdígito e prepúcio representaram 3,6% cada (1/28). No que diz respeito as características de superfície tumoral foram observadas que 25% (7/28) apresentavam eritema, 53,6% (15/28) eram alopecicos, 21,4% (6/28) estavam ulcerados e a necrose estava presente em 28,6% (8/28) dos tumores avaliados. O tamanho do tumor variou entre 1 e 7 cm. As síndromes paraneoplasias foram observadas em apenas 17,8% (5/28), sendo o edema e eritema os mais recorrentes, presentes em 80% (4/5), e em seguida a anemia, trombocitopenia, hemorragia, gastrite, enterite e êmese, presente em 40% (2/5).

Os linfonodos foram avaliados conforme a drenagem linfática esperado pela localização anatômica do mastocitoma extirpado, sendo assim, 39,3% (11/28) eram linfonodos inguinais, 17,8% (5/28) corresponderam aos axilares e poplíteos, submandibulares e pré-escapulares representaram 14,3% (4/28) cada.

Os dados individuais sobre graduação, metástase em linfonodo, figuras de mitose, localização, linfonodos acometidos expressão de VEGF estão dispostos na Tabela 8.

Na avaliação histopatológica dos tumores deste estudo foi observado que 53,6% (15/28) eram grau II/baixo grau, 25% (7/28) eram grau II/alto grau, enquanto 21,4% (n=6) eram grau III/alto grau. Os linfonodos HN1 representaram 7,1% (2/28), enquanto os HN2 corresponderam a 46,5% (13/28), dentre estes 76,9% eram de baixo grau e 23,1% eram de alto grau. Já os demais 46,5% (13/28) foram classificados como HN3, sendo que 76,9% eram de alto grau e 23,1% eram de baixo grau.

No que diz respeito a avaliação da expressão de VEGF foi observado positividade tanto no tumor primário e metástase nodal em 14,3% (4/28) dos casos, mas não houve expressão em ambos em 53,6% (15/28). Os tumores primários negativos e metástases positivas ocorreu em 21,4% (6/28) e o inverso ocorreu em 10,7% (3/28) dos casos avaliados, conforme disposto na Tabela 9. No teste de Cohen foi observado concordância leve (0,25) entre tumor primário e linfonodo.

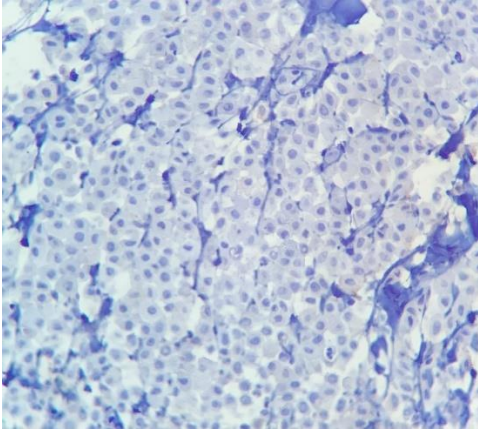


Figura1: Mastocitoma Canino. VEGF NEGATIVO. Obj. 20x

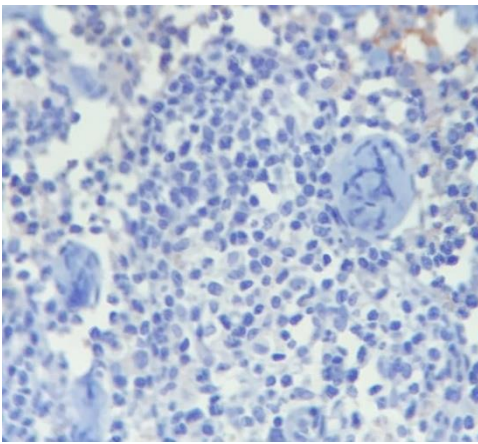


Figura2: Metástase de Mastocitoma Canino em linfonodo. VEGF NEGATIVO. Obj. 20x.

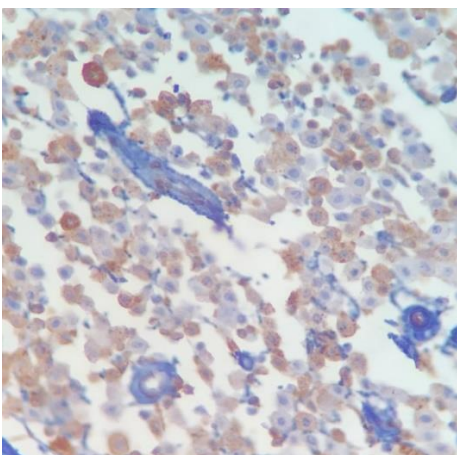


Figura 3: Mastocitoma Canino. VEGF NEGATIVO. Notar padrão irregular e pálido de marcação. Obj. 20x.

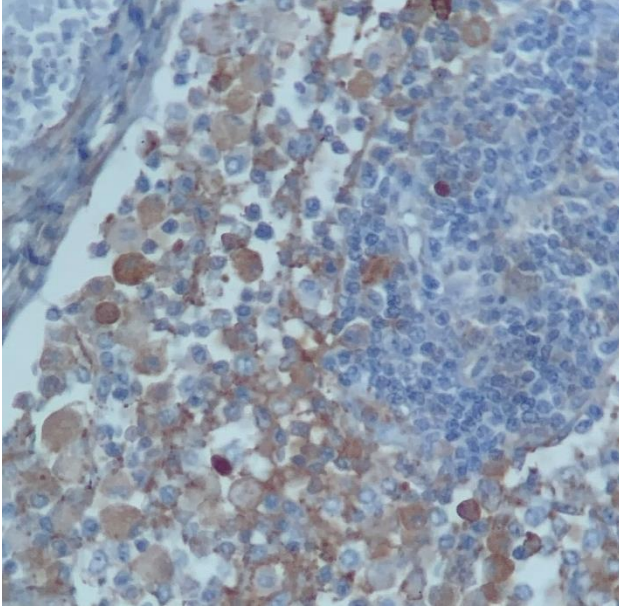


Figura 4: Metástase de Mastocitoma Canino em linfonodo. VEGF NEGATIVO. Notar padrão irregular e pálido de marcação. Obj. 20x.

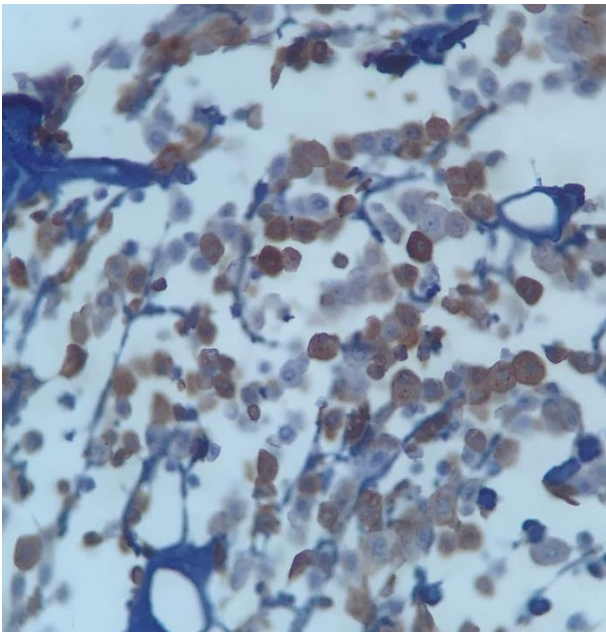


Figura 5: Mastocitoma Canino. VEGF POSITIVO. Notar intensidade de marcação em todo citoplasma. Obj. 20x.

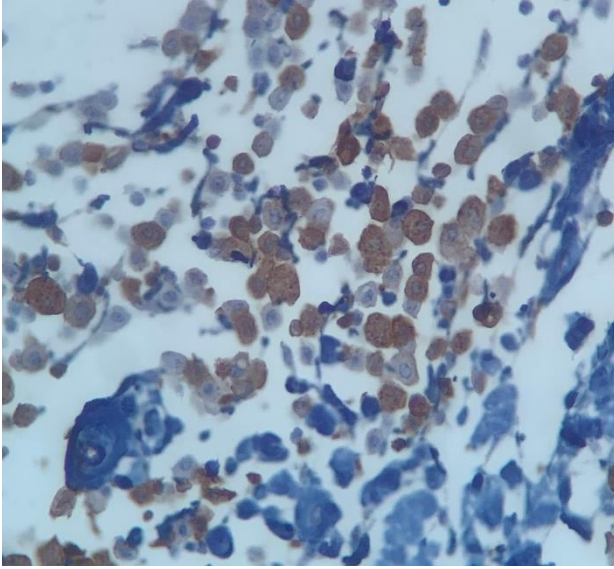


Figura 6: Metástase de Mastocitoma Canino em linfonodo. VEGF POSITIVO. Notar intensidade de marcação homogênea e intensa no citoplasma. Obj. 20x.

Tabela 8. Informações individuais referentes a 28 casos de mastocitoma cutâneo canino quanto à localização, linfonodo acometido, graduação histopatológica segundo Patnaik e Kiupel, metástase em linfonodos, número de figuras de mitose e expressão de VEGF.

Região do tumor	Linfonodo acometido	Patnaik	Kiupel	Metástase em Linfonodo	Figuras de mitose	VEGF Tumor Primário	VEGF em metástase
Abdome	Inguinal	II	Alto grau	HN3	2	P	P
Orelha	Submandibular	II	Baixo grau	HN2	2	N	N
Bolsa Escrotal	Inguinais	III	Alto grau	HN2	9	N	N
Bolsa Escrotal	Inguinais	II	Baixo grau	HN2	0	N	N
Bolsa Escrotal	Inguinais	III	Alto grau	HN3	15	N	N
Bolsa Escrotal	Inguinais	II	Alto grau	HN3	17	N	P
Bolsa Escrotal	Inguinais	III	Alto grau	HN3	14	N	P
Bolsa Escrotal	Inguinais	II	Alto grau	HN3	8	P	P
Digito	Cervical superficial	III	Alto grau	HN3	9	N	N
Digito	Cervical superficial	II	Alto grau	HN2	2	N	N
Dorso	Axilar	II	Baixo grau	HN2	3	N	N
Dorso	Axilar	II	Baixo grau	HN3	5	N	P
Interdígito	Poplíteo	II	Baixo grau	HN2	0	N	N
Labial	Submandibular	II	Alto grau	HN3	2	N	N
Labial	Submandibular	III	Alto grau	HN3	22	P	N
Labial	Submandibular	II	Baixo grau	HN3	0	N	N
Mama	Axilar	II	Baixo grau	HN2	4	P	P

Mama	Inguinal	II	Alto grau	HN3	4	P	N
Membro pélvico	Poplíteo	II	Alto grau	HN2	3	N	N
Membro pélvico	Poplíteo	II	Baixo grau	HN1	2	N	N
Membro pélvico	Inguinal	II	Baixo grau	HN1	0	N	N
Membro pélvico	Poplíteo	II	Baixo grau	HN2	0	N	P
Membro pélvico	Inguinal	II	Baixo grau	HN3	0	P	P
Membro torácico	Cervical superficial	II	Baixo grau	HN2	2	N	N
Membro torácico	Cervical superficial	III	Alto grau	HN3	18	N	N
Prepúcio	Inguinal	II	Baixo grau	HN2	0	N	P
Torácica	Axilar	II	Baixo grau	HN2	0	P	N
Torácica	Axilar	II	Baixo grau	HN2	0	N	P

Tabela 9 – Expressão de VEGF em mastocitomas primários e respectivas metástases nodais de acordo com a graduação histopatológica do tumor primário segundo Patnaik e Kiupel.

Expressão de VEGF em tumor e metástase	Graduação de Patnaik e Kiupel		
	Grau II/baixo grau	Grau II/alto grau	Grau III/alto grau
Tumor P / Metástase P	10,7% (3/16)	3,5% (1/6)	-
Tumor P / Metástase N	3,5% (1/16)	3,5% (1/6)	3,5% (1/6)
Tumor N / Metástase P	14,2% (4/16)	3,5% (1/6)	3,5% (1/6)
Tumor N / Metástase N	28,5% (8/16)	10,7% (3/6)	14,3% (4/6)

Recidiva local ocorreu em 10,7% (3/28) dos pacientes, destes todos vieram a óbito devido a progressão da doença, bem como cinco pacientes que não apresentaram recidiva local, totalizando 21,4% (8/28) de óbitos. Após a extirpação cirúrgica 21,4% (6/28) dos pacientes não realizaram nenhum protocolo quimioterápico, sendo que destes 2/6 apresentaram recidiva local e 3/6 vieram a óbito. Os protocolos quimioterápicos utilizados foram variados, no entanto observou-se que dos 22 pacientes que realizaram quimioterapia adjuvante, apenas 4,5% (1/22) apresentaram recidiva e 22,7% (5/22) vieram a óbito. Dos pacientes que apresentaram recidivas locais 25 apresentavam margem exíguas, no entanto foi observado neste estudo que apenas 10,7% (3/28) apresentavam margens livres. Dos que apresentavam margem livre nenhum teve recidiva, enquanto os pacientes que tinha margem exígua apenas 12% (3/25) apresentaram recidiva local.

As correlações estão dispostas na Tabela 10. Nesta análise vale destacar que houve correlação moderada entre a graduação de Kiupel número de figuras de mitose e classificação quanto ao linfonodo regional. Também apresenta correlação moderada o número de figuras de mitose presente no tumor primário e a classificação do linfonodo. Necrose e ulceração tumoral apresentaram correlação moderada entre as graduações, tanto de Kiupel quanto de Patnaik, assim como com número de figuras de mitose e classificação do linfonodo. No que diz respeito a expressão de VEGF houve correlação fraca entre a expressão no tumor primário e tamanho do tumor. As síndromes paraneoplásicas apresentaram correlação com recidiva e óbito.

Tabela 10 – Correlação de Pearson com respectivos valores de p e r em 28 cães com mastocitoma cutâneo.

	P < 0,05	Correlação R
Graduação de Kiupel		
Necrose tumoral	0,004	0,520
Ulceração tumoral	0,004	0,520
Graduação de Patnaik	0,001	0,560
Nº de figura de mitoses	0,0001	0,665
Classificação do Linfonodo	0,001	0,567
Sobrevida	0,031	-0,406
Óbito relacionado ao mastocitoma	0,004	0,520
Síndromes paraneoplásicas	0,006	-0,500
Graduação de Patnaik		
Necrose tumoral	0,0002	0,633
Ulceração	0,019	0,440
Síndromes paraneoplásicas	0,019	-0,438
Nº de figura de mitoses		
Necrose tumoral	0,010	0,478
Ulceração tumoral	0,006	0,503
Classificação do linfonodo	0,003	0,503
Óbito relacionado ao mastocitoma	0,047	0,378
Classificação do linfonodo		
Necrose tumoral	0,007	0,493
Ulceração tumoral	0,007	0,493
Ulceração tumoral		
Síndromes paraneoplásicas	0,003	-0,530
Necrose Tumoral		
Sobrevida	0,025	-0,422
Localização do tumor		
Tamanho tumoral	0,010	-0,475
Sobrevida	0,005	-0,509
VEGF no tumor		
Tamanho tumoral	0,016	0,045

Síndrome Paraneoplásica		
Recidiva	0,018	0,441
Óbito relacionado ao mastocitoma	0,012	-0,530
Óbito		
Tamanho	0,038	0,392
Recidiva	0,002	0,547
Sobrevida		
Tratamento sistêmico	0,017	-0,445
Quimioterápico		
Raça	0,0003	0,623
Tamanho	0,012	0,354

Em relação à expressão de VEGF não foi atingida a mediana de sobrevida nos grupos positivo e negativo, conforme Figura 2, e, não houve diferença pelo teste de longrank ($p = 0,6799$). Quando avaliado individualmente apenas os tumores primários negativos e positivos a mediana foi atingida apenas nos negativos (521 dias), demonstrado na Figura 3, e não houve diferença nas curvas de sobrevida ($p = 0,8328$). Já na avaliação dos linfonodos as medianas não foram atingidas (Figura 4) e não houve diferença ($p = 0,6458$). Dos pacientes que foram submetidos à tratamento sistêmico, notou-se que a mediana foi atingida apenas nos que não realizaram terapia sistêmica (175 dias), conforme exposto na Figura 5, ($p < 0,0001$). Com relação a avaliação histopatológica do tumor, ao analisar pacientes grau II e pacientes grau III foi observado mediana de sobrevida de 144,5 em pacientes classificados como grau III (Figura 6), com diferença na curva ($P < 0,0001$). Resultado similar foi observado na graduação de Kiupel, disposto na Figura 7, comparando entre alto e baixo grau, a mediana para os de alto grau foi de 175 dias ($P < 0,0001$). Já nas avaliações da classificação do linfonodo HN1 e HN3 apresentaram medianas de 483 e 521 dias, respectivamente. A mediana não foi atingida em HN2, entretanto não houve diferença nas curvas de sobrevida quanto à classificação do linfonodo ($p = 0,1485$), conforme figura 8.

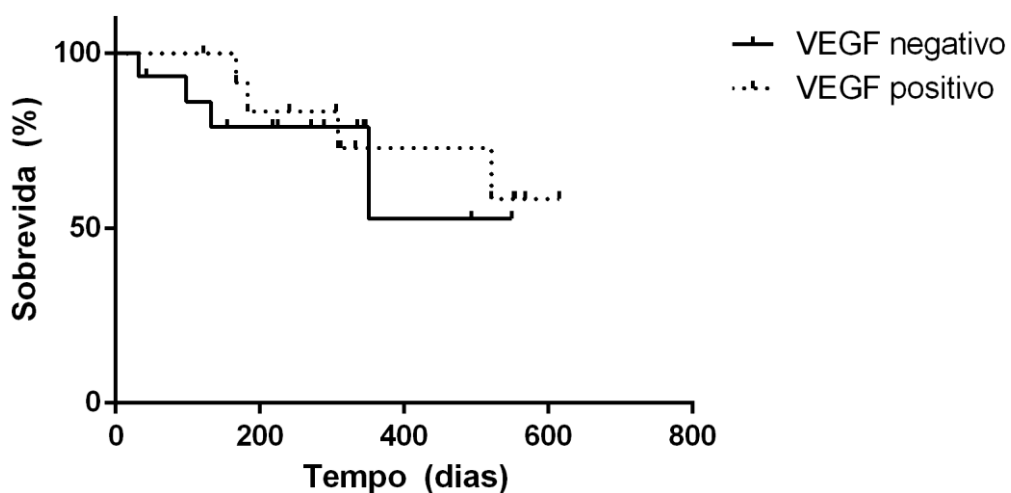


Figura 2: Curva de Kaplan-Meier de sobrevida de 28 cães com mastocitoma no estágio II, de acordo com a expressão de VEGF em tumor primário e metástase nodal, mediana de sobrevida não atingida ($p = 0,6799$).

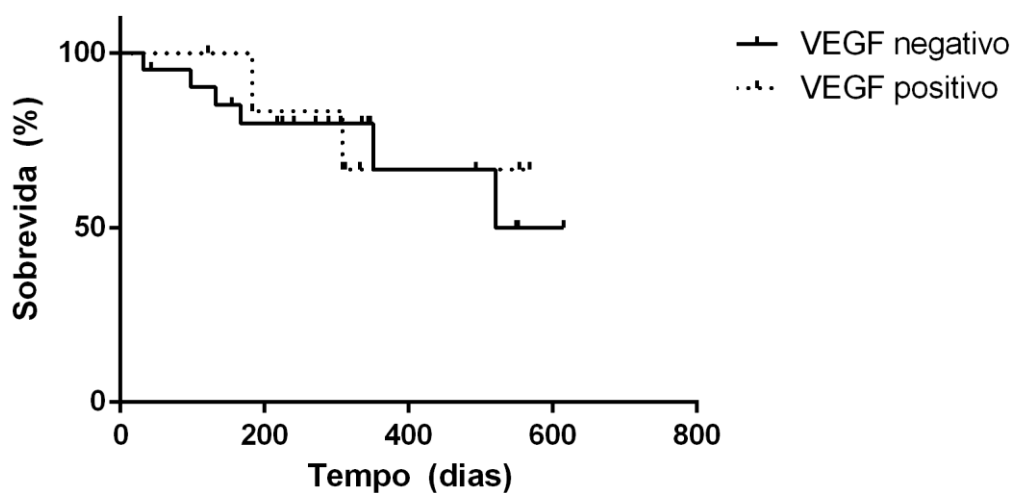


Figura 3: Curva de Kaplan-Meier de sobrevida de 28 cães com mastocitoma no estágio II, de acordo com a expressão de VEGF em tumor primário, positivo não atingiu a mediana de sobrevida e negativos 521 dias ($p = 0,8328$).

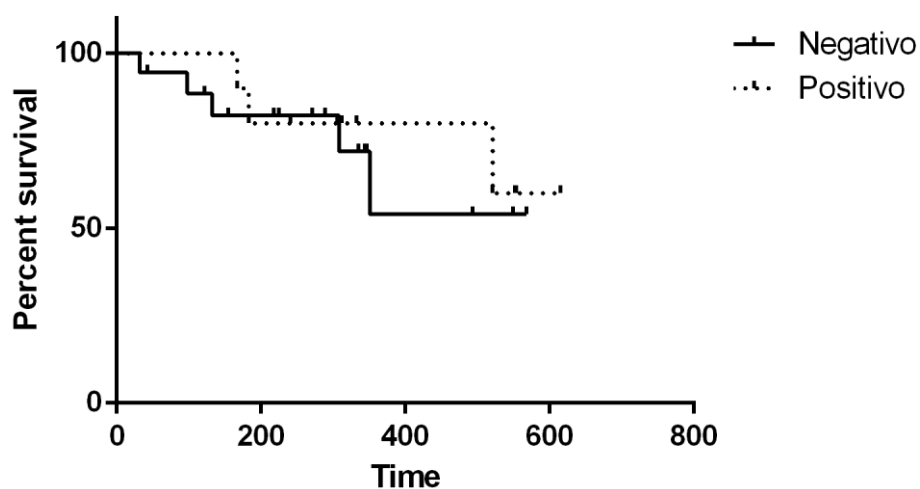


Figura 4: Curva de Kaplan-Meier de sobrevida de 28 cães com mastocitoma no estágio II, de acordo com expressão de VEGF em linfonodo regional, medianas não atingidas ($p = 0,6458$).

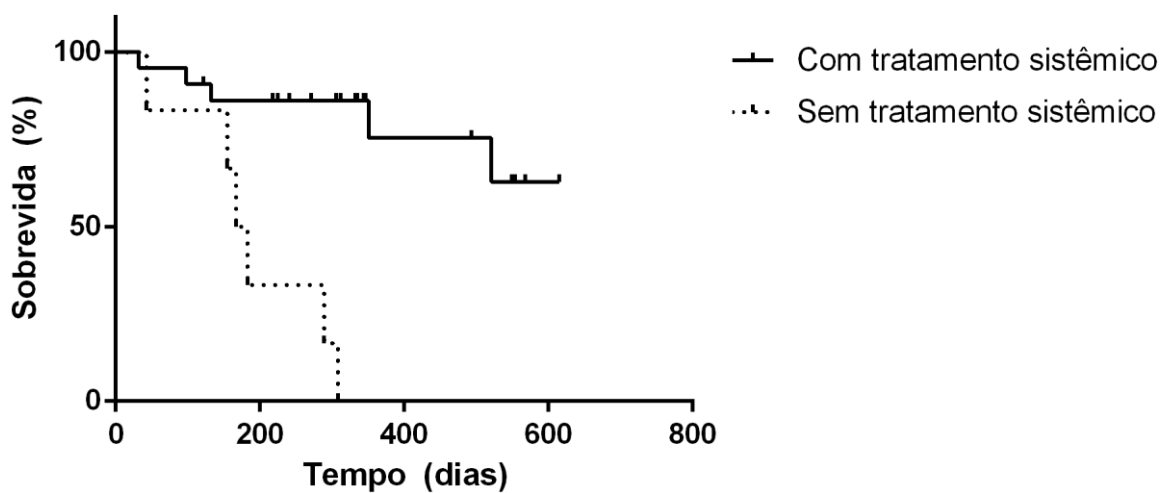


Figura 5: Curva de Kaplan-Meier de sobrevida de 28 cães com mastocitoma no estágio II, de acordo com realização de tratamento sistêmico, sem tratamento sistêmico atingiu mediana de 175 dias e com tratamento não atingiu a mediana ($p < 0,0001$).

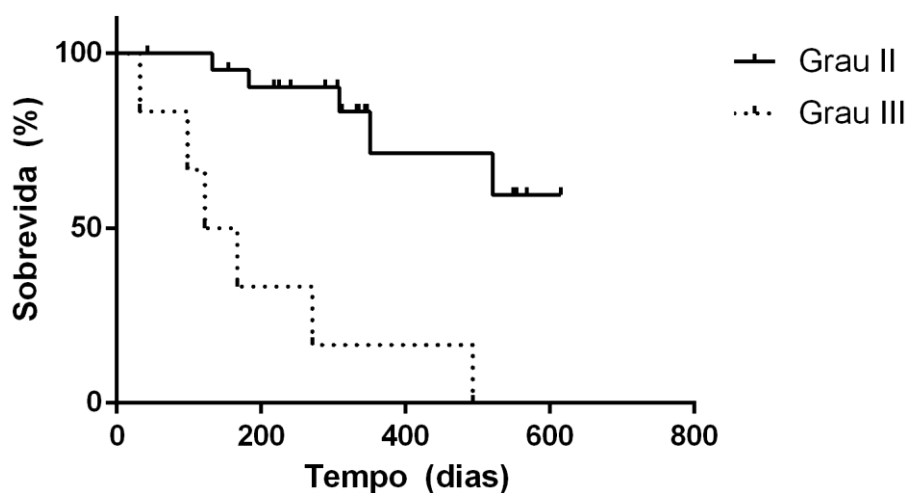


Figura 6: Curva de Kaplan-Meier de sobrevida de 28 cães com mastocitoma no estágio II, de acordo com a graduação de Patnaik. Tumores grau II não atingiu a mediana, grau III mediana de 144,5 dias ($p < 0,0001$).

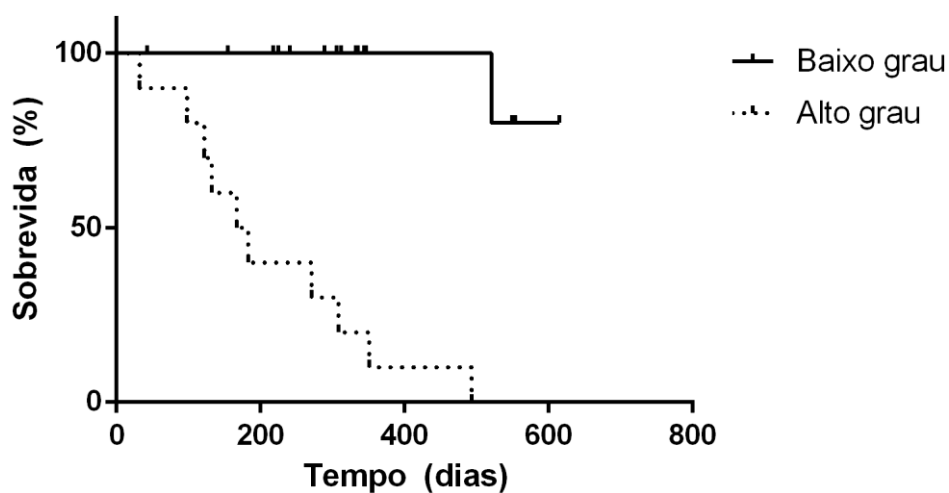


Figura 7: Curva de Kaplan-Meier de sobrevida de 28 cães com mastocitoma no estágio II, de acordo com a graduação de Kiupel. Tumores de baixo grau não atingiram a mediana e de alto grau mediana de 175 dias ($p < 0,0001$).

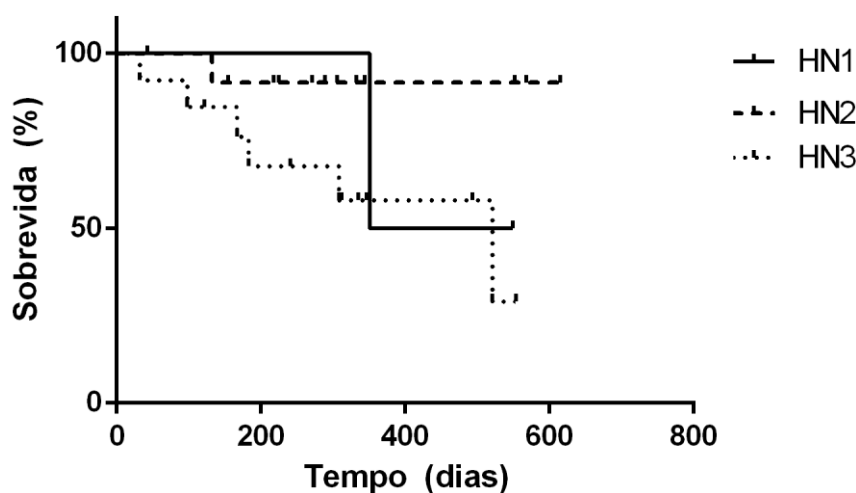


Figura 8: Curva de Kaplan-Meier de sobrevivência de 28 cães com mastocitoma no estágio II, de acordo com as classificações HN1, HN2 e HN3 do linfonodo. Linfonodos HN1 mediana de 483 dias, HN2 não atingiu a mediana e linfonodos HN3 mediana de 521 dias ($p = 0,1485$).

5. DISCUSSÃO

O MCT canino é uma neoplasia maligna de grande importância na prática clínica, devido ao seu comportamento biológico e frequentes recidivas após cirurgias. Sendo um dos tumores cutâneos mais comuns nesta espécie. (London & Seguin, 2003; Thamm & Vail, 2007; Blackwood et al., 2012; De Nardi et al., 2022). Os atuais estudos não são consensuais quanto a predileção sexual. No que diz respeito a faixa etária, cães de todas as idades podem ser acometidos, no entanto é mais comum em animais adultos e idosos (London & Seguin, 2003; Blackwood et al. 2012; De Nardi et al., 2022). Neste estudo notou-se uma maior prevalência em machos e a idade foi variada, desde pacientes jovens a senis, conforme descrito na literatura.

Algumas raças apresentam predisposição a desenvolver este tipo de tumor, sendo descrito pela literatura os Boxer, Bullterrier, Buldogue Francês, Retrievers, Sharpei, Pugs, Pitbull e Dachshund (London & Seguin, 2003; Kiupel et al., 2005; Furlani et al., 2008; De Nardi et al., 2022). No presente estudo foi observado maior incidência em cães sem raça definida, seguido das raças Labrador Retriever, Buldogue Francês, Pitbull e Boxer. No Brasil temos uma alta incidência de cães sem

raça definida, o que pode justificar maior incidência, as demais raças corroboram com o descrito na literatura (London & Seguin, 2003; Kiupel et al., 2005; Furlani et al., 2008; De Nardi et al., 2022).

Quanto a localização, é descrito maior incidência em região de tronco e perineal, seguido dos membros e menos frequentemente em pescoço e cabeça (Thamm & London 2020). No presente estudo foi observado maior incidência em região de membros, seguido da região inguinal e labial. Alguns autores acreditam que os tumores localizados em região inguinal e labial apresentam pior prognóstico devido ao comportamento mais agressivo (O'Keefe, 1990; Govier, 2003; Gieger et al., 2003), o que pode justificar uma maior incidência nesses locais, uma vez que o presente estudo utilizou uma amostragem com metástase já confirmada em linfonodos (estágio II segundo a OMS).

O aspecto clínico desses tumores é extremamente variável, sendo difícil a sua distinção com a de outros tumores cutâneos. Macroscopicamente pode se observar alopecia, ulceração e eritema (Blackwood, 2012). Nos tumores avaliados foi observado alopecia em aproximadamente metade dos casos, seguido da presença de necrose, eritema e ulceração, conforme descrito na literatura.

Os cães podem apresentar síndromes paraneoplásicas, devido à liberação de constituintes bioativos presentes nos grânulos dos mastócitos. Localmente, essas substâncias podem causar edema, ulceração e anormalidades de coagulação. Os efeitos sistêmicos mais comuns são sinais gastrointestinais, incluindo vômitos, hemorragias gastrointestinais, anorexia e algia abdominal (Blackwood et al., 2012, De Nardi et al., 2022). Neste estudo notou-se manifestação de síndrome paraneoplásica em apenas 12,8% dos tumores avaliados, sendo mais recorrente o edema e eritema.

A graduação histopatológica é o método de eleição para prever o comportamento biológico deste tumor. Embora o sistema de Patnaik seja considerado "padrão ouro" para o prognóstico dos mastocitomas, o predomínio de mastocitomas grau II e sua discordância entre observadores em outros trabalhos diminui a confiança nesse sistema de classificação. Kiupel et al. (2011) avaliou a eficácia da graduação histopatológica proposta por Patnaik, e observou que concordância entre os profissionais foi de 75% para o diagnóstico de mastocitoma grau III e menos de 64%

para o diagnóstico de grau I e II. O resultado deste estudo revelou uma diferença relevante entre os patologistas, indicando subjetividade dessa graduação. Baseado neste estudo, Kiupel et al. (2011) propõe que a solução para a variação encontrada no uso da graduação Patnaik, é a adoção de um sistema de dois níveis. No presente estudo optou-se por utilizar as duas graduações propostas, observando maior prevalência de grau II/ baixo grau, seguido de grau II/ alto grau e em menor quantidade de grau III/alto grau. Os tumores bem diferenciados apresentam um comportamento indolente, sendo na grande maioria curativa com excisão cirúrgica, sendo menos de 10% capaz de formar metástases (Patnaik et al., 1984; Simoes et al., 1994), não sendo observado em nenhuma amostra deste estudo, corroborando com o descrito com a literatura de que os tumores de grau I apresentam baixa capacidade metastática. Os tumores intermediários apresentam comportamento biológico variável, apresentando capacidade metastática de 5-22% dos casos (Patnaik et al., 1984; Simoes et al., 1994). No entanto, mesmo o sistema de dois níveis proposto por Kiupel, não foi possível avaliar com exatidão o comportamento dos mastocitomas. No estudo conduzido por Stefanello et al. (2015) realizado com 368 animais foram encontradas metástases nos linfonodos regionais em 15% dos mastocitomas classificados como baixo grau. Em um estudo conduzido por Bae et al., 2019 foram avaliados tumores de baixo grau porém que apresentaram comportamento mais agressivo, neste estudo retrospectivo foram avaliados 121 animais que já apresentavam metástase nodal ou a distância no tratamento inicial. Neste presente estudo 78,6% dos tumores avaliados eram grau II, sendo destes 53,6% eram de baixo grau e 25% de alto grau, corroborando com o descrito com a literatura de que este tumor apresenta difícil previsão de comportamento biológico. Desta forma, recomenda-se a avaliação dos dois sistemas em conjunto e em associação com outros fatores prognósticos clínicos e moleculares.

A linfadenectomia profilática refere-se à extirpação dos linfonodos em pacientes mesmo sem evidência clínica de envolvimento nodal (Gambardella et al., 2019). A remoção do linfonodo sentinela do mastocitoma é amplamente documentada no mastocitoma canino, sendo a presença de metástase um fator de prognóstico bem conhecido. Em um estudo conduzido por Marconato et al (2018) demonstrou que pacientes com tumor grau II se beneficiaram com a extirpação. Neste estudo foram

avaliados 152 cães, dentre estes 81 foram submetidos a ressecção cirúrgica e confirmação de metástase por histopatológico e 71 não realizaram a retirada porém a metástase foi confirmada por citologia. Na análise univariável, o risco de desenvolvimento de recidiva local, nodal ou distante foi significativamente maior no grupo que não realizou a ressecção ($p < 0,001$) e na análise multivariada, o risco de progressão do tumor e óbito foi maior ($p < 0,001$). Um resultado semelhante foi obtido em um estudo conduzido por Chalfon et al (2022), onde 49 animais com tumores grau II e alto grau foram avaliados, sendo 31 animais foram submetidos a retirada do linfonodo os demais não. O tempo médio para progressão foi significativamente menor em cães que não foram submetidos à linfadenectomia, bem como o tempo de sobrevida. Na análise multivariável, a falta de linfadenectomia foi associada a maior risco de progressão geral do tumor, progressão nodal e morte relacionada ao tumor. Sabbatini et al (2021) realizou um estudo similar com a extirpação do linfonodo regional em MTC em tumores grau I. Este estudo avaliou 64 animais com tumores grau I baixo grau, sendo destes 29 foram submetidos a linfadenectomia e os demais fizeram parte do grupo controle. A avaliação de curvas revelou uma tendência a um melhor tempo de progressão do grupo que foi submetido a extirpação nodal ($P=0,058$) e o grupo controle apresentou um maior número de animais que apresentaram progressão da doença ($P=0,028$). Sendo assim, a linfadenectomia do linfonodo regional de MTC, independente de sua graduação, parece beneficiar o paciente e aumentar a sobrevida, bem como a associação da classificação histopatológica deste linfonodo pode trazer mais informações a respeito do prognóstico da doença. Uma vez que a avaliação histopatológica proposta por Weishaar et al. (2014) visa auxiliar na classificação dos mastócitos presentes em linfonodos suspeitos de pacientes com mastocitoma. Sendo linfonodos classificados como HN0/HN1 apresentam melhor prognóstico quando comparado com os classificados como HN2/HN3. Foi observado neste estudo uma maior presença de linfonodos HN2 seguido de HN3. Por se tratar de um estudo retrospectivo, entretanto, não foi possível afirmar quais linfonodos apresentaram-se clinicamente anormais anteriormente à cirurgia.

Na Medicina Veterinária, a expressão do VEGF ainda é pouco estudada, porém já é relatado em algumas neoplasias de cães e gatos, como no mastocitoma, neoplasia mamária e seminoma (Restucciet al., 2000; Restucci et al., 2003; Rebuzzi

et al., 2006; Millanta et al., 2006; Rodigheri, 2008). Millanta et al. (2006) relataram que, em neoplasias mamárias de cadelas e gatas houve correlação entre o aumento da expressão e a perda da diferenciação tumoral, no entanto, o percentual de expressão de VEGF não estava associado ao estadiamento clínico ou sobrevida do animal.

Diversos estudos sugerem que o VEGF e seus receptores são expressos em alguns tumores malignos, incluindo tumores sólidos e neoplasias hematopoiéticas (Wolfesberger et al., 2007, 2008; Qiu et al., 2008; Matiasek et al., 2009; Millanta et al., 2010; Mederle et al., 2010; Restucci et al., 2002) e servindo como um fator de crescimento autócrino (Giles, 2001; Gerber e Ferrara, 2003; Shinkaruk et al., 2003). Bem como o aumento da angiogênese, e o VEGF, podem estar correlacionados com a agressividade da neoplasia (Weidner et al., 1991; Restucci et al., 2002, 2004; Gerber e Ferrara, 2003; Ranieri et al., 2003; Wergin e Kaser-Hotz, 2004). No entanto, foi observado que mastócitos normais podem expressar e liberar VEGF, e que o VEGF derivado de mastócitos está envolvido na regulação da angiogênese (Boesiger et al., 1998; Artuc et al., 1999; Szukiewicz et al., 2005). Sendo assim, o papel do VEGF em mastocitomas não está muito bem esclarecido.

No presente estudo foi observado que apenas 14,3% dos pacientes expressaram VEGF em tumor e metástase, com concordância leve. Houve uma correlação fraca com o tamanho tumoral. No entanto, não houve diferença de sobrevida entre positivos em tumor primário e metástase e os negativos. Resultados similares foram descritos na literatura, onde em um estudo realizado por Rebuzzi et al (2007), observaram que mastocitomas caninos, de diferentes graduações, expressão VEGF e receptores, no entanto a intensidade de coloração e a porcentagem de células positivas variaram entre os pacientes. Sendo assim, consideraram que o MCT não utiliza esse fator como um regulador de crescimento autócrino. Amorim et al. (2009) relataram que não houve diferença na proporção ou intensidade da imunomarcação desse receptor entre as graduações do tumor, sugerindo que o VEGF não seria um biomarcador para malignidade isoladamente.

Em contrapartida, em um estudo recente conduzido por Melo et al. (2021) foi evidenciado que a expressão forte e moderada do fator de crescimento endotelial pode ser um fator de prognóstico negativo, uma vez que a coloração intensa de VEGF

foi significativamente associada à diminuição da sobrevida ($P= 0,025$), no entanto, não foi evidenciado correlação entre a expressão do fator com a formação de metástase ou comprometimento das margens cirúrgicas. Até o presente momento nenhum estudo da expressão de VEGF em linfonodos regionais havia sido realizado, porém, nenhum deles evidenciou correlação entre a expressão de VEGF e formação de metástase, corroborando para o resultado encontrado no presente trabalho.

Sendo assim, o uso de VEGF como um marcador de prognóstico de forma isolada ainda não está bem esclarecido, sendo necessário mais estudos a respeito. No entanto, pode se tornar um alvo terapêutico na tentativa de controle do crescimento tumoral e suas metástases. Na Medicina humana, agentes antiangiogênicos vem sendo utilizados no tratamento de diferentes tipos de câncer, sendo baseada principalmente na inibição das vias de sinalização pró-angiogênicas tumorais, com destaque para a via VEGF/VEGFR (Ferrara e Kelber, 2005). Os medicamentos bevacizumab (Avastin®), sunitinib (Sutent®, SU11248) e sorafenib (Nexavar®, BAY 43-9006) foram desenvolvidos para ações antiangiogênicas, todos os três agentes inibem a sinalização de VEGF bloqueando a função do ligante de VEGF ou de seu receptor (Kamba e McDonald, 2007). Na medicina veterinária, a quimioterapia metronômica e o toceranib são apontados como ação antiangiogênica. Uma vez que o uso da quimioterapia na modalidade metronômica pode aumentar a produção e liberação de inibidores da angiogênese. Múltiplos fatores antiangiogênicos endógenos foram identificados, sendo um deles, em particular, a trombospondina-1, que induz a apoptose das células endoteliais. A ciclofosfamida em dose baixa regula positivamente a trombospondina-1, com conseqüente apoptose das células endoteliais e a supressão do crescimento tumoral (Bampi, 2014; Polton, 2014). Já o toceranib, foi inicialmente desenvolvido como um composto anti-angiogênico devido à inibição do VEGFR e do PDGFR β , além de apresentar o anti-tumoral direta, uma vez que é responsável por inibir o KIT (London, 2014).

Dentre as limitações desse estudo destacam-se a natureza retrospectiva e reduzido número de casos. Novos estudos, com maior número de casos e avaliação de outros fatores angiogênicos e da densidade microvascular podem adicionar informações a esse tópico.

6. CONCLUSÃO

A análise imuno-histoquímica do VEGF nos mastocitomas caninos pode ser facilmente realizada, no entanto, não é empregada rotineiramente devido ao seu papel não estar muito bem elucidado. O estudo realizado não evidenciou correlação entre a expressão de VEGF em tumor primário e metástase em linfonodo regional na sobrevivência dos pacientes, sendo assim, a análise da expressão desse fator parece não contribuir para o prognóstico dos pacientes. No entanto mais estudos acerca do assunto são necessários, com um maior número de amostragem. Porém, a avaliação da expressão deste marcador pode contribuir na abordagem terapêutica do paciente.

7. REFERÊNCIAS

Abbas A.K., Lichtman A. H., Pober J.S. **Cellular and molecular immunology**. 4th edition. Philadelphia: WB Saunders; 2015. p. 23-33

Al-Sarraf R., Mauldin G.N., Patnaik A.K., Meleo K.A. (1996). **A Prospective Study of Radiation Therapy for the Treatment of Grade 2 Mast Cell Tumors in 32 Dogs**. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 10(6):376–378.

Amorim R.L., Pinczowski P., Neto R.T., Rahal S.C. (2010). **Immunohistochemical Evaluation of Prostaglandin E2 and Vascular Endothelial Growth Factor in Canine Cutaneous Mast Cell Tumours**. *Veterinary and Comparative Oncology*, 8 (1):23–27.

Arbiser J.L., Moses M.A., Fernandez C.A., Ghiso N., Cao Y., Klauber N., Frank D., Browlee M., Flynn E., Parangi S., Byers H.R., Siemeister J. (1997). **Oncogenic H-ras stimulates tumor angiogenesis by two distinct pathways**. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(3): 861–866.

Artuc M., Hermes B., Stckelings U.M., Grützkau A., Henz B.M. (1999). **Mast cells and their mediators in cutaneous wound healing - active participants or innocent bystanders?** *Experimental Dermatology*, 8(1):1–16.

Austen K. F., Joshua A.B. (2000) **Mast cell line age development and phenotypic regulation**, *Leukemia Research*, 25:511-518.

Baker-Gabby M, Hunt G, France M., (2003). **Soft tissue sarcomas and mast cell tumours in dogs; clinical behaviour and response to surgery**. *Australian Veterinary Journal*, 81(12):732–738.

Bergers G., Brekken R., McMahon G., Vu T. H., Itoh T., Tamaki K., Tanzawa K., Thorpe P., Itohara S., Werb Z., Hanahan D. (2000). **Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis**. *Nature Cell Biology*, 2 (10):737–744.

Blackwood L., Murphy S., Buracco P., De Vos J. P., De Fornel -Thibaud P., Hirschberger J., Kessler M., Pastor J., Ponce F., Savary-Bataille K., Argyle D.J., (2012). **European consensus document on mast cell tumours in dogs and cats**, *Vet. Comp. Oncology*, 10 (3):1-29.

Boesiger J., Tsai M., Maurer M., Yamaguchi M., Brown L.F., Claffey K.P., Dvorak H.F., Galli, S.J. (1998) **Mast Cells Can Secrete Vascular Permeability Factor/ Vascular Endothelial Cell Growth Factor and Exhibit Enhanced Release after Immunoglobulin E- dependent Up regulation of Fcε Receptor I Expression**. *The Journal of Experimental Medicine*, 188(6):1135–1145.

Bostock D.E.(1973). **The prognosis following surgical removal of mast ocytomas in dogs**. *Journal of Small Animal Practice*14(1): 27-40.

Bostock D.E. (1986). **Neoplasm soft tissue and subcutaneous tissues in dogs and cats**. *British Veterinary Journal*142:1–19.

Bostock D. E., Crocker J., Harris K., Smith P. (1989). **Nucleolar organiser regions as indicator of post-surgical prognosis in canine spontaneous mast cell tumours**. *British Journal of Cancer*, 59(6):915–918.

Brooks B.A.W., Neyens I.J.S., Teske E., Kirpensteijn, J. (2008). **Hypotonic Water as Adjuvant Therapy for Incompletely Resected Canine Mast Cell Tumors: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study**. *Veterinary Surgery*, 37(5):472–478.

Cahalane A. K., Payne S., Barber L.G., Duda L.E., Henry C.J., Mauldin G.E., Frimberger A. E., Cotter S.M., Moore A.S. (2004) **Prognostic factors for survival of dogs with inguinal and perineal mast cell tumor treated surgically with or without adjunctive treatment: 68 cases (1994-2002)**, Journal of the American Veterinary Medical Association, 225(3):401–408.

Chaffin K., Thrall D. E. (2002). **Results of radiation therapy in 19 dogs with cutaneous mast cell tumor and regional lymph node metastasis**. Veterinary Radiology Ultrasound, 43(4):392–395.

Cohen, J. (1960). **A Coefficient of Agreement for Nominal Scales**. Educational and Psychological Measurement, 20(1), 37–46.

Cooper M, Tsai X, Bennett P (2009). **Combination CCNU and vinblastine chemotherapy for canine mast cell tumours: 57 cases**. Veterinary and Comparative Oncology, 7(3):196–206.

Dobson J., Cohen S., Gould S. (2004). **Treatment of canine mast cell tumours with prednisolone and radiotherapy**. Veterinary and Comparative Oncology, 2(3):132–141.

Dobson J., Scase T. J. (2007). **Advances in the diagnosis and management of cutaneous mast cell tumours in dogs**. Journal of Small Animal Practice, 48(8):424–431.

Elston L. B., Sueiro F. A. R., Cavalcanti J. N., Metze K. (2009). **Letter to the Editor: The Importance of the Mitotic Index as a Prognostic Factor for Survival of Canine Cutaneous Mast Cell Tumors: A Validation Study**. Veterinary Pathology, 46(2):362–364.

Endicott M. M., Charney S. C., McKnight J. A., Loar A. S., Barger A. M., Bergman P. J. (2007). **Clinico pathological findings and results of bone marrow aspiration in dogs with cutaneous mast cell tumours: 157 cases (1999-2002)**. Veterinary and Comparative Oncology, 5(1):31–37.

European Medicines Agency (2009). **European Public Assessment Report (Epar) Masivet. Acessado em 05 de dezembro 2021.** Disponível em: <https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/masivet-epar-summary-public_en.pdf>.

Ferrara N, Davis-Smyth T (1997). **The Biology of Vascular Endothelial Growth Factor.** Endocrine Reviews, 18(1): 4–25.

Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J (2003). **The biology of VEGF and its receptors.** Nat. Med. 9:669–676.

Finora K., Leibman N. F., Fettman M. J., Powers B. E., Hackett T. A., Withrow S. J. (2006). **Cytological comparison of fine-needle aspirates of liver and spleen of normal dogs and of dogs with cutaneous mastcell tumours and an ultrasonographically normal appearing liver and spleen.** Veterinary and Comparative Oncology, 4(3):178–183.

Folkman J (2002) **Role of Angiogenesis in Tumor Growth and Metastasis,** Seminars in Oncology, 29(6):15-18.

Fulcher R. P., Ludwig L. L., Bergman P. J., Newman S. J., Simpson A. M., Patnaik A. K. (2006). **Evaluation of a two-centimeter lateral surgical margin for excision of grade I and grade II cutaneous mastcell tumors in dogs.** Journal of the American Veterinary Medical Association, 228(2):210–215.

Galli S. J., Zsebo K. M., Geissler E. N. (1994). **The kit Ligand, Stem Cell Factor.** Advances in Immunology Volume 55:1–96.

Gerber H. P., Ferrara N., (2002). **The role of VEGF in normal and neoplastic hematopoiesis.** Journal of Molecular Medicine, 81(1):20–31.

Gerritsen RJ, Teske E, KrausJS,Rutteman GR (1998). **Multi-agent chemotherapy for mast cell tumours in the dog.** Veterinary Quarterly, 20(1):28–31.

Giantin M., Aresu L., Benali S., Arico A. ,Morello E. M., Martano M., Vascellari M., Castagnaro M. ,Lopparelli R. M., Zancanella V., Granato A., Mutinelli F., Dacasto M. (2012). **Expression of Matrix Metalloproteinases, Tissue Inhibitors of**

Metalloproteinases and Vascular Endothelial Growth Factor in Canine Mast Cell Tumours. *J. Comp. Path*, 147:419-429.

Gieger T. , Northrup N., Wall M. (2005). **Clinical management of mastcelltumors in dogs.** *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian*, 27:56-68.

Giles F. J. (2001), The Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Signaling Pathway: **A Therapeutic Target in Patients with Hematologic Malignancies.** *The Oncologist*, 6(90005):32–39.

Ginn P. E., Fox L. E., Brower J. C., Gaskin A., Kurzman I. D., Kubilis O. S. (2000). **Immuno histochemical Detection of p.53 Tumor-Suppressor Protein is a Poor Indicator of Prognosis for Canine Cutaneous Mast Cell Tumors,** *Vet Pathol*, 37:33–39.

Gross T. L., Ihrke P., Walder E. J., Affolter V. K. **Mastcell tumors.** *Skin Diseases of the Dog and Cat Clinical and Histopathologic Diagnosis*, 2nd edn. Oxford, U. K.: Blackwell Science Ltd, 853–65.

Govier SM (2003) **Principles of treatment for mast cell tumors.** *Clinical Techniques in Small Animal Practice*, 18(2):103–106.

Guang-Wu H., Sunagawa M., Jie-En L., Shimada S., Gang Z., Tokeshi Y., Kosugi, T. (2000). **The Relationship Between Microvessel Density, the Expression of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), and the Extension of Nasopharyngeal Carcinoma.** *The Laryngoscope*, 110(12):2066–2069.

Hahn K. A., Oglivie G., Rusk T., Devauchelle P., Leblanc A., Legendre A., Powers B., Leventhal P. S., Kinet J. P., Palmerini F., Dubreuil P. , Moussy A. , Hermine O., (2008). **Masitinibis Safe and Effective for the Treatment of Canine Mast Cell Tumors.** *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 22(6):1301–1309.

Hahn K. A., Legendre A. M., Shaw N. G., Phillips B., Ogilvie G. K., Prescott D. M., Atwater S. W., Carreras J. K., Lana S. E., Ladue T., Rusk A., Kinet J. P., Dubreuil P., Moussy A., Hermine O., (2010). **Evaluation of 12- and 24-month survival rates after treatment with masitinib in dogs with non resectable mast cell tumors.** *American Journal of Veterinary Research*, 71(11):1354–1361.

Hyder S. M., (2002). **The Role of Steroid Hormones on the Regulation of Vascular Endothelial Growth Factor**. The American Journal of Pathology, 161(1):345–346.

Hottendorf G. H., Nielsen S. W., (1967). **Pathologic Survey of 300 Extirpated Canine Mastocytomas**. Zentralblatt Für Veterinär Medizin Reihe A., 14(3): 272–281.

Howard E. B., Sawa T.R., Nielsen S. W., Kenyon A. J., (1969). **Mastocytoma and Gastroduodenal Ulceration: Gastric and Duodenal Ulcers in Dogs with Mastocytoma**. Pathologia Veterinaria, 6(2):146–158.

Hu W., Feng Z., Levine A. J., (2012). **The Regulation of Multiple p53 Stress Responses is Mediated through MDM2**. Genes & Cancer, 3(3-4):199–208.

Huang E., Nocka K., Beier D. R., Chu T. Y., Buck J., Lahm H. W., Weliner D., Leder P., Besmer P., (1990). **The hematopoietic growth factor KL is encoded by the Sl locus and is the ligand of the c-kit receptor, the gene product of the W locus**. Cell, 63(1): 225–33.

Iamaroon A., Pongsiriwet S., Jittidecharaks S., Pattanaporn K., Prapayasadok S., Wanachantararak S., (2003). **Increase of mast cells and tumor angiogenesis in oral squamous cell carcinoma**. Journal of Oral Pathology & Medicine, 32(4):195–199.

Jaffe M. H., Hosgood G., Taylor H. W., Kerwin S. C., Hedlund C. S., Lopez M. K., Davidson J. R., Millerdm, Paranjpe M., (2000). **Immunohistochemical and Clinical Evaluation of p53 in Canine Cutaneous Mast Cell Tumors**, Vet Pathol 37:40–46.

Johnson T. O., Schulman F. Y., Lipscomb T. P., Yantis L. D., (2002). **Histopathology and Biologic Behavior of Pleomorphic Cutaneous Mast Cell Tumors in Fifteen Cats**. Veterinary Pathology, 39(4):452–457.

Iwata N., Ochiai K., Kadosawa T., Takiguchi M., Umemura T., (2000). **Canine Extracutaneous Mast-cell Tumours Consisting of Connective Tissue Mast Cells**. Journal of Comparative Pathology, 123(4):306–310.

Kaipainen A., Korhonen J., Mustonen, T., van Hinsbergh V. W., Fang G. H., Dumont D., Breitman M., Alitalo K., (1995). **Expression of the fms-like tyrosinekinase 4gene becomes restricted to lymphatic endothelium during development.** Proceedings of the National Academy of Sciences, 92(8):3566–3570.

Kiupel M., Webster J. D., Kaneene J. B., Miller R., Yuzbasiyan-Gurkan V., (2004). **The use of KIT and tryptase expression patterns as prognostic tools for canine cutaneous mast cell tumors.** Veterinary Pathology, 41 (4):371–377.

Kiupel M., Webster J. D., Miller R. A., Kaneene J. B., (2005). **Impact of Tumour Depth, Tumour Location and Multiple Synchronous Masses on the Prognosis of Canine Cutaneous Mast Cell Tumours.** Journal of Veterinary Medicine Series A, 52(6): 280–286.

Kiupel M., Webster J.D., Bailey K. L., Besty S., DeLay J., Detrisac C. J., Fitzgerald S. D., Gamble D., Ginn P. E., Goldschmidt M. H., Hendrick M. J., HowerthEW, JanovitzEB, Langohr I, Lenz S. D., Lipscomb T. P., Miller M. A., Misdorpy W., Moroff S., Mullaney T. P., Neyens I., O'Toole D., Ramos-Vara J., Scase T. J., Schulman F.Y., Sledge D., Smedley R. C., Smith K., Snyder P. W., Southorn E., Stedman N. L., Steficek B. A. , Stromberg P. C., Valli VE, Weisbrode SE, Yager J , Heller J., Miller R., (2011). **Proposal of a 2-Tier Histologic Grading System for Canine Cutaneous Mast Cell Tumors to More Accurately Predict Biological Behavior.** Veterinary Pathology, 48(1):147-155.

Krick E. L., Billings A. P., Shofer F. S., Watanabe S., Sorenmo K. U., (2009). **Cytologically mph node evaluation in dogs with mast celltumours: association with grade and survival*.** Veterinary and Comparative Oncology, 7(2):130–138.

Kondo K., Muramatsu M., Okamoto Y., Jin D., Takai S., Tanigawa N., Miyazaki M. (2005). **Expression of chymase-positive cells in gastric cancer and its correlation with the angiogenesis.** Journal of Surgical Oncology, 93(1):36–42.

Ladue T., Price G. S., Dodge R., Page RL, Thrall D. E., (1998). **Radiationtherapy for incompletely resected canine mast cell tumors.** Veterinary Radiology Ultrasound, 39(1):57–62.

Laughner E., Taghavi P., Chiles K., Mahon P. C., Semenza G. L., (2001). **HER2 (neu) Signaling Increases the Rate of Hypoxia-Inducible Factor 1 (HIF-1) Synthesis: Novel Mechanism for HIF-1-Mediated Vascular Endothelial Growth Factor Expression.** *Molecular and Cellular Biology*, 21(12): 3995–4004.

Letard S., Yang Y., Hanssens K., Palmerini F., Leventhal P. S., Guery S, Moussy A., Kinet J. P., Hermine O., Dubreuil P., (2008). **Gain-of-Function Mutations in the Extracellular Domain of KIT Are Common in Canine Mast Cell Tumors.** *Molecular Cancer Research*, 6(7):1137–1145.

Levine R. A., Fleischli M. A., (2000). **Inactivation of p53 and Retinoblastoma Family Pathways in Canine Osteosarcoma Cell Lines.** *Veterinary Pathology*, 37(1):54–61.

Linnekin D., DeBerry C. S., Mou S., (1997). **Lyn associates with the Juxta membrane region of c-Kit and is activated by stem cell factor in hematopoietic cell lines and normal progenitor cells.** *Journal of Biological Chemistry* 272(5): 27450-27455.

London C. A., Kisseberth W. C., Galli S. J., Geissler E. M., Helfand S. C., (1996). **Expression of stem cell factor receptor (c-kit) by the malignant mast cells from spontaneous canine mast cell tumours.** *Journal of Comparative Pathology*, 115(4):399–414.

London A. C., Seguin B., (2003). **Mast cell tumors in the dog,** *Vet Clin Small Anim*, 33:473–489.

London C. A., Malpas P. B., Wood-Follis S. L., Boucher J. F., Rusk A. W., Rosenberg M. P., Henry C. J., Mitchener K. L., Klein A. W., Hintermeister J. G., Bergman P. J., Couto G. C., Mauldin G. N., Michels G. M., (2009). **Multi-center, Placebo-controlled, Double-blind, Randomized Study of Oral Toleranib Phosphate (SU11654), a Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor, for the Treatment of Dogs with Recurrent (Either Local or Distant) Mast Cell Tumor Following Surgical Excision.** *Clinical Cancer Research*, 15(11):3856–3865.

London A. C., Thamm D. H., (2020). **Mast Cell Tumors.** In: **Withrow & MacEwen's Small Animal Clinical Oncology**, Vail D. M., Thamm D. H., Liptak J. M., (autors), St Louis, M. O., Saunders Elsevier, 6^o edith, 382–403.

Longley B. J., Tyrrell L., Lu S. Z., Ma Y. S., Langley K., Ding T., Duffy T., Jacobs P., Tang L. H., Modlin I., (1996). **Somatic c-KIT activating mutation in urticaria pigmentosa and aggressive mastocytosis: establishment of clonality in a human mast cell neoplasm.** *Nature Genetics*, 12(3):312–314.

Longley B. J., Reguera M. J., Ma Y. (2001). **Classes of c-KIT activating mutations: proposed mechanisms of action and implications for disease classification and therapy.** *Leukemia Research*, 25(7):571–576.

Ma Y., Longley B. J., Wang X., Blount J. L., Langley K., Caughey G. H., (1999). **Clustering of activating mutations in c-KIT's juxtamembrane coding region in canine mast cell neoplasms.** *Journal of Investigative Dermatology* 112(2):165–70.

Macy D. W., (1985). **Canine Mast Cell Tumors.** *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 15(4):783–803.

Manfredi J. J., (2010). **The Mdm2-p53 relationship evolves: Mdm2 swings both ways as an oncogene and a tumor suppressor.** *Genes & Development*, 24(15):1580–1589.

Matsuda K., Sakaguchi K., Kobayashi S., Tominaga M., Hirayama K., Kadosawa T., Taniyama H., (2009). **Systemic Candidiasis and Mesenteric Mast Cell Tumor with Multiple Metastases in a Dog.** *Journal of Veterinary Medical Science*, 71(2):229–232.

McCaw D. L., Miller M. A., Ogilvie G. K., Withrow S. J., Brewer W. G., Klein M. K., Bell F. W., Anderson S. K., (1994). **Response of Canine Mast Cell Tumors to Treatment With Oral Prednisone.** *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 8(6):406–408.

McHUGH, M. L., (2012). **Interrater reliability: the kappa statistic.** *Biochemia medica: Biochemia medica*, 22(3), 276-282.

McMahon G., (2000). **VEGF Receptor Signaling in Tumor Angiogenesis.** *The Oncologist*, 5(90001):3–10.

McNeil E. A., Prink A. L., O'Brien T. D., (2006). **Evaluation of risk and clinical outcome of mast cell tumours in pug dogs**, Journal of Veterinary and Comparative Oncology, 4: 2–8.

Melo S. R., Januário E. V., Zanuto E., Miranda B. C., Macedo T. R., Cogliati B., Matera J. M., (2020). **Immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor as a prognostic marker for canine mast cell tumors**. Topics in Companion Animal Medicine, 100506.

Misdorp W., (2004). **Mast cells and canine mast cell tumours. A review**. Veterinary Quarterly, 26(4):156-169.

Morini M., Bettini G., Preziosi R., Mandrioli L., (2004). **C-kit gene product (CD117) immunoreactivity in canine and feline paraffin sections**. Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 52(2): 705–708.

Mullins M. N., Dernell W. S., Withrow S. J., Ehrhart E. J., Thamm D. H., Lana S. E., (2006). **Evaluation of prognostic factors associated with outcome in dogs with multiple cutaneous mast cell tumors treated with surgery with and without adjuvant treatment: 54 cases (1998–2004)**. Journal of the American Veterinary Medical Association, 228(1):91–95.

Nagata H., Worobec A. S., Oh C. K., Chowdhury B. A., Tannenbaum S., Suzuki Y., Metcalfe D. D., (1995). **Identification of a point mutation in the catalytic domain of the protooncogene c-kit in peripheral blood mononuclear cells of patients who have mastocytosis with an associated hematologic disorder**. Proceedings of the National Academy of Sciences, 92(23):10560–10564.

Nasir L., Burr P. D., McFarlane S. T., Gault E., Thompson H., Argyle D. J., (2000). **Cloning, sequence analysis and expression of the cDNA encoding the canine and equine homologues of the mouse double minute 2 (*mdm2*) proto-oncogene**. Cancer Letters, 152(1):9–13.

Newman S. J., Mrkonjich L., Walker K. K., Rohrbach B. W. (2007). **Canine Subcutaneous Mast Cell Tumour: Diagnosis and Prognosis**. Journal of Comparative Pathology, 136(4):231–239.

O'Brate A., Giannakakou P., (2003). **The importance of p53 location: nuclear or cytoplasmic zip code**. Drug Resistance Updates, 6(6):313–322.

Okada F., Rak J. W., Croix B. S., Lieubeau B., Kaya M., Roncari L., Shirasawa S., Sasakuni T., Kerbel R. S., (1998). **Impact of oncogenes in tumor angiogenesis: Mutant K-rasup-regulation of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor is necessary, but not sufficient for tumorigenicity of human colorectal carcinoma cells.** Proceedings of the National Academy of Sciences, 95(7):3609–3614.

O'Keefe D. A., (1990). **Canine mast cell tumors**, Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice, 20(4):1105–1015.

Ordeix L., Fondevila D., Mora F., Fondati A., Ferrer L., (2001). **Assessment of proliferative activity of canine dermal mast cells by bromodeoxyuridine and proliferating cell nuclear antigen labelling**, Veterinary Dermatology , 12: 321–325.

Patnaik A. K., Ehler W. J., MacEwen E. G., (1984). **Canine cutaneous mast cell tumor: morphologic grading and survival time in 83 dogs.** Veterinary Pathology, 21:469–474.

Plate K. H., Breier G., Weich H. A., Risau W., (1992). **Vascular endothelial growth factor is a potential tumour angiogenesis factor in human gliomas in vivo.** Nature, 359 (6398):845–848.

Pryer N. K., Lee L. B., Zadovaskaya R., Yu X., Sukbuntherg J., Cherrington J. M., London C. A., (2003). **Proof of target for SU11654. Inhibition of KIT phosphorylation in canine mast cell tumors.** Clinical Cancer Research, 9: 5729–5734.

Quinn C. M., Wright N. A., (1990). **The clinical assessment of proliferation and growth in human tumours: Evaluation of methods and applications as prognostic variables.** The Journal of Pathology, 160(2):93–102.

Rassnick K. M., Moore A. S., Williams L. E., London C. A., Kintzer P. P., Engler, Cotter S. M., (1999). **Treatment of canine mast cell tumors with CCNU (*lomustine*),** Journal of Veterinary Internal Medicine, 13(6):601-605.

Rassnick K. M., Al-Sarraf R., Bailey D. B., Chretien J. D., Phillips B., Zwhalen C. H., (2010). **Phase II open-label study of single-agent hydroxyurea for treatment of mast cell tumours in dogs***. Veterinary and Comparative Oncology, 8(2), 103–111.

Rassnick K. M., Bailey D. B., Russell D. S., Flory A. B., Kiselow M. A., Intile J. L., Malone E. K., Balkman C. E., Barnard, S. M., (2010) **A phase II study to evaluate the toxicity and efficacy of alternating CCNU and high-dose vinblastine and prednisone (CVP) for treatment of dogs with high-grade, metastatic or non resectable mast cell tumours.** *Veterinary and Comparative Oncology*, 8(2):138–152.

Rebuzzi L., Willmann M., Sonneck K., Gleixner K. V., Florian S., Kondo R., Mayerhofer M., Vales A., Gruze A., Pickl W. F., Thalhammer J. G., Valent P., (2007), **Detection of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptors Flt-1 and KDR in canine mastocytoma cells,** *Veterinary Immunology and Immunopathology* 115:320–333.

Restucci B., Papparella S., Maiolino P., De Vico G., (2002). **Expression of Vascular Endothelial Growth Factor in Canine Mammary Tumors.** *Veterinary Pathology*, 39(4):488–493.

Risau W., (1997). **Mechanisms of angiogenesis.** *Nature*, 386(6626): 671–674.

Riva F., Brizzola S., Stefanello D., Crema S., Turin L., (2005). **A Study of Mutations in the c-kit Gene of 32 Dogs with Mastocytoma.** *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 17(4):385–388.

Rogers K. S., (1996). **Mast Cell Tumors.** *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 26(1):87–102.

Romansik E. M., Reilly C. M., Kass P. H., Moore P. F., London C. A., (2007). **Mitotic Index Is Predictive for Survival for Canine Cutaneous Mast Cell Tumors.** *Veterinary Pathology*, 44(3):335–341.

Rosen L. S., (2005). **VEGF-Targeted Therapy: Therapeutic Potential and Recent Advances.** *The Oncologist*, 10(6):382–391.

Rothwell T. L., Howlett C. R., Middleton D. J., Griffiths D. A., Duff B. C., (1987). **Skinneoplasms of dogs in Sydney,** *Australian Veterinary Journal*, 64(6):161–164.

Sabattini S., Scarpa F., Berlato D., Bettini G., (2014). **Histologic Grading of Canine Mast Cell Tumor**. *Veterinary Pathology*, 52(1):70–73.

Salcedo R., (2003). **Angiogenic effects of prostaglandin E2 are mediated by up-regulation of CXCR4 on human microvascular endothelial cells**. *Blood*, 102(6):1966–1977.

Scase J. T., Edwards D., Miller J., Henley W., Smith K., Blunden A., Murphy S. (2016). **Canine Mast Cell Tumors: Correlation of Apoptosis and Proliferation**, *J. Vet Intern Med*, 20:151–158.

Schultheiss P. C., Gardiner D. W., Rao S., Olea-Popelka F., Tuohy J. L., (2011). **Association of histologic tumor characteristics and size of surgical margins with clinical outcome after surgical removal of cutaneous mast cell tumors in dogs**. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 238(11):1464–1469.

Seguin B., Leibman N. F., Bregazzi V. S., Ogilvie G. K., Powers B. E., Dernel W. S., Fettman M. J., Withrow S. J. (2001). **Clinical outcome of dogs with grade-I mast cell tumors treated with surgery alone: 55 cases (1996-1999)**. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 218(7):1120–1123.

Seguin B., McDonald D. E., Kent M. S., Walsh P. J., Theon A. P. (2005) **Tolerance of Cutaneous or Mucosal Flaps Placed into a Radiation Therapy Field in Dogs**. *Veterinary Surgery*, 34(3):214–222.

Semenza G. L. (2000) **HIF-1: Using two hands to flip the angiogenic switch**, *Cancer and Metastasis Reviews* 19:59–65.

Serve H, Yee N. S., Stella G., Sepp-Lorenzino L., Tan J. C., Besmer, P. (1995) **Differential roles of PI3-kinase and Kit tyrosine 821 in Kit receptor-mediated proliferation, survival and cell adhesion in mast cells**. *The EMBO Journal*, 14(3):473-483.

Setoguchi A., Okuda M., Nishida E., Yazawa M., Ishizaka T., Hong S. H., Hisasue M., Nishimura R., Sasaki N., Yoshikawa Y., Masuda K., Ohno K., Tsujimoto H. (2001) **Results of hyperamplification of centrosomes in naturally developing tumors of dogs**. *American Journal of Veterinary Research*, 62(7):1134–1141.

Sherr C. J. (2006) **Divorcing A. R. F. and p53: an unsettled case.** Nature Reviews Cancer, 6(9): 663–673.

Simpson A. M., Ludwig L. L., Newman S. J., Bergman P. J., Hottinger H. A., Patnaik A. K. (2004) **Evaluation of surgical margins required for complete excision of cutaneous mast cell tumors in dogs.** Journal of the American Veterinary Medical Association, 224(2):236–240.

Simoës J. P. C., Schoning P., Butine M. (1994). **Prognosis of Canine Mast Cell Tumors: A Comparison of Three Methods.** Veterinary Pathology, 31(6):637–647.

Sledge D. G., Webster J., Kiupel M. (2016) **Canine cutaneous mast cell tumors: A combined clinical and pathologic approach to diagnosis, prognosis, and treatment selection.** The Veterinary Journal, 215:43–54.

Sfiligoi G., Rassnick K. M., Scarlett J. M., Northrup N. C., Gieger T. L. (2005). **Outcome of dogs with mast cell tumors in the inguinal or perineal region versus other cutaneous locations: 124 cases (1990-2001).** Journal of the American Veterinary Medical Association, 226(8):1368–1374.

Shinkaruk S., Bayle M., Lain G., Deleris G. (2003) **Vascular endothelial cell growth factor (VEGF), an emerging target for cancer chemotherapy.** Curr. Med. Chem. Anti-Cancer Agents, 3:95–117.

Siemeister G., Martiny-Baron G., Marme D. (1998) **The pivotal role of V. E. G. F. in tumor angiogenesis: molecular facts and therapeutic opportunities.** Cancer Metastasis Rev. 17:241–248.

Sledge D. G., Webster J., Kiupel M. (2016) **Canine cutaneous mast cell tumors: A combined clinical and pathologic approach to diagnosis, prognosis, and treatment selection.** The Veterinary Journal, 215:43–54.

Smith J., Kiupel M., Farrelly J., Cohen R., Olmsted G., Kirpensteijn J., Post G. (2015). **Recurrence rates and clinical outcome for dogs with grade II mast cell tumours with a low Ag N. O. R. count and Ki67 index treated with surgery alone.** Veterinary and Comparative Oncology, 15(1):36–45.

Stefanello D., Buracco P., Sabattini S., Finotello R., Giudice C., Grieco V., Iussich S., Tursi M., Scase T., Di Palma S., Bettini G., Ferrari R., Martano M., Gattino F., Marrington M., Mazzola M., Vasconi M. E., Annoni M., Marconato L. (2015) **Comparison of 2- and 3-category histologic grading systems for predicting the presence of metastasis at the time of initial evaluation in dogs with cutaneous mast cell tumors: 386 cases (2009–2014)**. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 246(7):765–769.

Strefezzi R. F., Xavier J. G., Catão-Dias J. L. (2003) **Morphometry of canine cutaneous mast cell tumors**. *Vet Pathol*, 40(3):268-75.

Takahashi T., Kadosawa T., Nagase M., Matsunaga S., Mochizuki M., Nishimura R., Sasaki N. (2000). **Visceral mast cell tumors in dogs: 10 cases (1982-1997)**. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 216(2):222–226.

Takeuchi Y., Fujino Y., Watanabe M., Takahashi M., Nakagawa T., Takeuchi A., Bonkobara M., Kobayashi T., Ohno K., Uchida K., Asano K., Nishimura R., Nakayama H., Sugano S., Ohashi Y., Tsujimoto H. (2013) **Validation of the prognostic value of histopathological grading and c-kit mutation in canine cutaneous mast cell tumours: A retrospective cohort study**. *The Veterinary Journal*, 196(3):492–498.

Taylor F., Gear R., Hoather T., Dobson J. (2009). **Chlorambucil and prednisolone chemotherapy for dogs with inoperable mast cell tumours: 21 cases**. *Journal of Small Animal Practice*, 50(6):284–289.

Thamm D. H., Mauldin E. A., Vail D. M. (1999) **Prednisone and Vinblastine Chemotherapy for Canine Mast Cell**, *J. Vet Intern Med*, 13:491–497.

Thamm D. H., Turek M. M., Vail D. M. (2006). **Out come and Prognostic Factors Following Adjuvant Prednisone/Vinblastine Chemotherapy for High-Risk Canine Mast Cell Tumour: 61 Cases**. *Journal of Veterinary Medical Science*, 68(6):581–587.

Thompson J. J., Pearl D. L., Yager J. A., Best S. J., Coomber B. L., Foster R. A. (2010) **Canine Subcutaneous Mast Cell Tumor**. *Veterinary Pathology*, 48(1):156–168.

Tizzard I. R. (2009) **Como se activa la inflamación in: Veterinary Immunology**, Tizzard IR (autors) AnIntroduction, College Station, Texas. Elsevier 8: 11-27.

Tuna B., Yorukoglu K., Unlu M., Mungan U. M., Kirkali Z. (2006). **Association of Mast Cells with Microvessel Density in Renal Cell Carcinomas**. European Urology, 50(3):530–534.

Turin L., Acocella F., Stefanello D., Oseliero A., Fondrini D., Brizzola S., Riva F. (2006) **Expression of C-Kit Proto-Oncogene in Canine Mastocytoma: A Kinetic Study Using Real-Time Polymerase Chain Reaction**. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 18(4):343–349.

Vascellari M., Giantin M., Capello K., Carminato A., Morello E. M., Vercelli A., Granato A., Buracco P., Dacasto M., Mutinelli F. (2012). **Expression of Ki 67, BCL-2, and COX-2 in Canine Cutaneous Mast Cell Tumors**. Veterinary Pathology, 50(1):110–121.

Veikkola T., Alitalo K. (1999) **VEGFs, receptors and angiogenesis**. Seminars in Cancer Biology, 9:211-220.

Veikkola T., Karkkainen M., Claesson-Welsh L., Alitalo K. (2000) **Regulation of angiogenesis via vascular endothelial growth factor receptors**. Cancer Res. 60:203–212.

Weber J. D., Taylor L. J., Roussel M. F., Sherr C. J., Bar-Sagi D. (1999) **Nucleolar Arf sequesters Mdm 2 and activates p53**. Nature Cell Biology, 1(1):20–26.

Webster J. D., Yuzbasiyan-Gurkan V., Kaneene J. B., Miller R., Resau J. H., Kiupel M. (2006) **The role of c-KIT in tumorigenesis: evaluation in canine cutaneous mast cell tumors**. Neoplasia, 8(2):104–11.

Webster J. D., Yuzbasiyan-Gurkan V., Miller R. A., Kaneene J. B., Kiupel M. (2007) **Cellular proliferation in canine cutaneous mast cell tumors: associations with c-KIT and its role in prognostication**. Veterinary Pathology, 44: 298–308.

Webster J. D., Yuzbasiyan-Gurkan V., Thamm D. H., Hamilton E., Kiupel M. (2008) **Evaluation of prognostic markers for canine mast cell tumors treated with vinblastine and prednisone.** B. M. C. Veterinary Research, 4(1):32.

Welle M. M., Bley C. R., Howard J., Rüfenacht S. (2008). **Canine mast cell tumours: a review of the pathogenesis, clinical features, pathology and treatment.** Vet. Dermatol. 19(6):321-339.

Wergin M. C., Werginkaser-Hotz (2004). **Plasma Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Measured in Seventy Dogs with Spontaneously Occurring Tumours.** in vivo 18:15-20.

Wu H., Hayashi T., Inoue M. (2006). **Immunohistochemical Expression of Mdm 2 and p53 in Canine Cutaneous Mast Cell Tumours.** Journal of Veterinary Medicine Series A, 53 (2): 65–68.

Zhang Y., Xiong Y. (1999) **Mutations in Human A. R. F. Exon 2 Disrupt Its Nucleolar Localization and Impair Its Ability to Block Nuclear Export of MDM2 and p53.** Molecular Cell, 3(5):579–591.

Zemke D, Yamini B., Yuzbasiyan-Gurkan V. (2002). **Mutations in the Juxtamembrane Domain of *c-KIT*. Are Associated with Higher Grade Mast Cell Tumors in Dogs.** Veterinary Pathology, 39(5):529–535.

Zsebo K. M., Williams D. A., Geissler E. M., Broudy V. C., Martin F. H., Atkins H.L., Hsu R. Y., Birkett N. C., Okino K. H., Murdock D. C., Jacobsen F. W., Langley K. E., Smith K. A., Takeish T., Cattanch B. M., Galli S. J., Suggs S. V. (1990) **Stem cell factor is encoded at the *Sl locus* of the mouse and is the ligand for the *c-kit* tyrosine kinase receptor,** Cell, 63(1):213–224.

8. ANEXO 1

Tabela 10 – Correlação de valor de P com valores de R nos critérios de avaliação quanto a graduação, metástase em linfonodo, localização do tumor, presença de necrose, número de figuras de mitose, óbito, quimioterapia, recidiva, sexo, síndrome paraneoplásica, sobrevida, raça e expressão de VEGF no tumor primário e linfonodo

Graduação de Kiupel		
	P < 0,05	Correlação R
Superfície	0,01164758	Moderada
Necrose	0,004486374	Moderada
Ulceração	0,004486374	Moderada
Graduação de Patnaik	0,001900071	Moderada
Nº de figuras de mitose	0,00011033	Moderada
Linfonodo	0,00163998	Moderada
Sobrevida	0,03184484	Fraca
Óbito	0,004486374	Fraca
Síndrome Paraneoplásica	0,006634973	Fraca
Graduação de Patnaik		
Raça	0,01934266	Moderada
Necrose	0,000299797	Moderada
Ulceração	0,0190089	Moderada
Graduação de Kiupel	0,001900071	Moderada
Quimioterapia	0,03038825	Moderada
Síndrome Paraneoplásica	0,01965411	Fraca
Linfonodo		
Necrose	0,007576227	Moderada
Ulceração	0,007576227	Moderada
Nº de figuras de mitose	0,003686812	Moderada

Localização do Tumor		
Tamanho (cm)	0,01052332	Fraca
Sobrevida	0,00566129	Fraca
Necrose		
Raça	0,00548377	Moderada
Sexo	0,0413462	Moderada
Nº de Figuras de Mitose	0,01002838	Moderada
Sobrevida	0,02517251	Fraca
Número de Figuras de Mitose		
Superfície	0,01405473	Moderada
Ulceração	0,006314463	Moderada
Quimioterapia	0,03644184	Moderada
Óbito	0,04732179	Fraca
Síndrome Paraneoplásica	0,04817627	Fraca
Óbito		
Recidiva	0,002552959	Moderada
Sobrevida	0,03148585	Moderada
Síndrome Paraneoplásica	0,03148585	Moderada
Quimioterapia		
Raça	0,000392143	Moderado
Tamanho (cm)	0,01271247	Fraca
Sobrevida	0,01740349	Fraca
Recidiva		
Síndrome Paraneoplásica	0,01868152	Moderada
Sexo		
Ulceração	0,0413462	Moderado
Sobrevida	0,02891185	Fraca
Síndrome Paraneoplásica		

Ulceração	0,003661097	Fraca
Sobrevida (Meses)		
Raça	0,03058264	Fraca
Localização do Tumor	0,00566129	Fraca
Raça		
Ulceração	0,03543602	Moderada
VEGF do Linfonodo		
Peso	0,005590627	Moderado
VEGF do Tumor		
Sexo	0,006740896	Fraca
Localização do Tumor	0,03427512	Fraca
Tamanho (cm)	0,01600874	Moderado
Margem cirúrgica	0,08302736	Fraco