



**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
ESCOLA DE CIÊNCIAS DA VIDA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

CHIARA MARIA THIESEN DOMINGUES ARAÚJO

**CORRELAÇÃO ENTRE DIFERENTES GRADUAÇÕES DE MASTOCITOMA CANINO E NÚMERO
DE EOSINÓFILOS, EXPRESSÃO DE INTERLEUCINA-5, RECEPTOR DE FATOR DE
CRESCIMENTO ENDOTELIAL VASCULAR E PADRÕES DE KIT**
(Correlation between different grades of dog mast cell tumor and number of
eosinophils, expression of interleukin-5, vascular endothelial growth factor and KIT
patterns)

**CURITIBA
2021**

CHIARA MARIA THIESEN DOMINGUES ARAÚJO

**CORRELAÇÃO ENTRE DIFERENTES GRADUAÇÕES DE MASTOCITOMA CANINO COM
NÚMERO DE EOSINÓFILOS, EXPRESSÃO DE INTERLEUCINA-5, RECEPTOR DE FATOR DE
CRESCIMENTO ENDOTELIAL VASCULAR E PADRÕES DE KIT**

(Correlation between different grades of dog mast cell tumor and number of
eosinophils, expression of interleukin-5, vascular endothelial growth factor and KIT
patterns)

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, área de concentração Saúde, Tecnologia e Produção Animal, da Escola de Ciências da Vida da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, para obtenção do título de Doutor em Saúde, Tecnologia e Produção Animal Integrada.

Orientador: Prof. Dr. Gervásio Henrique Bechara

Coorientador: Prof. Dr. Jair Rodini Engracia Filho

**CURITIBA
2021**

Araújo, Chiara Maria Thiesen Domingues
A663c Correlação entre diferentes graduações de mastocitoma canino com
2021 número de eosinófilos, expressão de interleucina-5, receptor de fator de
crescimento endotelial vascular e padrões de kit = (Correlation between
different grades of dog mast cell tumor and number of eosinophils, expression
of interleukin-5, vascular endothelial growth factor and KIT patterns) / Chiara
Maria Thiesen Domingues Araújo ; orientador: Gervásio Henrique Bechara ;
coorientador: Jair Rodini Engracia Filho. – 2021.
46 f. : il. ; 30 cm

Tese (doutorado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba,
2021
Inclui bibliografia

1. Cães. 2. Citocinas. 3. Histopatologia. 4. Imuno-histoquímica.
5. Mastócitos. 6. Neoplasias. I. Bechara, Gervásio Henrique. II. Engracia Filho,
Jair Rodini. III. Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Pós-Graduação
em Ciência Animal. III. Título.

CDD 20. ed. – 636.089

Araújo, Chiara Maria Thiesen Domingues

Correlação entre diferentes graduações de mastocitoma canino e número de eosinófilos, expressão de interleucina-5, receptor de fator de crescimento endotelial e padrões de KIT. Curitiba, 2021. 56 p.

Tese – Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Programa de Pós-graduação em Ciência Animal.

1. Mastócitos 2. Cães 3. Eosinófilos 4. Imunohistoquímica 5. Neoplasia 6. IL-5

Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Escola de Ciências da Vida. Programa de Pós-graduação em Ciência Animal



ATA Nº 025 E PARECER FINAL DA DEFESA DE TESE DE DOUTORADO EM CIÊNCIA ANIMAL DA ALUNA CHIARA MARIA THIESEN DOMINGUES ARAUJO

Aos vinte e dois dias do mês de abril do ano de dois mil e vinte e um, às 14 horas, realizou-se a sessão pública de defesa da tese da doutoranda Chiara Maria Thiesen Domingues Araujo, intitulada: **"Correlação entre diferentes graduações de mastocitoma canino e número de eosinófilos, expressão de interleucina-5, receptor de fator de crescimento endotelial vascular e padrões de KIT"**. A doutoranda concluiu os créditos exigidos para obtenção do título de Doutora em Ciência Animal, Área de Concentração em Saúde, Tecnologia e Produção Animal, segundo os registros constantes na secretaria do Programa. Os trabalhos foram conduzidos pelo Professor Orientador e Presidente da banca, Dr. Gervasio Henrique Bechara (PUCPR), auxiliado pelos Professores Doutores Marconi Rodrigues de Farias (PUCPR), José Ademar Villanova Junior (PUCPR), Andrea Pires dos Santos (Purdue University) e Marcio de Barros Bandarra (UFU). Procedeu-se a exposição da tese, seguida de sua arguição pública e defesa. Encerrada a fase, os examinadores expediram o parecer final sobre a tese, que foi considerada APROVADA.

MEMBROS

Prof Dr Gervasio Henrique Bechara (Presidente)

Prof Dr Marconi Rodrigues de Farias (PUCPR)

Prof Dr José Ademar Villanova Junior (PUCPR)

Profa Dra Andrea Pires dos Santos (Purdue University)

Prof Dr Marcio de Barros Bandarra (UFU)

ASSINATURA

Proclamado o resultado, o Presidente da Banca Examinadora encerrou os trabalhos, e para que tudo conste, eu Caroline Nocera Bertton, confiro e assino a presente ata juntamente com os membros da Banca Examinadora.

Curitiba, 22 de abril de 2021.

Caroline Nocera Bertton
Secretária do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal

Profa. Dra. Renata Ernund Freitas de Macedo
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal

Dedicatória

Aos meus filhos, Francisco Domingues Araújo e Alice Domingues Araújo.

AGRADECIMENTOS

Começo agradecendo ao meu companheiro de vida, meu marido Bernardo de Paula Araújo, por sempre me apoiar e incentivar, por ser meu porto seguro para que eu possa ir atrás dos meus sonhos e objetivos sem medos e receios. Aos meus filhos, Francisco Domingues Araújo e Alice Domingues Araújo, que iniciaram suas vidas em meio a esta jornada; vocês foram os meus impulsionadores para seguir adiante. Que eu possa sempre ser exemplo e motivo de orgulho. Obrigada por estarem sempre comigo. Amo muito vocês.

Agradeço eternamente aos meus pais, Volney Domingues e Rosana Domingues, pela minha educação, pelas oportunidades que me proporcionaram e que me trouxeram até aqui. Para vocês não tenho palavras o suficiente. Espero que minhas atitudes e conquistas mostrem toda a minha gratidão e o quanto valeu a pena. À minha irmã querida, Isadora Domingues, muito obrigada por ter tanto orgulho de mim. Tu és o motivo de eu ter coragem em sair da zona de conforto e ir buscar sempre mais.

Ao meu orientador, Professor Dr. Gervásio Henrique Bechara, agradeço imensamente pela oportunidade e pelo privilégio. Obrigada por me dar a liberdade para trabalhar com aquilo que mais amo na medicina veterinária. O aprendizado que eu tive durante este período foi imensurável.

Ao meu coorientador, Professor Dr. Jair Rodini Engracia Filho, por me orientar desde meus primeiros passos no universo da pesquisa, abrindo novos caminhos e conhecimentos.

À toda a equipe do Laboratório de Patologia Experimental e de Histopatologia da CVE da PUCPR, por sempre me acolherem e por fazer acontecer este projeto junto comigo.

Agradeço a todos que de alguma forma colaboraram com a realização deste projeto; todos que cruzaram meu caminho durante esta jornada tiveram um papel fundamental para a minha formação e para que eu pudesse estar aqui hoje. Obrigada!

SUMÁRIO

	Página
Dedicatória	V
Agradecimentos	VI
Sumário	VII
Lista de Figuras	IX
Lista de Tabelas	X
Lista de Abreviaturas	XI
Formato da tese	XII
Resumo	XIII
Abstract	XV
Capítulo 1	1
1 – Introdução e Contextualização.....	1
1.1 Mastócitos.....	1
1.2 Mastocitoma canino (MC).....	2
1.3 Relação mastócitos x eosinófilos.....	7
Capítulo 2	11
1 – Correlação entre diferentes graduações de mastocitoma canino e número de eosinófilos, interleucina-5 e receptor de fator de crescimento endotelial vascular.....	11
1.1. Introdução.....	12
1.2. Material e métodos.....	13
1.3. Resultados.....	14
1.4 Discussão.....	16
1.5 Conclusão.....	17
1.6 Referências.....	17
Capítulo 3	20
1 – Correlação entre número de eosinófilos em amostras de mastocitoma canino e imunomarcacão do <i>c-kit</i>	20
1.1 Introdução.....	21
1.2 Métodos.....	22
1.3 Resultados.....	23

1.4 Discussão.....	24
1.5 Referências.....	26
Capítulo 4	
Conclusão/ Impacto e Perspectivas Futuras	28
Referências Bibliográficas	29
Anexos.....	34

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1	Graduações histológicas descritas por Patnaik et al. (1984).....	5
Figura 2.1	Representação da contagem de eosinófilos. (A) Amostra com as três áreas selecionadas. (B) Área delimitada para contagem de eosinófilos. Cada eosinófilo contado é marcado com um X....	13
Figura 2.2	(A) Amostra de mastocitoma canino com imunomarcção negativa para IL-5. Aumento de 400x. (B) Mastocitoma canino, apresentando mastócitos com intensa imunomarcção citoplasmática de IL-5. Aumento de 400x. (C) Amostra de mastocitoma canino com imunomarcção negativa para VEGFr. Aumento de 200x. (D) Mastocitoma canino, mastócitos apresentando imunoexpressão citoplasmática para VEGFr. Aumento de 200x.....	15
Figura 3.1	Padrões de imunomarcção de KIT em mastocitoma canino. (A) Padrão I, ou perimembranoso, apresentando apenas marcação em membrana celular. (B) Padrão II, citoplasmático focal. (C) Padrão III, citoplasmático difuso.....	24

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1	Comparação de médias das amostras entre as classificações histológicas de Patnaik et al. (1984) e Kiupel et al. (2011).....	16
Tabela 3.1	Comparação da média de contagem de eosinófilos das amostras entre as classificações histológicas de Patnaik et al. (1984), Kiupel et al. (2011), e padrões de KIT.....	24

LISTA DE ABREVIATURAS

Ag-NOR	<i>Regiões organizadoras nucleolares com afinidade por prata</i>
CGA	<i>Campo de grande aumento</i>
c-KIT	<i>Protoncogene c-KIT</i>
ECF-A	<i>Fator quimiotático de eosinófilos na anafilaxia</i>
EoPS	<i>Progenitores de eosinófilos</i>
FcεRI	<i>Receptor de IgE de alta afinidade</i>
FGF-2	<i>Fator de crescimento de fibroblastos</i>
GM-CSF	<i>Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos</i>
H-E	<i>Hematoxilina-eosina</i>
IL-3	<i>Interleucina-3</i>
IL-5	<i>Interleucina-5</i>
IL-8	<i>Interleucina-8</i>
IL-10	<i>Interleucina-10</i>
ILC2	<i>Células linfoides inatas do grupo 2</i>
Ki-67	<i>Proteína Ki-67</i>
KIT	<i>Proteína tirosina quinase</i>
KITr	<i>Receptor de proteína tirosina quinase</i>
MC	<i>Mastocitoma canino</i>
MMP	<i>Metaloproteinase de matriz</i>
MMP-2	<i>Metaloproteinase-2</i>
MMP-9	<i>Metaloproteinase-9</i>
NGF	<i>Fator de crescimento nervoso</i>
NK	<i>Natural killer</i>
NORs	<i>Regiões de organização nucleolar</i>
PAF	<i>Fator de ativação plaquetária</i>
PDGF	<i>Fator de crescimento derivado de plaquetas</i>
SCF	<i>Fator de células-tronco</i>
TMA	<i>Tissue Microarray</i>
TNF-α	<i>Fator de necrose tumoral alfa</i>
VEGF	<i>Fator de crescimento endotelial vascular</i>
VEGFr	<i>Receptor fator de crescimento endotelial vascular</i>

FORMATO DA TESE

A presente tese é composta por capítulos. O capítulo 1 apresenta uma introdução geral, a contextualização do tema e os objetivos de estudo. Os capítulos 2 e 3 tratam de artigos científicos completos, contendo referências, e formatados segundo as normas das revistas para as quais serão submetidos. O capítulo 4 finaliza esta tese com conclusões gerais e considerações finais e impacto e perspectivas do trabalho. As referências do capítulo 1 encontram-se ao final da tese.

RESUMO GERAL

A proliferação neoplásica de mastócitos, denominada mastocitoma, é a neoplasia cutânea mais comum em cães. O mastocitoma canino é altamente heterogêneo na apresentação clínica e no comportamento biológico, com um potencial variável de recorrência e metástase; assim, torna-se necessário identificar fatores prognósticos preditivos. É comum observar infiltração de eosinófilos na proximidade de mastócitos em tecidos inflamados alérgicos e em diversas doenças parasitárias bem como nos mastocitomas caninos. Mastócitos e eosinófilos participam de um complexo ciclo de autoperpetuação. Os eosinófilos produzem mediadores responsáveis pela diferenciação, ativação, proliferação e sobrevivência de mastócitos e estes quando ativados liberam mediadores, como IL-5, que favorecem o recrutamento e a ativação de eosinófilos. Apesar da grande casuística de mastocitoma canino, não existem relatos na literatura que correlacionem a sua graduação com número de eosinófilos e fatores que possam estar relacionados à sua quantidade no tecido tumoral. Foram utilizadas 48 amostras de mastocitoma de cães enviadas ao Laboratório de Histopatologia da Clínica Veterinária Escola da PUCPR. As lâminas obtidas das amostras foram coradas pelas técnicas de hematoxilina-eosina e May Grünwald-Giemsa, nas quais foram realizadas as graduações histológicas e contagem de eosinófilos. Para a avaliação imuno-histoquímica as amostras foram incubadas com os anticorpos anti IL-5, VEGFr e c-KIT. A porcentagem de área imunomarcada com IL-5 e VEGFr foi determinada, e as amostras incubadas com c-KIT foram classificadas de acordo com o padrão de imunomarcção. Das 48 amostras graduadas segundo Patnaik, 24 (50%) apresentaram grau I, 23 (47,9%) grau II e apenas uma amostra (2,1%) foi classificada como grau III, enquanto de acordo com Kiupel, 11 amostras (22,9%) foram classificadas como de alto grau, e 37 (77,15%) de baixo grau. Foi realizada uma comparação da média da contagem de eosinófilos das amostras entre as graduações histológicas e os diferentes padrões de KIT, a qual mostrou uma diferença significativa entre os padrões I e III de KIT, tendo o padrão III apresentado uma maior média de eosinófilos. Não foi observada correlação das graduações histológicas com IL-5 e VEGFr, por outro lado, demonstrou-se uma correlação positiva entre os padrões de c-KIT e as graduações de Patnaik e Kiupel ($p= 0,0006$ e

p= 0,0267, respectivamente). Não foi observada correlação significativa da contagem de eosinófilos com nenhum anticorpo avaliado. Mais estudos devem ser feitos afim de comparar estes resultados com a evolução clínica dos animais, procurando correlacionar estes dados com prognóstico clínico.

Palavras-chave: mastócitos, cães, histopatologia, imuno-histoquímica, neoplasia, citocinas

ABSTRACT

Mast cell tumor is a neoplastic proliferation of mast cells and is the most common skin cancer in dogs. Canine mast cell tumor is highly heterogeneous in clinical presentation and biological behavior with a variable potential for recurrence and metastasis, so it is necessary to identify predictive prognostic factors. It is notable that the infiltration of eosinophils is detected close to mast cells in inflamed allergic tissues and also in several parasitic diseases as well as mast cell tumors. Mast cells and eosinophils participate in a complex cycle of self-perpetuation. Eosinophils produce mediators responsible for the differentiation, activation, proliferation and survival of mast cells, these when activated release mediators, such as IL-5, that favor the recruitment and activation of eosinophils. Despite the large number of canine mast cell tumors, there are no reports in the literature that correlate their grade with number of eosinophils and factors that may be related to their quantity in the tumor tissue. Forty-eight samples of canine mast cell tumors were sent to the Histopathology Laboratory of the Clínica Veterinária Escola at PUCPR, Curitiba. The slides obtained from the samples were stained using the hematoxylin-eosin and May Grünwald-Giemsa techniques, in which histological grading and eosinophil count were performed. For immunohistochemical evaluation, samples were incubated with antibodies IL-5, VEGFr and c-KIT. The immunostained percentage area with IL-5 and VEGFr was determined, and samples incubated with c-KIT were classified according to the immunostaining pattern. Of the 48 graduated samples, 24 (50%) presented grade I, 23 (47.9%) grade II and only one sample (2.1%) was classified as grade III according to Patnaik's mast cell tumor patterns. On the other hand, 11 samples (22.9%) were classified as high grade, and 37 (77.15%) as low grade according to Kiupel's mast cell tumor classification. A comparison of the mean of eosinophil count in the samples between the histological grades and the different KIT patterns was also conducted, which showed a significant difference between KIT patterns I and III, in which pattern III had a higher mean of eosinophils. No correlation of histological grades with IL-5 and VEGFr was observed, c-KIT patterns demonstrated a positive correlation between the and the Patnaik and Kiupel grades ($p = 0.0006$ and $p = 0.0267$, respectively). There was no significant

correlation between eosinophil count with any antibody evaluated. Further studies should be done to compare these results with the clinical evolution of the animals, seeking to correlate these data with clinical prognosis.

Keywords: mast cells, dogs, histopathology, immunohistochemistry, neoplasia, cytokines

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO E CONTEXTUALIZAÇÃO

1.1 Mastócitos

Mastócitos são células inflamatórias de linhagem hematopoiética que desempenham um importante papel iniciando a inflamação, na modulação das respostas imunes inata e adaptativa, na reparação tecidual e manutenção homeostática (Paivandy e Pejler, 2021). São células do sistema imune, residentes no tecido conjuntivo, portadoras de receptor de IgE de alta afinidade (FcεRI), com citoplasma altamente granulado, e que se originam de células progenitoras pluripotentes da medula óssea que expressam CD34, CD117 (*c-KIT*) e CD13 sob a influência do fator de células-tronco (SCF na sigla em inglês). Os mastócitos maturam na presença de outros fatores de crescimento distintos, fornecidos pelo microambiente do tecido onde eles são destinados (Minai-Fleminger e Levi-Schaffer, 2009; Krystel-Whittemore et al., 2016).

No tecido periférico, a célula progenitora se diferencia para uma das duas classes de mastócitos maduros: mastócito de tecido conjuntivo ou mastócito de mucosa, que diferem entre si em diversas propriedades, incluindo os mediadores produzidos e secretados (Halova et al., 2012). A maturação dos precursores nos tecidos depende do fator de células-tronco expresso na superfície dos fibroblastos, células estromais e células endoteliais através da ligação à tirosina quinase (KIT) nos mastócitos. Os mecanismos de liberação de quimiocinas a tecidos específicos permanecem pouco elucidados, embora os precursores expressem múltiplos receptores de quimiocinas e integrinas (Stone et al., 2010).

Mastócitos possuem ampla distribuição tecidual e são encontrados predominantemente na interface entre o indivíduo e o meio externo, locais com potencial para entrada de patógenos ou substâncias nocivas, como a pele, e mucosa dos tratos respiratório e gastrointestinal (Silva et al., 2014). Estão presentes em todos os tecidos vascularizados, abaixo do epitélio no tecido conjuntivo, periferia dos vasos sanguíneos, músculo liso e folículo piloso, no interior de vias aéreas, trato gastrointestinal e genitourinário (Krystel-Whittemore et al., 2016; Galli et al., 2020). O excesso numérico de mastócitos ocorre de forma neoplásica, principalmente na pele, medula óssea, trato gastrointestinal, baço, fígado e linfonodos, geralmente causados pela ativação de mutações no KIT (Stone et al., 2010).

A ativação dos mastócitos pode resultar na liberação de três classes distintas de mediadores: pré-formados, que são armazenados nos grânulos citoplasmáticos dos mastócitos; neoformados ou mediadores lipídicos, derivados de membranas lipídicas; e mediadores neossintetizados, que são produzidos após ativação transcricional e cuja regulação depende do tipo de estímulo e receptor envolvido (Silva et al., 2014). A ativação ocorre através da ligação de IgE e antígenos específicos ou imunocomplexos de antígeno IgG, que inicia a secreção imediata de vários mediadores granulares pré-formados (como triptase, quimima, histamina e proteoglicanos), bem como de mediadores recém-sintetizados, como metabólitos do ácido araquidônico, e a produção posterior de diversas citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento (Minai-Fleminger e Levi-Schaffer, 2009; Galli et al., 2020).

Muitos dos mediadores armazenados ou sintetizados pelos mastócitos atraem leucócitos (eosinófilos, basófilos, linfócitos Th2 e neutrófilos) e amplificam a resposta inflamatória. Os mediadores inflamatórios aumentam a permeabilidade dos vasos da microcirculação, facilitando a passagem de células da corrente sanguínea para o tecido afetado. Após a desgranulação, os mastócitos ressintetizam os mediadores e repovoam com novos grânulos (Krystel-Whittemore et al., 2016). Ativação dos mastócitos e sua desgranulação podem ser precipitadas por estímulos físicos ou químicos (calor, trauma, toxinas), ou por mecanismos imunes, como a ligação da IgE com receptores da superfície celular (Dobson e Scase, 2007).

Mastócitos são primordiais na patogênese de reações de hipersensibilidade; também estão envolvidos na resposta do hospedeiro a patógenos, doenças autoimunes, fibrose e cicatrização de feridas (Stone et al., 2010). Por outro lado, em humanos, a ativação desregulada de mastócitos pode contribuir para a patogênese de condições alérgicas, incluindo asma e dermatite atópica, e outras doenças como mastocitose cutânea, fibrose, câncer e psoríase (Paivandy e Pejler, 2021).

1.2 Mastocitoma Canino (MC)

A proliferação neoplásica de mastócitos, denominada mastocitoma, representa aproximadamente 20% de todos os tumores de pele em cães (Kiupel e Camus, 2019). Em cães, apesar de se desenvolver com mais frequência na pele, pode ocorrer também no intestino, fígado, baço, e outros órgãos (Misdrop, 2004; Souza et al, 2018). O MC é altamente heterogêneo na apresentação clínica e no comportamento biológico, com

potencial variável de recorrência e metástase, razão pela qual a maioria dos patologistas se concentra em identificar com precisão casos mais agressivos (Horta et al., 2018; Kiupel e Camus, 2019). Desde nódulos solitários de comportamento benigno, que podem ser curados por meio de excisão cirúrgica, até doença sistêmica metastática potencialmente fatal; mastocitomas são considerados potencialmente malignos, porém o seu potencial metastático ainda não está bem elucidado (Hosseini et al., 2014).

Entre os cães, a idade média para predisposição ao mastocitoma é de oito anos, entretanto existem relatos da doença acometendo animais de até quatro meses. Não foi observada predisposição por sexo, por outro lado existe predisposição de algumas raças como Boxer, Cocker Spaniel, Fox Terrier, Bulldogue inglês, Dachshund, Labrador Retriever, Golden Retriever, Beagle, Pug, Schnauzer, Shar-pei, Pitt Bull e cães sem raça definida (Dobson e Scase, 2007; Souza et al., 2018; Bae et al., 2020).

A etiologia do MC é desconhecida, mas como na maioria das neoplasias, provavelmente é multifatorial. A bem documentada predisposição de raças provavelmente indica componente genético subjacente. Além deste componente, alguns autores sugeriram que a inflamação cutânea crônica pode desempenhar um papel no desenvolvimento do MC. No entanto, apenas casos raros de MC associados à dermatite crônica, formação de cicatrizes ou aplicação de irritantes cutâneos, foram documentados (Welle et al., 2008; De Nardi et al., 2018).

Estudos recentes sugerem que KIT possa estar associado à etiologia do MC. O KIT, que normalmente é expresso em células hematopoiéticas e em mastócitos, consiste em uma proteína transmembrana, a ativação da via de transdução de sinal KIT tem ação no crescimento e desenvolvimento de mastócitos normais. O KIT é codificado pelo protooncogene c-KIT, cuja desregulação ocorre em muitos casos de câncer em humanos (Dobson e Scase, 2007). O receptor tirosina quinase KIT é expresso por diversos tipos celulares, incluindo células progenitoras hematopoiéticas, células germinativas, células intersticiais de Cajal, melanócitos e mastócitos, no qual está associado à sobrevivência, proliferação e diferenciação celular (Webster et al., 2006). Em cães, mastócitos normais demonstram o KIT apenas na membrana, enquanto mastocitomas indiferenciados tendem a expressar o KIT citoplasmático (Carvalho et al., 2017).

O diagnóstico histopatológico do MC é direto na maioria dos casos. A morfologia celular depende do grau de diferenciação, mas a maioria dos mastócitos neoplásicos possui uma membrana celular distinta, um núcleo redondo central e números variáveis de grânulos citoplasmáticos que se coram em azul acinzentado com hematoxilina-eosina

(HE), ou metacromaticamente em púrpura com azul de toluidina e May Grünwald-Giemsa. Números variáveis de eosinófilos são dispersos por toda a massa neoplásica ou formam agregados. Deposição acentuada de mucina e hialinização perivascular podem ser observadas em resposta à infiltração eosinofílica e pode estar presente uma vasculite eosinofílica (Welle et al., 2008).

Considera-se a graduação histopatológica como uma ferramenta primária de prognóstico para o mastocitoma canino, sendo a classificação de Patnaik et al. (1984) a mais usada (Sabattini et al., 2015). Este sistema classifica o mastocitoma em três graus com base em características histológicas, que incluem: celularidade, morfologia celular, invasão, atividade mitótica e reação de estroma. Assim, é feita a graduação histológica de mastocitoma canino descrita por Patnaik et al. (1984):

- Grau I: lesões confinadas à derme e espaços intrafoliculares, mastócitos bem diferenciados, organizados em fileiras ou pequenos grupos, separados por fibras maduras de colágeno da derme, com bordos citoplasmáticos bem delimitados contendo grânulos metacromáticos proeminentes, núcleo redondo com cromatina condensada e ausência de figuras mitóticas.
- Grau II: celularidade moderada a alta, células neoplásicas infiltrando ou substituindo a derme inferior e tecido subcutâneo, podendo se estender para o músculo esquelético e tecidos adjacentes; mastócitos moderadamente pleomórficos organizados em grupos, com bordos citoplasmáticos definidos contendo grânulos intracitoplasmáticos finos, núcleo único redondo, ou ocasionalmente células binucleadas com cromatina dispersa, nucléolo proeminente, figuras mitóticas variando de 0 a 2 por campo de grande aumento – CGA (400x). O estroma é fibrovascular e fino em algumas áreas e espesso com hialinização em outras áreas. Pode ocorrer ainda edema e necrose.
- Grau III: altamente celular, células neoplásicas pleomórficas substituindo tecido subcutâneo e tecidos mais profundos; citoplasma com bordos indistintos contendo grânulos intracitoplasmáticos finos ou grânulos pouco visíveis; núcleo celular arredondado vesiculoso apresentando um ou mais nucléolos evidentes; é comum a presença de células binucleadas ou multinucleadas. Figuras mitóticas variam de 3 a 6 por CGA. O estroma é fibrovascular e fibrocolagenoso com áreas de hialinização. É comum encontrar edema, áreas hemorrágicas e necrose.

A Figura 1 a seguir ilustra a graduação histológica de mastocitoma canino como descrita por Patnaik et al. (1984).

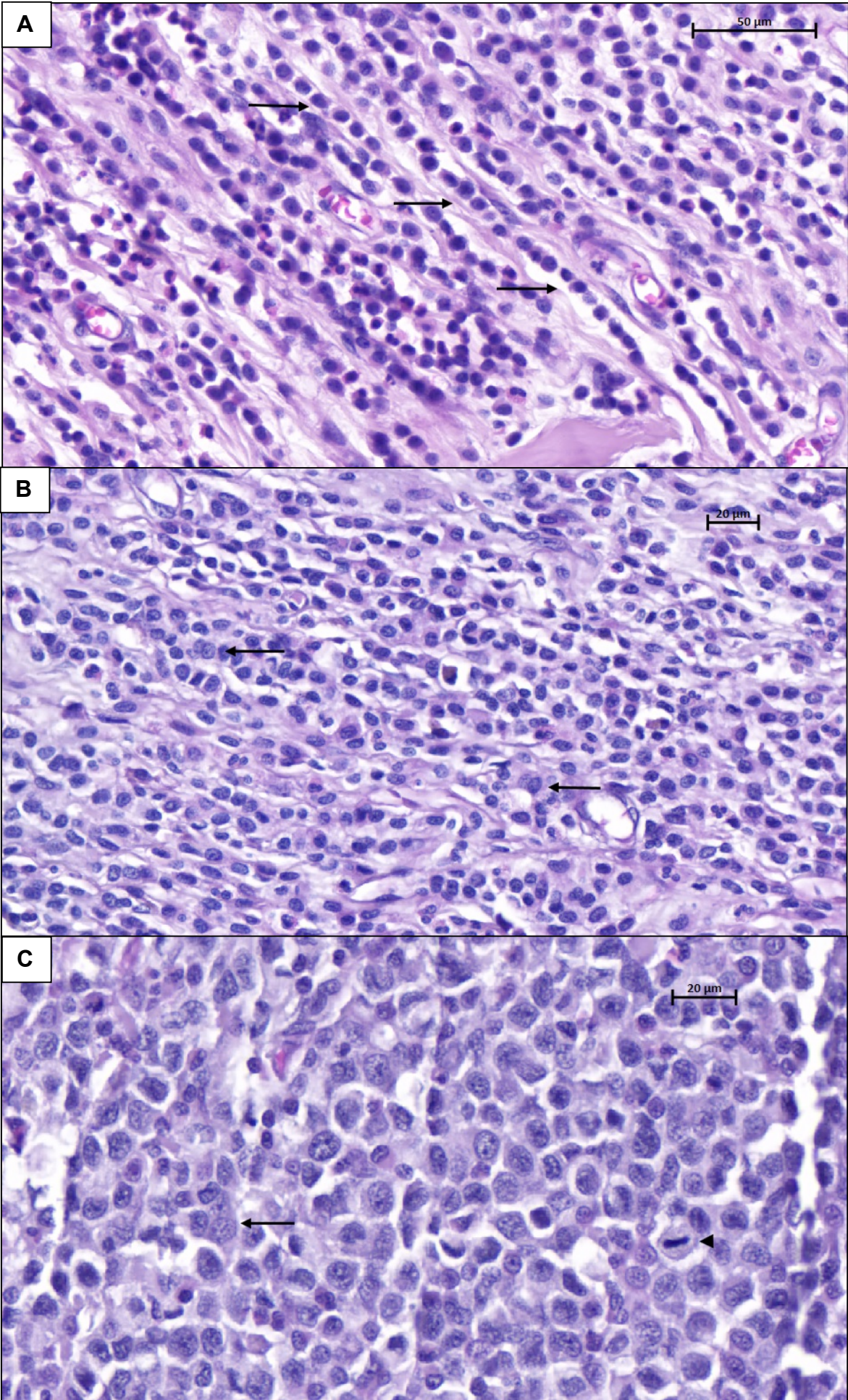


Figura 1: Graduações histológicas descritas por Patnaik et al. (1984). A) Grau I - Mastócitos bem diferenciados, organizados em fileiras (setas), separados por fibras de colágeno da derme. Bordos citoplasmáticos bem delimitados, núcleo redondo com cromatina condensada e ausência de figuras mitóticas. B) Grau II - Mastócitos moderadamente pleomórficos, com bordos citoplasmáticos definidos, núcleo único redondo, raras células binucleadas (seta) com cromatina dispersa, nucléolo proeminente. C) Grau III - Células neoplásicas pleomórficas, citoplasma com bordos indistintos contendo grânulos intracitoplasmáticos finos ou grânulos pouco visíveis, núcleo celular apresentando um ou mais nucléolos evidentes, presença de células multinucleadas (seta) e figuras mitóticas (cabeça da seta). H-E, 400x. (Fonte: Arquivo pessoal).

O comportamento do grau intermediário de um mastocitoma (grau II) é de difícil predição, além da graduação sugerida por Patnaik ser influenciada pela subjetividade entre observadores. Para melhorar a concordância entre patologistas e reduzir um prognóstico incerto do grau intermediário, uma nova graduação histológica foi proposta por Kiupel et al. (2011), classificando os mastocitomas tão somente em alto ou baixo grau, e que demonstrou consistência de 96,8% entre patologistas (Sabattini et al., 2015). De Nardi et al. (2018) sugerem que ambas as classificações histológicas sejam feitas e avaliadas na hora de determinar o prognóstico do animal.

De acordo com Kiupel et al. (2011), o diagnóstico de mastocitoma de alto grau é baseado na presença de qualquer um dos seguintes critérios, em 10 CGAs: mínimo de sete figuras mitóticas, pelo menos três células multinucleadas com três ou mais núcleos, mínimo de três núcleos bizarros e cariomegalia (diâmetro nuclear de pelo menos 10% das células neoplásicas com pelo menos duas vezes o tamanho normal). Na presença um ou mais desses critérios, o mastocitoma é classificado como de alto grau, e a ausência destes critérios classifica o tumor como de baixo grau.

O exame citopatológico feito por aspiração por agulha fina é a ferramenta diagnóstica inicial mais comum, com uma acuracidade de diagnóstico entre 92 e 96% para mastocitomas. (Hergt et al., 2016). Os mastócitos esfoliam rapidamente e são facilmente identificados pela colocação metacromática dos grânulos intracitoplasmáticos (de Nardi et al., 2018). Hergt et al. (2016) propuseram uma graduação citológica baseada na graduação histológica de alto e baixo grau, com resultados mostrando 86,8% de sensibilidade e 97,1% de especificidade.

Vários estudos foram realizados na tentativa de desenvolver métodos menos subjetivos de prever o comportamento e o prognóstico do MC, a partir da análise de tecido tumoral fixado em formalina e incluído em parafina, marcadores moleculares e genéticos (Kiupel et al., 2004; Scase et al., 2006; Romansik et al., 2007; Vascellari et al., 2012).

Apesar da graduação histológica ser usada para prever o comportamento clínico do mastocitoma, muitos aspectos dos mecanismos moleculares por trás da biologia entre tumores de alto e baixo grau de acordo com Kiupel et al. (2011), ainda são obscuros. A maioria dos estudos sobre a biologia dos mastocitomas tem focado nas mutações do *c-KIT* (Schlieben et al., 2012). Os perfis de expressão de uma variedade de marcadores biológicos, como Ki-67, *c-KIT*, Ag-NOR, quimase e triptase, vêm sendo investigados como potenciais marcadores de prognóstico (Mackowiack et al., 2012). Ki-67 é uma proteína nuclear expressada em todas as fases ativas do ciclo celular. O número relativo de células Ki-67 positivas é usado para determinar o índice de proliferação ou número relativo de células ativamente envolvidas no ciclo celular (fração de crescimento) (Vascellari et al., 2012). No genoma humano, as regiões de organização nucleolar (NORs) estão localizadas no braço curto de cinco cromossomos acrocêntricos. A região de organização nucleolar de ligação à prata (AgNOR) tem chamado a atenção devido à sua frequência dentro do núcleo ser significativamente maior em células malignas em comparação com células neoplásicas normais, reativas e benignas (Rao et al., 2016).

Os fatores prognósticos atuais incluem: características clínicas, como estadiamento clínico, raça, sítio anatômico e história de recorrência do tumor; avaliação de critérios histológicos considerando o sistema de classificação de Patnaik et al. (1984) e Kiupel et al. (2011); avaliação imunohistoquímica da marcação Ki-67 e KITr; avaliação de metaloproteinases (MMP-2 e MMP-9) e proteína de ativação de fibroblastos, e características moleculares, como mutações no oncogene *c-KIT* (Horta et al., 2018). A invasão de um tumor depende da proteólise extracelular, que é amplamente mediada por metaloproteinases de matriz (MMPs) produzidas por células neoplásicas. As MMPs são uma família de endopeptidases dependentes de cálcio contendo zinco, secretadas por vários tipos de células que participam de diversos eventos fisiológicos (por exemplo, invasão do trofoblasto, desenvolvimento, remodelação endometrial, ovulação, angiogênese, cicatrização de feridas, reabsorção óssea e migração celular) bem como em processos patológicos (Giantin et al., 2012).

O comportamento biológico do MC é altamente variável, e as melhorias na compreensão da história natural e dos indicadores prognósticos, bem como as indicações para a terapia multimodal, resultarão em melhores resultados em pacientes com mastocitoma (Welle et al., 2008; Horta et al., 2018).

1.3 Relação mastócitos x eosinófilos

Os eosinófilos, juntamente com o restante das células sanguíneas de linhagem mieloide, desenvolvem-se no microambiente da medula óssea a partir de células-tronco hematopoiéticas multipotentes, que dão origem a uma população de progenitores de eosinófilos (EoPs na sigla em inglês) capazes de diferenciar-se terminalmente em eosinófilos maduros (Klion et al., 2020).

Eosinófilos são leucócitos multifuncionais envolvidos na patogênese de inúmeros processos inflamatórios, incluindo doenças parasitárias e alérgicas. Em resposta a diversos estímulos, os eosinófilos são recrutados da circulação para o foco inflamatório, onde modulam respostas imunes através de um conjunto de mecanismos (Rothenberg e Hogan, 2006). Sob condições homeostáticas, a grande maioria dos eosinófilos é direcionada para as superfícies mucosas do trato gastrointestinal, exceto esôfago. Embora o tempo da sua vida útil nesses órgãos não ser conhecida, acredita-se que seja de alguns dias. Como acontece com todos os leucócitos da circulação, para que os eosinófilos saiam da corrente sanguínea e entrem em qualquer compartimento extravascular, uma série de etapas bem orquestradas envolvendo moléculas de adesão leucocitária e endotelial deve ocorrer (Klion et al., 2020).

Não existe consenso sobre o principal mecanismo de sinalização para a ativação de eosinófilos, todavia pode envolver diversos mediadores, incluindo IL-3, IL-5, GM-CSF e fator de ativação plaquetária (PAF na sigla em inglês) (Stone et al., 2010). Tem sido descritas etapas moleculares envolvidas no desenvolvimento e no tráfico de eosinófilos, com atenção especial ao importante papel do fator de transcrição GATA-1, à citocina seletiva de eosinófilos IL-5, e à subfamília de eotaxina de quimiocinas (Rothenberg e Hogan, 2006).

Três citocinas, IL-3, IL-5 e GM-CSF, são particularmente importantes na regulação do desenvolvimento de eosinófilos, provavelmente ao fornecer sinais proliferativos permissivos e de diferenciação após os sinais instrutivos especificados pelos fatores de transcrição GATA-1 e PU.1. Destas três citocinas, a IL-5 é a mais específica para a linhagem de eosinófilos, sendo responsável por sua diferenciação seletiva, além de estimular a liberação de eosinófilos da medula óssea na circulação periférica (Rothenberg e Hogan, 2006). A IL-5, produzida por mastócitos, ativa o receptor de IL-5, altamente expresso na superfície de eosinófilos, basófilos e mastócitos. Além dos mastócitos, as células Th2, as células linfoides inatas do grupo 2 (ILC2), as células T NK e os próprios eosinófilos, são as principais fontes celulares de IL-5 (Galdiero et al., 2017).

Os eosinófilos secretam predominantemente sua proteína granular por exocitose e desgranulação reguladas. Em um processo de desgranulação fragmentada, os eosinófilos liberam seletivamente componentes de seus grânulos específicos (Rothenberg e Hogan, 2006).

É notável que a infiltração de eosinófilos seja detectada na proximidade de mastócitos em tecidos inflamados alérgicos, e também em diversas doenças, como na mastocitose, mastocitoma, carcinoma gástrico, doença de Crohn, adesões intestinais, infecção por *Trypanosoma cruzi*, rosácea, esofagite eosinofílica, e penfigoide bolhoso (Gangwar et al., 2016). Alguns estudos *in vitro* sugerem a existência de possíveis vias de interação solúvel entre estas células. Dados indicam que eosinófilos e mastócitos podem afetar a viabilidade, funcionalidade, tráfego e ativação uns dos outros (Minai-Fleminger e Levi-Schaffer, 2009).

Mastócitos e eosinófilos participam de um complexo ciclo de autoperpetuação. Os eosinófilos produzem mediadores responsáveis pela diferenciação, ativação, proliferação e sobrevivência de mastócitos. Por sua vez, os mastócitos ativados liberam mediadores que favorecem o recrutamento e a ativação de eosinófilos, como IL-5 e fator estimulador de colônias de granulócitos-monócitos (Piazuelo et al., 2008).

Cada mastócito contém grânulos citoplasmáticos secretórios, que quando extrusados pelas células no mecanismo da desgranulação, liberam diversas substâncias biologicamente ativas na circulação sanguínea. Entre estas substâncias estão enzimas proteolíticas, histamina, heparina, e o fator quimiotático de eosinófilos na anafilaxia (ECF-A na sigla em inglês) (Kay et al., 1971; Misdrop, 2004). Entre as citocinas produzidas pelos mastócitos, estão a IL-3, GM-CSF, e IL-5, que são essenciais para o desenvolvimento e sobrevivência do eosinófilo (Stone et al., 2010). Verificou-se que proteínas básicas e mediadores lipídicos de eosinófilos ativam mastócitos; e mediadores e metabólitos de mastócitos foram mostrados como estimuladores de eosinófilos. Além disso, os fatores de crescimento de uma célula podem ser um produto da outra: os eosinófilos podem produzir fator de célula-tronco (SCF na sigla em inglês) e fator de crescimento nervoso, os quais regulam positivamente a sobrevivência, diferenciação e função do mastócito. Reciprocamente, o GM-CSF, IL-5 e IL-3 e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), que pode ser liberado pelos mastócitos, são citocinas de sobrevivência para eosinófilos (Elishmereni et al., 2011). O SCF é um ativador potente de mastócitos e induz a liberação de peroxidase eosinofílica e cisteinil leucotrieno C4 de eosinófilos. SCF,

produzido por ambos, mastócitos e eosinófilos, atua no receptor KIT de ambas as células (Galdiero et al., 2017).

Um estudo feito por Caruso et al. (2007) aponta evidência morfológica de *cross-talk* entre mastócitos ativados e eosinófilos. Esses autores identificaram sinais ultraestruturais de ativação, incluindo alterações no tamanho e número de grânulos, vacúolos citoplasmáticos e inúmeros grânulos livres no espaço extracelular.

Ambos os tipos de células liberam fatores pró-fibrogênico (por ex: fator de crescimento transformador- β) e pró-angiogênico (por ex: fator de crescimento endotelial vascular). Eosinófilos induzem a angiogênese através da produção de VEGF-A, MBP e osteoponina. Curiosamente, o VEGF-A produzido por ambos, eosinófilos e mastócitos, é também quimiotático para mastócitos por meio da ligação com o VEGFr-1/2 presente na sua superfície (Galdiero et al., 2017). A angiogênese contribui para a perpetuação do processo inflamatório, promovendo a migração de células inflamatórias (Piazuelo et al., 2008).

Apesar da grande casuística de mastocitoma canino, não existem relatos na literatura que correlacionem a sua graduação com número de eosinófilos e fatores que possam influenciar na quantidade de eosinófilos no tecido tumoral, podendo este estudo trazer contribuições relevantes para um melhor entendimento do comportamento neoplásico do MC e seu prognóstico.

CAPÍTULO 2

Artigo científico submetido/ a ser submetido para publicação/ publicado no periódico Pesquisa Veterinária Brasileira)

CORRELAÇÃO ENTRE DIFERENTES GRADUAÇÕES DE MASTOCITOMA CANINO E NÚMERO DE EOSINÓFILOS, EXPRESSÃO DE INTERLEUCINA-5 E DE RECEPTOR DE FATOR DE CRESCIMENTO ENDOTELIAL VASCULAR

(Correlation between different grades of Dog Mast Cell Tumor and Number of Eosinophils, Expression of Interleukin-5 and Vascular Endothelial Growth Factor Receptor)

Chiara Domingues Araújo*, Gustavo Seron Sanches, Fernanda Borek, Daniel Coatti Rocha, Gabriela Della Giustina, Jair Rodini Engracia Filho, Gervásio Henrique Bechara

Escola de Ciências da Vida, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Rua Imaculada Conceição, 1155, Curitiba, PR, Brasil, 80215-901. *Corresponding author: chiara.domingues@hotmail.com

ABSTRACT – Araujo C.D., Sanches G.S., Borek F., Rocha, D. C., Giustina G.D., Engracia Filho J.R., Bechara G.H. 2020. (Correlation between different grades of Canine Mast Cell Tumor and Number of Eosinophils, Interleukin-5 and Vascular Endothelial Growth Factor.

Escola de Ciências da Vida, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Rua Imaculada Conceição, 1155, Curitiba, PR, Brasil, 80215-901. E-mail: chiara.domingues@hotmail.com

Neoplastic proliferation of mast cells (mast cell tumors) is the most common type of skin cancer in dogs. Mediators stored or synthesized by mast cells attract leukocytes and amplify the inflammatory response. Despite the large number of canine mast cell tumors, there are no studies in the literature that correlate their grade with the number of eosinophils and factors that may influence their quantity in the tumor tissue. The aim of this study was to correlate the histological grades of canine mast cell tumors with the number of eosinophils and factors that may be related to its number in the tumor tissue. Forty-eight samples of 48 mast cell tumors sent to the Histopathology Laboratory of the Clínica Veterinária Escola at the PUCPR were analyzed. The slides were stained using the hematoxylin-eosin and May Grünwald-Giemsa techniques, histological grades and eosinophil count were performed. For immunohistochemical evaluation IL-5 and VEGFr antibodies were used and the percentage of immunostained area for each antibody was determined. Histological grade showed 24 samples (50%) grade I, 23 (47.9%) grade II and only one sample (2.1%) was classified as grade III Patnaik et al. (1984), and 11 (22.9%) were classified as high grade, and 37 (77.15%) of low grade Kiupel et al. (2011). When correlating eosinophil count with the percentages of IL-5 and VEGFr, significant values were found. Further studies requiring the identification of prognostic factors that predict results are the next step.

INDEX TERMS: mast cell, histopathology, dog, immunohistochemistry, neoplasia, citokines.

RESUMO – [Correlação entre diferentes graduações de mastocitoma canino e número de eosinófilos, IL-5 e VEGF.] Mastocitoma, é a neoplasia cutânea mais comum em cães. Mediadores armazenados ou sintetizados pelos mastócitos atraem leucócitos e amplificam a resposta inflamatória, apesar da grande casuística de mastocitoma canino, não existem estudos na literatura que correlacionem a sua graduação com número de eosinófilos e fatores que possam influenciar na sua quantidade no tecido tumoral. O objetivo deste estudo foi correlacionar a graduação histológica de mastocitoma canino com número de eosinófilos e fatores que possam estar relacionados à sua quantidade no tecido tumoral. Foram utilizadas 48 amostras de mastocitoma de cães enviadas ao Laboratório de Histopatologia da Clínica Veterinária Escola da PUCPR. As amostras foram processadas e coradas pelas técnicas da hematoxilina-eosina e May Grünwald-Giemsa, nas quais foram realizadas as graduações histológicas e contagem de eosinófilos. Para a avaliação imuno-histoquímica as amostras foram incubadas com os anticorpos anti IL-5 e anti VEGFr, a porcentagem de área imunomarcada de cada anticorpo foi determinada. Das 48 amostras graduadas 24 (50%) apresentaram grau I, 23 (47,9%) grau II e apenas uma amostra (2,1%) foi classificada como grau III Patnaik et al. (1984), enquanto que 11 amostras (22,9%) foram classificadas como de alto grau, e 37 (77,15%) de baixo grau Kiupel et al. (2011). Quando correlacionado a contagem de eosinófilos com as porcentagens de IL-5 e VEGFr, não foram encontrados valores significativos. Mais estudos devem ser feitos, sendo necessário identificar fatores prognósticos preditivos.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: mastócitos, histopatologia, cães, imunohistoquímica, neoplasia, citocinas.

INTRODUÇÃO

Mastocitoma canino representa aproximadamente 20% de todos os tumores de pele em cães e possui um comportamento biológico imprevisível (Kiupel e Camus, 2019; Bae et al., 2020). Mediadores armazenados ou sintetizados pelos mastócitos atraem leucócitos (eosinófilos, basófilos, linfócitos Th2, neutrófilos) e amplificam a resposta inflamatória. Os mediadores inflamatórios aumentam a permeabilidade de vasos da microcirculação sanguínea, facilitando a passagem de plasma e células da corrente sanguínea para o tecido afetado. Após a degranulação, os mastócitos resintetizam os mediadores e repovoam os grânulos (Krystel-Whittemore et al. 2016). Entre as citocinas produzidas pelos mastócitos estão a IL-3, GM-CSF, e IL-5, que são essenciais para o desenvolvimento e sobrevivência do eosinófilo (Stone et al. 2010). Mastócitos podem liberar citocinas tumorais e fatores de crescimento, como fator de crescimento de fibroblastos 2 (FGF-2), fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), fator de crescimento nervoso (NGF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), IL-8 e IL-10, que estimulam a expansão das células tumorais (Ribatti & Ranieri 2015).

Os eosinófilos, juntamente com o restante das células de linhagem mieloide sanguíneas, desenvolvem-se no microambiente da medula óssea a partir de células-tronco hematopoiéticas multipotentes, que dão origem a uma população de progenitores de eosinófilos (EoPs) capazes de diferenciar-se terminalmente em eosinófilos maduros (Klion et al. 2020). As etapas moleculares envolvidas no desenvolvimento e no tráfico de eosinófilos são descritas, com atenção especial ao importante papel do fator de transcrição GATA-1, à citocina seletiva de eosinófilos IL-5, e à subfamília de eotaxina de quimiocinas (Rothenberg & Hogan 2006).

Três citocinas, IL-3, IL-5 e GM-CSF, são particularmente importantes na regulação do desenvolvimento de eosinófilos, dentre as quais a IL-5, a mais específica para a linhagem de eosinófilos, é responsável por sua diferenciação seletiva (Rothenberg & Hogan 2006).

Ambos os tipos celulares liberam fatores pró-fibrogênico (fator de crescimento transformador- β) e pró-angiogênico (fator de crescimento endotelial vascular). A angiogênese contribui para a perpetuação do processo inflamatório, promovendo a migração de células inflamatórias (Piazuelo et al. 2008).

Apesar da grande casuística de mastocitoma canino, não existem estudos na literatura que correlacionem a sua graduação com número de eosinófilos e fatores que possam influenciar na sua quantidade no tecido tumoral.

MATERIAL E MÉTODOS

Este experimento foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Pontifícia Universidade Católica do Paraná - PUCPR, sob o protocolo número 01171/2017.

Foi realizado um estudo retrospectivo utilizando 48 amostras de mastocitoma de cães previamente enviadas ao Laboratório de Histopatologia da Clínica Veterinária Escola da PUCPR. Os animais foram selecionados independente de sexo, raça ou idade. As amostras foram processadas segundo histotécnica de rotina, com inclusão em parafina e secção em micrótomo em cortes de 4 μ m de espessura. As lâminas obtidas das amostras foram coradas pelas técnicas da hematoxilina-eosina (HE) e May Grünwald-Giemsa. A classificação histológica, de acordo com os critérios de Patnaik et al. (1984) e Kiupel et al. (2011), foram realizadas por três médicos veterinários patologistas em lâminas coradas com H&E. A graduação histológica deste estudo é representada pela moda amostral dos três avaliadores.

As lâminas coradas com a técnica de MayGrünwald-Giemsa foram escaneadas e digitalizadas com Axio Scan Scanner Z1 (Carl Zeiss, Alemanha). A contagem de eosinófilos foi realizada em imagens digitalizadas utilizando o programa ZEN 2.0 Image software (Blue ed., Carl Zeiss Microscopy GmbH, 2011), no qual eram delimitadas três áreas aleatórias de cada amostra. Dentro de cada área foi realizada a contagem de eosinófilos, em seguida, foram calculadas as médias das áreas e células contadas em cada amostra, e estes valores foram convertidos em número de células por milímetro quadrado. Para que uma célula fosse contabilizada o núcleo deveria estar sobre a linha ou dentro da área delimitada. (Fig.1)

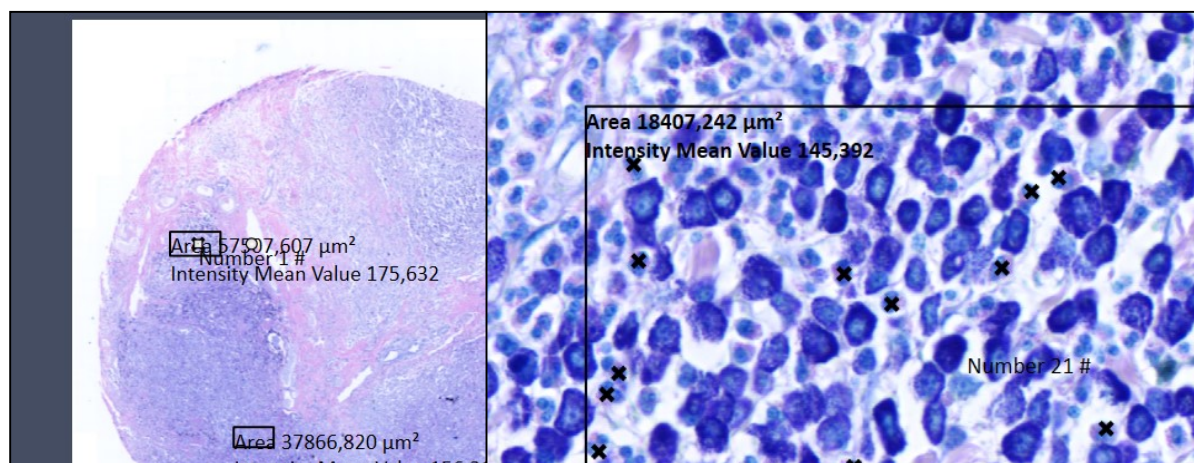


Fig. 1. Representação da contagem de eosinófilos. **(A)** Amostra com as três áreas selecionadas. **(B)** Área delimitada para contagem de eosinófilos. Cada eosinófilo contado é marcado com um X.

Para a avaliação imunohistoquímica, a técnica de *Tissue Microarray* (TMA) descrita por Mattioli et al. (2011) foi aplicada nas amostras emblocadas. Para tanto, uma broca metálica de 3 mm de diâmetro foi utilizada, e novos blocos de parafina foram confeccionados. Os blocos de TMA foram seccionados em micrótomo com cortes de 4 µm de espessura, em seguida foram desparafinizados com xilol (2 x 10 min) e reidratados com álcool etílico absoluto (3 x 1 min) e álcool etílico 80% (1 x 1 min). A peroxidase endógena foi inibida utilizando H₂O₂ com metanol 5% por 15 minutos. A recuperação antigênica foi realizada utilizando Imuno Retrifer pH 6 (BioSB, Santa Barbara, EUA), induzida por calor em banho-maria a 99°C por 25 minutos. As amostras foram incubadas com os anticorpos anti-IL-5 policlonal (Bioss, EUA) em diluição 1:200, e anti-VEGFr policlonal (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA) em diluição 1:50. Para controle negativo a adição do anticorpo foi substituída pelo uso de tampão fosfato salino. O kit revelador polivalente Reveal (Spring, Pleasanton, EUA) foi aplicado de acordo com as instruções do fabricante. As imunorreações foram incubadas com cromógeno DAB 1,1 (OriGene, Rockville, EUA), e em seguida contracoradas utilizando Hematoxilina de Harris (3 min).

As lâminas imunocoradas foram digitalizadas por meio do microscópio Axio Scan Scanner Z1 (Carl Zeiss, Alemanha), e a porcentagem de área imunomarcada de cada anticorpo foi delimitada e calculada com o auxílio do software Image-Pro Plus 4.5 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, EUA). Os resultados foram analisados estatisticamente com correlação de Spearman, teste de Levene para verificar homogeneidade de variância, seguido de ANOVA e teste de Tukey.

RESULTADOS

Das 48 amostras graduadas segundo a classificação de Patnaik et al. (1984) 24 (50%) apresentaram grau I, 23 (47,9%) grau II e apenas uma amostra (2,1%) foi classificada como grau III. Já pela classificação de Kiupel et al. (2011) 11 amostras (22,9%) foram classificadas como de alto grau, e 37 (77,15%) de baixo grau. Sexo e idade dos animais não apresentaram correlação com as graduações histológicas (Patnaik: idade $p=0,0572$, sexo $p=0,1822$; Kiupel: idade $p=0,1032$; sexo $p=0,148$). Foi observada imunomarcção positiva tanto para IL-5, como para VEGFr nas amostras analisadas (Fig. 2). Não houve correlação com as graduações histológicas e contagem de eosinófilos ($p=0,0939$; $p=0,0772$). Ao correlacionar contagem de eosinófilos com as porcentagens de IL-5 e VEGFr, não foram encontrados valores significativos de correlação (IL-5 $p=0,1554$; VEGFr $p=0,3635$). A porcentagem de IL-5 e VEGFr encontradas nas amostras não apresentam correlação com as graduações de Patnaik et al. (1984) ($p=-0,2879$; $p=0,1392$) e Kiupel et al (2011) ($p=0,2075$; $p=0,1234$). Por meio do teste de Levene, seguido de ANOVA e teste de Tukey, foi realizada uma comparação das médias das contagens de eosinófilos, IL-5 e VEGFr entre as diferentes graduações histológicas (tabela 1).

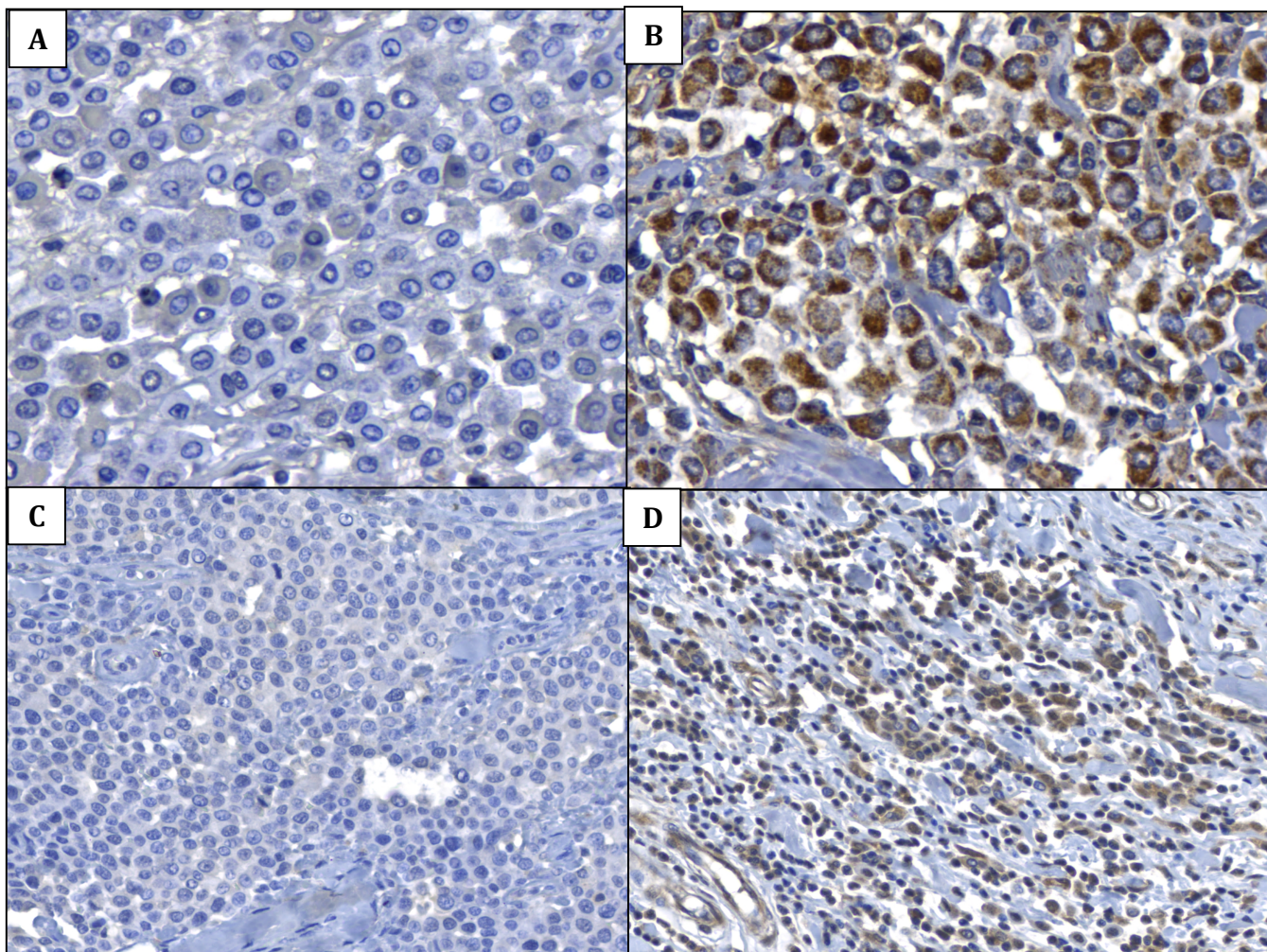


Fig. 2. **(A)** Amostra de mastocitoma canino, controle negativo para IL-5. Aumento de 400x. **(B)** Mastocitoma canino, apresentando mastócitos com intensa imunomarcção citoplasmática (coloração acastanhada) de IL-5. Aumento de 400x. **(C)** Amostra de mastocitoma canino, controle negativo para VEGFr. Aumento de 200x. **(D)** Mastocitoma canino, mastócitos apresentando imunoexpressão citoplasmática (coloração acastanhada) para VEGFr. Aumento de 200x.

Tabela 1. Comparação de média das amostras entre as classificações histológicas de Patnaik et al. (1984) e Kiupel et al. (2011). Resultados expressos em média e desvio padrão.

		IL-5 %	VEGF %	Número de eosinófilos/mm ²
Patnaik et al. (1984)	I	2,83±2,2	15,55±10,68	1,43±0,59
	II	1,92±2,11	22,99±18,61	1,82±0,87
	III	0,66±	5,55±	1±
	P	0,2678	0,1709	0,1581
Kiupel et al. (2011)	Baixo	2,52±2,14	19,39±15,66	1,65±0,79
	Alto	1,73±2,26	16,29±13,31	1,49±0,64
	P	0,2965	0,5515	0,5582

DISCUSSÃO

O presente estudo procurou correlacionar o número de eosinófilos em amostras de mastocitomas com fatores que possam estar associados à sua migração para o tecido neoplásico. É conhecida a grande relação entre mastócitos e eosinófilos; de fato, ambos participam de um complexo ciclo de autoperpetuação. Eosinófilos produzem mediadores responsáveis pela diferenciação, ativação, proliferação e sobrevivência de mastócitos. Por sua vez, é sabido que mastócitos ativados liberam mediadores que favorecem o recrutamento e ativação de eosinófilos, bem como IL-5 e fator estimulador de colônias de granulócitos-monócitos (Piazuelo et al. 2008). Estudo feito por Caruso et al. (2007) aponta evidência morfológica de *cross-talk* entre mastócitos ativados e eosinófilos. Esses autores identificaram sinais ultra estruturais de ativação, incluindo alterações no tamanho e número de grânulos, vacúolos citoplasmáticos e inúmeros grânulos livres no espaço extracelular.

Gross et al. (2005) afirmam que o infiltrado eosinofílico diminui conforme aumenta a graduação histológica, pois alegam que quanto maior o grau de anaplasia das células tumorais, menor o efeito eosinofilotático dos mastócitos, todavia, não foi observada no presente estudo correlação significativa da quantidade de eosinófilos com as graduações histológicas, corroborando Oliveira (2008) e Carvalho et al. (2017), que também relataram ausência de correlação entre as graduações histológicas e concentração de eosinófilos no mastocitoma canino.

A correlação entre contagem de eosinófilos com IL-5 e VEGFr não apresentou resultado significativo em nossos resultados. A adesão dos eosinófilos é uma das etapas necessárias na migração dessas células para tecidos alvos (Ângulo et al., 2019), porém avaliamos somente fatores que influenciam na regulação de eosinófilos, e não na sua adesão no tecido tumoral. Até o momento não existe literatura que associe IL-5 com mastocitoma canino, portanto, mais estudos seriam necessários para uma melhor elucidação da ação desta interleucina em tecidos tumorais.

Na medicina veterinária, diferentes estudos abordaram a expressão do VEGF e a sua relação com a malignidade em tumores de mama caninos e felinos (Restucci et al, 2002; Oliveira, 2008; Camacho et al., 2014). O VEGF é um importante regulador da proliferação de células endoteliais, vasculogênese, angiogênese e permeabilidade vascular, mediada principalmente pelo receptor de tirosina quinase VEGFr. Mastocitomas caninos, tanto cutâneo quanto subcutâneo, expressam VEGFr e mastócitos neoplásicos expressam tanto o ligante VEGF quanto os VEGFr (Silva et al., 2017). É possível que moléculas angiogênicas/linfangiogênicas produzidas

por mastócitos em locais de inflamação ou crescimento tumoral possam desempenhar um papel duplo ao influenciar diretamente a inflamação e angiogênese/linfangiogênese tumoral e contribuir para inflamação crônica devido ao recrutamento de mais mastócitos e outras células do sistema imunológico (Marone et al., 2016). Entretanto, nosso estudo não mostrou correlação entre VEGFr e o número de eosinófilos nas amostras analisadas. Embora diversas substâncias quimiotáticas de eosinófilos estejam bem caracterizados, pouco se sabe sobre mecanismos ou a presença de moléculas reguladoras que influenciam negativamente na migração de eosinófilos e, portanto, podem ser responsáveis por poucos eosinófilos nos tecidos (Bournazou et al., 2009). Devemos considerar que possam existir fatores suprimindo a migração de eosinófilos para o tecido tumoral, sendo este tema para futuros estudos.

Das amostras analisadas, a maioria foi classificada como grau I acordo com Patnaik et al. (1984). Outros estudos, todavia, mostram um predomínio de tumores grau II (Webster et al. 2006, Sabattini et al. 2015, Carvalho et al. 2017). Entretanto, a graduação sugerida por Patnaik et al. (1984) pode ser influenciada pela subjetividade entre observadores. Para melhorar a concordância entre patologistas e reduzir um prognóstico incerto do grau intermediário a graduação histológica proposta por Kiupel et al. (2011), que classifica os mastocitomas tão somente em de alto ou de baixo grau, demonstrou consistência de 96,8% entre patologistas (Sabattini et al., 2015). Das 23 amostras classificadas como grau II, ao serem submetidas à classificação de Kiupel et al. (2011), 13 foram classificadas como baixo grau e 10 como alto grau. Houve uma concordância de 77% entre os patologistas avaliadores. Não foi encontrada neste estudo correlação entre idade dos animais e a classificação histológica, porém Carvalho et al. (2017) relatou uma correlação significativa entre animais idosos e a classificação de Kiupel et al (2011).

CONCLUSÃO

O presente estudo não encontrou correlação entre as diferentes graduações de mastocitoma cutâneo canino com número de eosinófilo, IL-5 e VEGFr. Existem poucos estudos que correlacionam o número de eosinófilos com a graduação tumoral, sendo que os mais recentes não identificam correlação. Não encontramos estudos que identifiquem fatores que possam influenciar no número de eosinófilos em amostras de mastocitoma canino, e poucos autores falam sobre a função do VEGFr em tumores de mastócitos. O mesmo já possui relação com malignidade em outros tipos de tumores, e deve ser investigado de forma mais detalhada em mastocitomas, a fim de trazer benefícios no prognóstico e tratamento.

Agradecimentos – Este estudo foi apoiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) por meio de bolsa de produtividade a G.H. Bechara e pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) com bolsa de pós-doutorado a G.S. Sanches.

Declaração de conflito de interesses – Os autores declaram não haver conflito de interesse.

REFERÊNCIAS

Ângulo E.L., McKernan E.M., Fichtinger P.S. & Mathur S.K. 2019. Comparsion of IL-33 and IL-5 family mediated activation of human eosinophils. PLoS ONE. 14(9): e0217807.

Bae S., Milovancev M., Bartels C., Irvin V.L., Tuohy J.L., Townsend K.L. & Leeper H. 2020. Histologically low-grade, yet biologically high-grade, canine cutaneous mast cell tumours: A systematic review and meta-analysis of individual participant data. *Vet Comp Oncol.* 18:580-589.

Bournazou I., Mackenzie K.J., Duffin R., Rossi, A.G., & Gregory C.D. 2009. Inhibition of eosinophil migration by lactoferrin. *Immunol. Cell Biol.* 88(2):220-223.

Camacho L., Peña L., Gil A.G., Martín-Ruiz A., Dunner S. & Illera J.C. 2014. Immunohistochemical Vascular Factor Expression in Canine Inflammatory Mammary Carcinoma. *Vet Pathol.* 51(4):737-748.

Caruso R.A., Fedele F., Zuccalá V., Fracassi M.G. & Veuti A. 2007. Mast Cell and Eosinophil Interaction in Gastric Carcinomas: Ultrastructural Observations. *Anticancer Res.* 27: 391-394.

Carvalho A.P.M., Carvalho E.C.Q., Nardi A.B. & Silveira L.S. 2017. Comparação de duas classificações histopatológicas com o padrão de imuno-marcação para KIT, a avaliação da proliferação celular e com a presença de mutações no *c-KIT* de mastocitomas cutâneos caninos. *Pesq Vet Bras.* 37(4): 359-367.

Gross T.L., Ihrke P., Walder E.J. & Affolter V.K. 2005. Mast cell tumors, p.853-865. In: Ross T.L., Walder E.J. & Affolter V.K. (Eds), *Skin Diseases of the Dog and Cat: clinical and histopathological diagnosis*. 2nd ed. Science Ltd, Oxford.

Kiupel M., Webster J.D., Bailey K.L., Best S., DeLay J., Detrisac D.J., Fitzgerald S.D., Gamble D., Ginn P.E., Goldschmidt M.H., Hendrick M.J., Howerth E.W., Janovitz E.B., Langohr I., Lenz S.D., Lipscomb T.P., Miller M.A., Misdrop W., Moroff S., Mullaney T.P., Neyens I., O'Toole D., Ramos-Vara J., Scase T.J., Schulman F.Y., Sledge D., Smedley R.C., Smith K., Snyder P.W., Southorn E., Stedman N.L., Steficek B.A., Stromberg P.C., Valli V.E., Weisbrode S.E., Yager J., Heller J. & Miller R. 2011. Proposal of a 2-tier histologic grading system for canine cutaneous mast cell tumors to more accurately predict biological behavior. *Vet Pathol.* 48: 147-155.

Kiupel M. & Camus M. 2019. Diagnosis and prognosis of canine cutaneous mast cell tumors. *Vet Clin Small Anim.* 49:819-836.

Klion A.D., Ackerman S.J. & Bochner B.S. 2020. Contributions of eosinophils to human health and disease. *Annu Rev Pathol Mech Dis.* 15: 179-209.

Krystel-Whittemore M., Dileepan K.N. & Wood J.G. 2016. Mast Cell: A multi-functional master cell. *Front. Immunol.* 6:620.

Marone G., Varricchi G., Loffredo S. & Granata F. 2016. Mast cells and basophils in inflammatory and tumor angiogenesis and lymphangiogenesis. *Eur. J. Pharmacol.* 778: 146-151.

Mattioli T.M.F., Noronha L., Lima A.A.S., Grégio A.M.T., Machado M.A.N., Azevedo M.L.V., Martins A.P.C. & Azevedo-Alanis L.R. 2011. Utilização de brocas trefina para confecção de tissue microarray. Arch. of Oral Res. 2: 161-167.

Oliveira J.M.P. 2008. Aspectos patológicos do mastocitoma cutâneo canino: relação com características epidemiológicas e clínicas e seu valor prognóstico. Tese de Doutorado, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, Portugal.

Patnaik A.K., Ehler W.J. & MacEwen E.G. 1984. Canine cutaneous mast cell tumor: morphologic grading and survival time in 83 dogs. Vet. Pathol. 21: 469-474.

Piazuelo M.B., Camargo M.C., Mera R.M., Delgado A.G., Peek Jr R.M., Correa H., Schneider BG., Sicinski LA., Mora Y., Bravo L.E. & Correa P. 2008. Eosinophils and mast cells in chronic gastritis: possible implications in carcinogenesis. Hum Pathol. 39(9): 1360-1369.

Restucci B., Papparella S., Maiolino P. & De Vico G. 2002. Expression of Vascular Endothelial Growth Factor in Canine Mammary Tumors. Vet Pathol. 39:488-493.

Ribatti D. & Ranieri G. 2015. Tryptase, a novel angiogenic factor stored in mast cell granules. Exp Cell Res. 332: 157-162.

Rothenberg M.E. & Hogan S.P. 2006. The eosinophil. Annu. Rev. Immunol. 24: 147-174.

Sabattini S., Scarpa F., Berlato D. & Bettini G. 2015. Histologic grading of canine mast cell tumor: Is 2 better than 3?. Vet. Pathol. 52: 70-73.

Silva L., Fonseca-Alves C.E., Thompson J.J., Foster R.A., Wood G.A., Amorim R.L. & Coomber B.L. 2017. Pilot assessment of vascular endothelial growth factor receptors and trafficking pathways in recruitment and metastatic canine subcutaneous mast cell tumors. Vet. Med. Sci. 3: 146-155.

Stone K.D., Prussin C. & Metcalfe D.D. 2010. IgE, mast cells, basophils and eosinophils. J. Allergy Clin. Immunol. 125(2 Suppl 2): S73-S80.

Webster J.D., Yuzbasinyan-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): 104-111.

CAPÍTULO 3

(Artigo científico submetido/ a ser submetido para publicação/ publicado no periódico *Veterinary and Comparative Oncology*)

CORRELAÇÃO ENTRE NÚMERO DE EOSINÓFILOS EM AMOSTRAS DE MASTOCITOMA CANINO E PADRÃO DE EXPRESSÃO DO KIT

(Correlation between number of eosinophils in dog mast cell tumor samples and KIT expression pattern)

Chiara Domingues Araújo*, Gustavo Seron Sanches, Fernanda Borek, Daniel Coatti Rocha, Gabriela Della Giustina, Jair Rodini Engracia Filho, Gervásio Henrique Bechara

Escola de Ciências da Vida, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Rua Imaculada Conceição, 1155, Curitiba, PR, Brasil, 80215-901. *Corresponding author: chiara.domingues@hotmail.com

Agradecimentos – Este estudo foi apoiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) por meio de bolsa de produtividade a G.H. Bechara e pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) com bolsa de pós-doutorado a G.S. Sanches.

Declaração de conflito de interesses – Os autores declaram não haver conflito de interesse.

RESUMO

Estudos recentes sugerem que o KIT (tyrosine-protein kinase) possa estar associado à etiologia do mastocitoma canino. O KIT normalmente é expresso em células hematopoiéticas e mastócitos, e consiste em uma proteína transmembrana com atividade da tirosina quinase. O comportamento biológico do mastocitoma canino (MC) é altamente variável, e as melhorias na compreensão da história natural e dos indicadores prognósticos resultarão em melhores resultados em pacientes caninos com mastocitoma. Foram preparadas lâminas histológicas a partir de 48 amostras de mastocitoma de cães enviadas ao Laboratório de Histopatologia da Clínica Veterinária Escola. As amostras

foram coradas pelas técnicas da hematoxilina-eosina e May Grünwald-Giemsa, nas quais foram realizadas as graduações histológicas e contagem de eosinófilos. Para a avaliação imuno-histoquímica, as amostras foram incubadas com o anticorpo c-KIT, após foi realizada a classificação do padrão de imunomarcção. Das 48 amostras graduadas 24 (50%) apresentaram grau I, 23 (47,9%) grau II e apenas uma amostra (2,1%) foi classificada como grau III conforme Patnaik et al. (1984), e 11 amostras (22,9%) foram classificadas como de alto grau, e 37 (77,15%) de baixo grau conforme Kiupel et al. (2011). Ao correlacionar contagem de eosinófilos com os padrões de KIT não foi observada correlação significativa ($p= 0,2648$). Foi realizada ainda a comparação da média de contagem de eosinófilos das amostras entre as graduações histológicas e os diferentes padrões de KIT, a qual mostrou uma diferença significativa entre o padrão I e o padrão III, que apresentou uma maior média de eosinófilos. Observou-se também correlação positiva entre os padrões de KIT e as graduações de Patnaik et al. (1984) e Kiupel et al. (2011) ($p= 0,0006$, $p= 0,0267$, respectivamente). Esperava-se encontrar uma maior média de eosinófilos em tumores bem diferenciados, ao contrario do que foi observado neste estudo. Comparar estes resultados com dados clínicos e prognóstico dos animais pode trazer informações importantes para uma melhor compreensão da interação dos eosinófilos com mastocitoma canino.

Palavras-chave: mastócitos, cães, imuno-histoquímica, neoplasia

INTRODUÇÃO

Estudos recentes sugerem que o *c-KIT* possa estar associado à etiologia do mastocitoma canino (MC). A ativação da via de transdução de sinal KIT age no crescimento e desenvolvimento de mastócitos normais. O KIT é codificado pelo protooncogene *c-KIT*, cuja desregulação ocorre em muitos casos de câncer em humanos.¹ Em cães, mastócitos normais demonstram o KIT apenas na membrana, enquanto mastocitomas indiferenciados tendem a expressar o KIT citoplasmático.²

Os fatores prognósticos atuais do mastocitoma incluem: características clínicas, como estadiamento clínico, raça, sítio anatômico, e história de recorrência do tumor; avaliação de critérios histológicos considerando o sistema de classificação de Patnaik e Kiupel^{3,4}, avaliação imunohistoquímica da marcação Ki-67 e KITr, avaliação de metaloproteinasas (MMP-2 e MMP-9) e proteína de ativação de fibroblastos; características moleculares,

como mutações no oncogene *c-KIT*.⁵ Padrões de imunomarcação de *c-KIT* também estão sendo utilizados para determinar prognóstico. De acordo com Kiupel et al.⁶ O padrão I é caracterizado pela imunomarcação da membrana celular com pouca ou ausência de marcação no citoplasma, o padrão II apresenta imunomarcação focal intensa ou pontilhada no citoplasma das células neoplásica, e o padrão III é caracterizado por imunomarcação intensa e difusa do citoplasma celular.

O comportamento biológico do MC é altamente variável, e as melhorias na compreensão da história natural e dos indicadores prognósticos, bem como as indicações para a terapia multimodal, resultarão em melhor conduta clínica em pacientes caninos com mastocitoma.⁷

MÉTODOS

Este experimento foi aprovado pelo comitê local de Ética no Uso de Animais, sob o protocolo número 01171/2017.

Foram utilizadas 48 amostras de mastocitoma de cães enviadas ao Laboratório de Histopatologia da Clínica Veterinária Escola. Os animais foram selecionados independente de sexo, raça ou idade. As amostras foram processadas segundo histotécnica de rotina, com inclusão em parafina e secção em micrótomo em cortes de 4µm de espessura. As lâminas obtidas das amostras foram coradas pelas técnicas da hematoxilina-eosina (HE) e May Grünwald-Giemsa. A classificação histológica, de acordo com os critérios de Patnaik et al. (1984) e Kiupel et al. (2011), foram realizadas por três médicos veterinários patologistas em lâminas coradas com H&E. A graduação histológica deste estudo é representada pela moda amostral dos três avaliadores.

As lâminas coradas com a técnica de MayGrunwald-Giemsa foram escaneadas e digitalizadas com Axio Scan Scanner Z1 (Carl Zeiss, Alemanha). A contagem de eosinófilos foi realizada em imagens digitalizadas utilizando o programa ZEN 2.0 Image software (Blue ed., Carl Zeiss Microscopy GmbH, 2011), no qual eram delimitadas três áreas aleatórias na amostra. Para que uma célula fosse contabilizada o núcleo deveria estar sobre a linha ou dentro da área delimitada. Em seguida, foram calculadas as médias das áreas e células contadas em cada amostra, e estes valores foram convertidos em número de células por milímetro quadrado.

Para a avaliação imuno-histoquímica, a técnica de *Tissue Microarray* (TMA) descrita por Mattioli foi aplicada nas amostras emblocadas.⁸ Para tanto, uma broca metálica de 3 mm de diâmetro foi utilizada, e novos blocos de parafina foram

confeccionados. Os blocos de TMA foram seccionados em micrótomo com cortes de 4 μ m de espessura, em seguida foram desparafinizados com xilol (2 x 10 min) e reidratados com álcool etílico absoluto (1 x 1 min) e álcool etílico 80% (2 x 1 min). A peroxidase endógena foi inibida utilizando H₂O₂ (5% em metanol) por 15 minutos. Target Retrieval Soution™ (Dako, Glostrup, Dinamarca) foi utilizado para recuperação antigênica induzida por calor de acordo com as instruções do fabricante. As amostras foram incubadas com o anticorpo c-KIT policlonal (Dako, Glostrup, Dinamarca) em diluição 1:100. Para controle negativo a adição do anticorpo foi substituída pelo uso de tampão fosfato salino. O kit revelador polivalente Reveal (Spring, Pleasanton, EUA) foi aplicado de acordo com as instruções do fabricante. As imunorreações foram incubadas com cromógeno DAB 1,1 (OriGene, Rockville, MD, EUA), e em seguida contracoradas utilizando Hematoxilina de Harris (3 min).

As lâminas foram observadas em microscópio de luz nas objetivas de 40x e 100x para realizar a classificação do padrão de imunomarcção conforme descrito por Webster.⁹

Os resultados foram analisados estatisticamente com correlação de Spearman, teste de Levene para verificar homogeneidade de variância, seguido de ANOVA e teste de Tukey. Para análise de concordância entre os padrões de KIT e graduações histológicas foi utilizado o teste de Kappa.

RESULTADOS

Das 48 amostras graduadas segundo a classificação de Patnaik, 24 (50%) apresentaram grau I, 23 (47,9%) grau II e apenas uma amostra (2,1%) foi classificada como grau III. Já pela classificação de Kiupel, 11 amostras (22,9%) foram classificadas como de alto grau, e 37 (77,15%) baixo grau.^{3,4}

A contagem de eosinófilos não apresentou correlação com as graduações histológicas ($p=0,0939$; $p=0,0772$). Quando comparado com os padrões de KIT (Figura 1), também não houve correlação significativa ($p=0,2648$). Há correlação positiva entre os padrões de KIT e as graduações de Patnaik e Kiupel ($p=0,0006$, $p=0,0267$, correlação de Spearman). Foi realizada uma comparação da média de contagem de eosinófilos das amostras entre as graduações histológicas e os diferentes padrões de KIT, o qual mostrou diferença significativa entre o padrão 1 e o padrão 3 de KIT (Tabela 1).

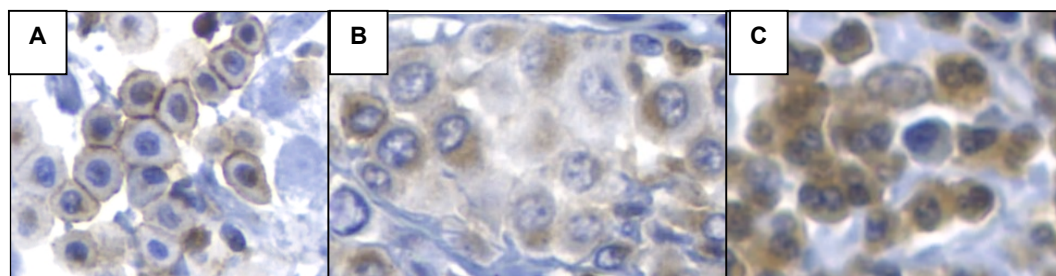


Figura 1 Padrões de imunomarcção de KIT em mastocitoma canino. **A)** Padrão I, ou perimembranoso, apresentando apenas marcação em membrana celular. **B)** Padrão II, citoplasmático focal. **C)** Padrão III, citoplasmático difuso.

Tabela 1. Comparação da média de contagem de eosinófilos das amostras entre as classificações histológicas de Patnaik et al. (1984), Kiupel et al. (2011), e padrões de KIT. Os resultados são expressos em média e desvio padrão.

		Número de amostras	Número de eosinófilos/mm ²
Patnaik	I	24	1,43±0,59
	II	23	1,82±0,87
	III	1	1±
P			0,1581
Kiupel	Baixo	37	1,65±0,79
	Alto	11	1,49±0,64
P			0,5582
KIT	I	15	1,41±0,57b
	II	23	1,49±0,66ab
	III	9	2,16±1,03a
P			0,0345

DISCUSSÃO

Ao comparar a média de contagem de eosinófilos entre os padrões de KIT, foi observada diferença significativa entre os padrões I e III mostrando que mastocitomas com maior expressão citoplasmática apresentam uma maior média de eosinófilos. Kiupel avaliou os padrões de expressão de KIT e triptase como ferramentas de prognóstico para mastocitomas, observando que quanto maior a expressão do KIT citoplasmático, pior o prognóstico do animal.⁶ Gross descreve que o infiltrado eosinofílico diminui conforme aumenta a anaplasia celular,¹⁰ porem ao avaliar a relação estabelecida entre os padrões de KIT com as graduações histológicas, deveríamos esperar uma média maior de contagem de eosinófilos para o padrão I de KIT, e não para o padrão III, no qual as

células tendem a ser mais anaplásicas. Portanto não podemos afirmar que, conforme aumenta a graduação histológica, as células perdem seu efeito eosinofilotático. Pardanani identificou em seu estudo uma mutação no *c-KIT* de eosinófilos em pacientes com eosinofilia associada a mastocitose sistêmica, provando a origem clonal, e não reacional, dos números elevados de eosinófilos.¹¹

A correlação entre a expressão do receptor KIT e graduação histológica de mastocitoma canino foi estabelecida, com tumores bem diferenciados apresentando fraca expressão de KIT, e tumores pouco diferenciados demonstrando alta expressão.⁶ No estudo feito por Carvalho, foi observada forte associação entre o padrão KIT e a classificação histológica.¹² Nossos dados também indicam uma correlação entre os padrões imunohistoquímicos e graduação histológica, no qual os tumores apresentando maior malignidade estão associados a padrões imunohistoquímicos citoplasmáticos.

A maioria das amostras analisadas (50%) foram classificadas como grau I de Patnaik,³ e 47,9% como grau II, sendo apenas 2,1% (n=1) grau III. Outros estudos mostram um predomínio de tumores grau II.^{6,12,13} Entretanto a graduação sugerida por Patnaik et al. (1984) pode ser influenciada pela subjetividade entre observadores. Para melhorar a concordância entre patologistas e reduzir um prognóstico incerto do grau intermediário, a graduação histológica proposta por Kiupel et al. (2011),⁴ que classifica os mastocitomas tão somente em de alto ou de baixo grau, demonstrou consistência de 96,8% entre patologistas.¹³ Das 23 amostras classificadas como grau II, ao serem submetidas à classificação de Kiupel et al. (2011), 13 foram classificadas como baixo grau e 10 como alto grau. Houve uma concordância de 77% entre os patologistas avaliadores.

Não foi observada correlação significativa da quantidade de eosinófilos com as graduações histológicas, ao contrário do que foi descrito por Gross¹⁰, que afirma que o infiltrado eosinofílico diminui conforme aumenta a graduação histológica, pois quanto maior a anaplasia das células tumorais, menor o efeito eosinofilotático dos mastócitos. Por outro lado, Oliveira¹⁴, assim como Carvalho¹², relataram ausência de correlação entre as graduações histológicas e concentração de eosinófilos, corroborando com o resultado encontrado neste estudo. Sendo assim, não podemos utilizar a contagem de eosinófilos como um método para determinar o grau de malignidade dos mastocitomas caninos.

Apesar da grande casuística, o mastocitoma continua deixando muitas dúvidas em aberto. A relação dos eosinófilos com as células tumorais ainda é obscura, e não existe dados suficientes na literatura veterinária, além de substâncias eosinofilotáticas – que

levam a uma eosinofilia reacional, que influenciem no número de eosinófilos associados ao tecido tumoral.

Comparar os dados deste estudo com evolução clínica e prognóstico dos animais, assim como avaliar outros fatores, como o tamanho do tumor, para saber se há influência na quantidade e ação dos eosinófilos associados ao mastocitoma, são necessários no futuro para elucidar um pouco mais a biologia desta neoplasia.

REFERÊNCIAS

1. Dobson JM, Scase TJ. Advances in the diagnosis and management of cutaneous mast cell tumors in dogs. *J Small Anim Pract* 2007; 48: 424-431.
2. Carvalho APM, Carvalho ECQ, Nardi AB, Silveira LS. Comparação de duas classificações histopatológicas com o padrão de imuno-marcação para KIT, a avaliação da proliferação celular e com a presença de mutações no *c-KIT* de mastocitomas cutâneos caninos. *Pesq Vet Bras* 2017; 37(4): 359-367.
3. Patnaik AK, Ehler WJ, MacEwen EG. Canine cutaneous mast cell tumor: morphologic grading and survival time in 83 dogs. *Vet Pathol* 1984; 21: 469-474.
4. Kiupel M, Webster JD, Bailey KL, et al. Proposal of a 2-tier histologic grading system for canine cutaneous mast cell tumors to more accurately predict biological behavior. *Vet Pathol* 2011; 48: 147-155.
5. Horta RS, Lavallo GE, Monteiro LN, Souza MCC, Cassali GD, Araújo RB. Assessment of Canine Mast Cell Tumor Mortality Risk Based on Clinical, Histologic, Immunohistochemical, and Molecular Features. *Vet Pathol* 2018; 55(2): 212-223.
6. Kiupel M, Webster JD, Kaneene JB, Miller R, Yuzbasinyan-Gurkan V. The use of KIT and tryptase expression patterns as prognostic tools for canine mast cell tumors. *Vet Pathol* 2004; 41: 371-377.

7. Welle MM, Bley CR, Howard J, Rüfenacht S. Canine mast cell tumors: a review of the pathogenesis, clinical features, pathology and treatments. *Vet Dermatol* 2008; 19: 321-339.
8. Mattioli TMF, Noronha L, Lima AAS, et al. Utilização de brocas trefina para confecção de tissue microarray. *Arch of Oral Res* 2011; 2: 161-167.
9. Webster JD, Yuzbasinyan-Gurkan V, Kaneene J, B Miller R, Resau JH, Kiupel M. The role of *c-KIT* in tumorigenesis: Evaluation in canine cutaneous mast cell tumors. *Neoplasia* 2006; 8(2): 104-111.
10. Gross TL, Ihrke P, Walder EJ, Affolter V.K. Mast cell tumors. In: Ross TL, Walder EJ, Affolter VK. ed. *Skin Diseases of the Dog and Cat: clinical and histopathological diagnosis*. 2nd ed. Oxford: Science Ltd; 2005: 853-865
11. Pardanani A, Reeder T, Li C, Tefferi A. Eosinophils are derived from the neoplastic clone in patients with systemic mastocytosis and eosinophilia. *Leuk Res* 2003; 27: 883-885.
12. Carvalho APM, Carvalho ECQ, Nardi AB, Silveira LS. Comparação de duas classificações histopatológicas com o padrão de imuno-marcação para KIT, a avaliação da proliferação celular e com a presença de mutações no *c-KIT* de mastocitomas cutâneos caninos. *Pesq Vet Bras* 2017; 37(4): 359-367.
13. Sabattini S, Scarpa F, Berlato D, Bettini G. Histologic grading of canine mast cell tumor: Is 2 better than 3?. *Vet Pathol* 2015; 52: 70-73.
14. Oliveira JMP. Aspectos patológicos do mastocitoma cutâneo canino: relação com características epidemiológicas e clínicas e seu valor prognóstico. Tese de Doutorado, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, Portugal. 2008.

CAPÍTULO 4

CONCLUSÃO/ IMPACTO E PERSPECTIVAS FUTURAS

O mastocitoma canino é uma neoplasia de alta incidência na rotina clínica, todavia seu comportamento biológico não é bem elucidado ainda. Com este estudo buscamos encontrar alguma correlação com o número de eosinófilos, que frequentemente são vistos infiltrados em amostras tumorais de mastocitoma, com fatores que possam estar relacionados ao prognóstico, ou que nos auxiliem a compreender melhor o comportamento desta neoplasia. Até o presente momento não há uma concordância geral entre autores em relação a concentração de eosinófilos no tecido tumoral, e quais fatores determinam de fato a sua concentração.

Não observamos correlação entre eosinófilos e os fatores analisados que agem como seus quimiotáticos, assim como não encontramos relação com *c-KIT*, o qual é amplamente utilizado como fator prognóstico. Nos estudos futuros pretendemos correlacionar os fatores aqui avaliados com dados clínicos e evolução neoplásica dos animais, com o intuito de determinar de determinar novas ferramentas que possam auxiliar na determinação de um prognóstico mais preciso e na melhor conduta clínica.

REFERÊNCIAS

Bae S, Milovancev M, Bartels C, Irvin VL, Tuohy JL, Townsend KL, Leeper H. Histologically low-grade, yet biologically high-grade, canine cutaneous mast cell tumours: A systematic review and meta-analysis of individual participant data. *Veterinary and Comparative Oncology*. 2020; 18: 580-589.

Caruso RA, Fedele F, Zuccalá V, Fracassi MG, Veuti A. Mast Cell and Eosinophil Interaction in Gastric Carcinomas: Ultrastructural Observations. *Anticancer Research* 2007; 27: 391-394.

Carvalho APM, Carvalho ECQ, Nardi AB, Silveira LS. Comparação de duas classificações histopatológicas com o padrão de imuno-marcação para KIT, a avaliação da proliferação celular e com a presença de mutações no *c-KIT* de mastocitomas cutâneos caninos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 2017; 37(4): 359-367.

De Nardi AB, Costa MT, Amorim RL, Vasconcelos RO, Dagli MLZ, et al. Brazilian consensus for the diagnosis, treatment and prognosis of cutaneous mast cell tumors in dogs. *Investigação*. 2018; 17(1): 01-15.

Dobson JM, Scase TJ. Advances in the diagnosis and management of cutaneous mast cell tumors in dogs. *Journal of Small Animal Practice*. 2007; 48: 424-431.

Elishmereni M, Alenius HT, Bradding P, Mizrahi S, Shikotra A, Minai-Fleminger Y, Mankuta D, Eliashar R, Zabucchi G, Levi-Schaffer F. Physical interactions between mast cells and eosinophils: a novel mechanism enhancing eosinophil survival *in vitro*. *Allergy*. 2011; 66: 376-385.

Galdiero MR, Varricchi G, Seaf M, Marone G, Levi-Schaffer F, Marone G. Bidirectional mast cell-eosinophil interactions in inflammatory disorders and cancer. *Frontiers in Medicine*. 2017; 4:103.

Galli SJ, Gaudenzio N, Tsai M. Mast cells in inflammatory and disease: recent progress and ongoing concerns. *Annual Review of Immunology*. 2020; 38: 49-77.

Gangwar RS, Friedman S, Seaf M, Levi-Schaffer F. Mast cells and eosinophils in allergy: close friends or just neighbors. *European Journal of Pharmacology*. 2016; 778: 77-83.

Giantin M, Aresu L, Benali S, Arico A, Morello EM, Martano M, Vascellari M, Castagnaro M, Lopparelli RM, Zancanella V, Granato A, Mutinelli F, Dacasto M. Expression of matrix metalloproteinases, tissue inhibitors of metalloproteinases and vascular endothelial growth factor in canine cutaneous mast cell tumors. *Journal of Comparative Pathology*. 2012; 147: 419-429.

Halova I, Draberova L, Draber P. Mast cell chemotaxis: chemoattractants and signaling pathways. *Frontiers in Immunology*. 2012; 3: 119.

Hergt F, von Bomhard W, Kent MS, Hirschberger J. Use of a 2-tier histologic grading system for canine cutaneous mast cell tumors on cytologic specimens. *Veterinary Clinical Pathology*. 2016; 45(3): 477-483.

Horta RS, Lavallo GE, Monteiro LN, Souza MCC, Cassali GD, Araújo RB. Assessment of Canine Mast Cell Tumor Mortality Risk Based on Clinical, Histologic, Immunohistochemical, and Molecular Features. *Veterinary Pathology*. 2018; 55(2): 212-223.

Hosseini E, Pedram B, Bahrami AM, Moghaddam MHJ, Javanbakht J, Ghomi FE, Moghaddam NJ, Koohestani M, Shafiee R. Cutaneous mast cell tumor (mastocytoma): cyto-histopathological and haematological investigations. *Diagnostic Pathology*. 2014; 9.

Kay AB, Stechschulte DJ, Austen KF. An eosinophil leukocyte chemotactic factor of anaphylaxis. *Journal of Experimental Medicine*. 1971; 133: 602-619.

Kiupel M, Webster JD, Bailey KL, Best S, DeLay J, Detrisac DJ, Fitzgerald SD, Gamble D, Ginn PE, Goldschmidt MH, Hendrick MJ, Howerth EW, Janovitz EB, Langohr I, Lenz SD, Lipscomb TP, Miller MA, Misdrop W, Moroff S, Mullaney TP, Neyens I, O'Toole D, Ramos-Vara J, Scase TJ, Schulman FY, Sledge D, Smedley RC, Smith K, Snyder PW, Southorn E, Stedman NL, Steficek BA, Stromberg PC, Valli VE, Weisbrode SE, Yager J, Heller J,

Miller R. Proposal of a 2-tier histologic grading system for canine cutaneous mast cell tumors to more accurately predict biological behavior. *Veterinary Pathology*. 2011; 48: 147-155.

Kiupel M, Camus M. Diagnosis and prognosis of canine cutaneous mast cell tumors. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*. 2019; 49(5): 819-836.

Klion AD, Ackerman SJ, Bochner BS. Contributions of eosinophils to human health and disease. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. 2020; 15: 179-209.

Krystel-Whittemore M, Dileepan KN, Wood JG. Mast Cell: A multi-functional master cell. *Frontiers in Immunology*. 2016; 6:620.

Mackowiack II, Gentile LB, Chaible LM, Nagamine MK, Guerra JM, Mota EFF, Matera JM, Menecier G, Sanches DS, Dagli MLZ. E-cadherin in canine mast cell tumors: decreased expression and altered subcellular localization in grade 3 tumors. *The Veterinary Journal*. 2012; 194: 405-411.

Minai-Fleminger Y, Levi-Schaffer F. Mast cells and eosinophils: the two key effector in cell allergic inflammation. *Inflammation Research*. 2009; 58: 631-638.

Misdrop E. Mast cells and canine mast cell tumors. A review. *Veterinary Quarterly*. 2004; 26: 156-169.

Patnaik AK, Ehler WJ, MacEwen EG. Canine cutaneous mast cell tumor: morphologic grading and survival time in 83 dogs. *Veterinary Pathology*. 1984; 21: 469-474.

Pavandy A, Pejler G. Novel strategies to target mast cells in disease. *Journal of Innate Immunity*. 2021; DOI: 10.1159/000513582.

Piazuelo MB, Camargo MC, Mera RM, Delgado AG, Peek Jr RM, Correa H, Schneider BG, Sicinski LA, Mora Y, Bravo LE, Correa P. Eosinophils and mast cells in chronic gastritis: possible implications in carcinogenesis. *Human Pathology*. 2008; 39(9): 1360-1369.

Rao DS, Ali IM, Annigeri RG. Evaluation of diagnostic value of AgNOR and PAP in early detection of dysplastic changes in leukoplakia and lichen planus - a preliminary case-control study. *Journal of Oral Pathology & Medicine*; 2016: 46(1): 56-60.

Romansik, EMR, Reilly CM, Kass PH, Moore PF, London CA. Mitotic index is predictive for survival for canine cutaneous mast cell tumors. *Veterinary Pathology*, 2007; 44: 335-341.

Rothenberg ME, Hogan SP. The eosinophil. *Annual Review of Immunology*. 2006; 24: 147-174.

Sabattini S, Scarpa F, Berlato D, Bettini G. Histologic grading of canine mast cell tumor: Is 2 better than 3?. *Veterinary Pathology*. 2015; 52: 70-73.

Scase TJ, Edwards D, Miller J, Henley W, Smith K, Blunden A, Murphy S. Canine mast cell tumors: Correlation of apoptosis and proliferation markers with prognosis. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 2006; 20: 151-158.

Schlieben P, Meyer A, Wiese C, Bondzio A, Einspanier R, Gruber AD, Klopffleisch R. Differences in the proteome of high-grade versus low-grade canine cutaneous mast cell tumors. *The Veterinary Journal*. 2012; 194: 210-214.

Silva EZM, Jamur MC, Oliver C. Mast cell function: A new vision of an old cell. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 2014; 62(10): 698-738.

Souza ACF, Pascoli AL, Ferreira MGPA, Reis Filho NP, Silva ICR, Santos RR, Faro AM, De Nardi AB. Mastocitoma cutâneo canino: estudo retrospectivo dos casos atendidos pelo Serviço de Oncologia do Hospital Veterinário da FCAV-Unesp, Campus Jaboticabal, de 2005 a 2015. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 2018; 38(9): 1808-1817.

Stone KD, Prussin C, Metcalfe DD. IgE, mast cells, basophils and eosinophils. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2010; 125: s73-s80.

Vascellari M, Giantin M, Capello K, Carminato A, Morello EM, Vercelli A, Granato A, Buracco P, Dacasto M, Mutinelli F. Expression of Ki67, BCL-2, and COX-2 in canine cutaneous mast cell tumor: association with grading and prognosis. *Veterinary Pathology*. 2012. 50(1): 110-121.

Webster JD, Yuzbasinyan-Gurkan V, Kaneene J, B Miller R, Resau JH, Kiupel M. The role of *c-KIT* in tumorigenesis: Evaluation in canine cutaneous mast cell tumors. *Neoplasia*. 2006; 8(2): 104-111.

Welle MM, Bley CR, Howard J, Rüfenacht S. Canine mast cell tumors: a review of the pathogenesis, clinical features, pathology and treatments. *Veterinary Dermatology*. 2008; 19: 321-339.

ANEXO 1 – Tabela com os dados individuais de cada animal utilizado no estudo.

SEXO	IDADE	RAÇA	PATNAIK	KIUEPEL	IL-5 %	VEGF %	KIT	Eosinófilos (cels/mm ²)
M	5a	Beagle	2	B	1,28	-	1	0
M	4a	N/I	1	B	5,261903	20,91958	2	0
M	15a	Daschshund	1	B	1,215264	2,451582	1	1,59
F	10a	SRD	1	B	-	16,83136	1	89,55
M	13a	SRD	3	A	0,661935	5,552157	3	0
M	6a	N/I	1	B	4,056471	7,950804	3	0
M	10a	Daschshund	1	B	7,5717	7,599354	2	0
M	Ad	SRD	1	B	2,129026	22,40982	2	6,36
M	13a	Boxer	2	A	7,913055	20,22169	2	5,38
M	Ad	Daschshund	2	B	1,578267	-	2	0
F	Ad	Boxer	2	A	2,483342	4,91647	2	0
F	Ad	SRD	1	B	4,731175	11,25628	2	83,11
F	15a	Poodle	1	B	2,009827	10,98113	1	8,07
F	11a	SRD	2	A	1,091728	17,90819	2	107,45
F	Ad	N/I	1	B	5,928679	28,45331	1	9,74
F	8a	Boxer	1	B	0,546445	36,42373	3	25,15
M	7a	Boxer	2	B	1,611496	38,26892	2	0
F	10a	SRD	1	B	4,277356	6,265993	1	37,73
F	15a	Daschshund	1	B	0,085854	13,30921	1	0
M	Ad	Schnauzer	2	B	0,894415	35,3588	2	500,39
M	3a	SRD	1	B	2,261577	13,9813	1	19,8
M	4a	Boxer	1	B	2,030595	11,9813	1	18,21
M	13a	SRD	2	B	6,334044	23,55999	2	1413,62
M	Ad	Labrador	2	A	3,216968	10,7472	2	113,12
F	10a	Fila	1	B	1,33432	6,370979	1	0
F	5a	SRD	1	B	4,51891	7,881094	1	9,72
F	13a	SRD	1	B	1,974366	8,748083	2	0
F	10a	Pastor Alemão	1	B	6,788475	45,32575	1	1705,51
M	Ad	Poodle	2	A	0,218304	46,81482	2	0
F	13a	SRD	2	B	1,254672	20,14866	2	51,81
F	10a	Pit bull	2	B	5,6348	80,9127	3	1209,58
F	12a	Pit bull	1	B	0,401586	17,04159	2	0
M	13a	Daschshund	2	B	1,599062	20,24897	3	2771,96
M	8a	Daschshund	2	A	0,131217	21,10324	3	0
F	6a	SRD	2	A	0,49248	13,77759	3	761,42
M	13a	Daschshund	2	B	0,927914	28,99233	2	50,76
M	4a	Pit bull	1	B	2,796231	29,02989	2	7,48
M	9a	Bull Terrier	1	B	1,759894	4,079389	1	5,54
F	10a	Pit bull	2	B	0,262933	-	-	0
F	8a	SRD	2	B	3,732042	5,688123	3	1428,57
M	-	SRD	2	A	1,345591	30,50917	2	62,14
F	12a	Basset	2	B	0,018819	9,222779	1	0
F	Ad	Pit bull	2	A	1,051792	2,759005	2	10,28
F	Ad	SRD	2	B	0,502378	23,70917	3	197,4
M	Ad	SRD	2	A	0,476609	4,845603	2	0

F	8a	SRD	1	B	0,292935	21,61697	2	0
M	10a	Daschshund	1	B	0,330817	6,880094	1	32,59
F	8a	Rottweiler	1	B	2,766068	15,42356	2	767,64

Ad = adulto; N/I = não informado; - = dados faltantes.

ANEXO 2 – Parecer de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR).



Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Comissão de Ética em Pesquisa no Uso de Animais

Curitiba, 09 de novembro de 2017.

PARECER DE PROTOCOLO DE PESQUISA

REGISTRO DO PROJETO: 01171 – 1ª versão

TÍTULO DO PROJETO: CORRELAÇÃO ENTRE DIFERENTES GRADUAÇÕES DE MASTOCITOMA CANINO COM IL-5 E HISTAMINA

01171 A – CORRELAÇÃO ENTRE DIFERENTES GRADUAÇÕES DE MASTOCITOMA CANINO E CONTAGEM DE EOSINÓFILOS NO TECIDO TUMORAL

01171 B – CORRELAÇÃO ENTRE DIFERENTES GRADUAÇÕES DE MASTOCITOMA CANINO COM IL-5 E HISTAMINA

01171 C – CORRELAÇÃO ENTRE GRADUAÇÕES DE MASTOCITOMA CANINO PELAS TÉCNICAS DE COLORAÇÃO HEMATOXILINA – EOSINA E AZUL DE TOLUIDINA

PESQUISADOR RESPONSÁVEL

Gervasio Henrique Bechara

EQUIPE DE PESQUISA

Nathalia Bianca Marloch Revers, Chiara Maria Thiesen Domingues de Araújo, Gabriela Della Giustina

INSTITUIÇÃO

Pontifícia Universidade Católica do Paraná

ESCOLA / CURSO

Escola de Ciências da Vida

VIGÊNCIA DO PROJETO	Novembro/2017 a Agosto/2018	QUANTIDADE DE ANIMAIS	150
ESPECIE/LINHAGEM	<i>Canis lupus familiaris</i>	Nº SISBIO (Somente animais de vida livre)	Não se aplica
SEXO	M/F	ATIVIDADES (Somente animais de vida livre)	Não se aplica
IDADE / PESO	DADOS JÁ COLETADOS	ESPECIE – GRUPO TAXONÔMICOS (de vida livre)	Não se aplica
ORIGEM DO ANIMAL	Pesquisas Anteriores	LOCAL (IS) (Somente animais de vida livre)	Não se aplica

O colegiado da CEUA certifica que este protocolo que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto homem), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794/2018 e Decreto nº 6.899/2009, e com as normas editadas pelo CONCEA e foi **APROVADO** pela CEUA - PUCPR em reunião de colegiado.

Se houver mudança do protocolo o pesquisador deve enviar um relatório á CEUA descrevendo de forma clara e sucinta, a parte do protocolo a ser modificado e as suas justificativas.

Se a pesquisa, ou parte dela for realizada em outras instituições, cabe ao pesquisador não iniciar antes de receber a autorização formal para a sua realização.

Rua Imaculada Conceição, 1155 Prado Velho CEP 80.215-901 Curitiba Paraná Brasil
Telefone: (41) 3271-2292 www.pucpr.br



Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Comissão de Ética em Pesquisa no Uso de Animais

O documento que autoriza o início da pesquisa deve ser carimbado e assinado pelo responsável da instituição e deve ser mantido em poder do pesquisador responsável, podendo ser requerido por esta CEUA em qualquer tempo.

Atenciosamente,

Prof. Carlos Eduardo Camargo

Coordenador Adjunto

Comissão de Ética no Uso de Animais

Rua Imaculada Conceição, 1155 Prado Velho CEP 80.215-901 Curitiba Paraná Brasil
Telefone: (41) 3271-2292 www.pucpr.br

ANEXO 3 – Normas de redação de manuscrito da revista Pesquisa Veterinária Brasileira.

Disponível em: <http://www.pvb.com.br/portal/normas>

1. Organize the article in TITLE, ABSTRACT, RESUMO, INTRODUCTION, MATERIALS AND METHODS, RESULTS, DISCUSSION, CONCLUSION(S) (the last three preferably as separate chapters), Acknowledgements, Conflict of interest statement, and REFERENCES:

- a. The TITLE should be concise and indicate the content of the article; inform details of scientific identification in the MATERIALS AND METHODS.
- b. Names of authors with several first and family names should be shortened, e.g., simplify Claudio Severo Lombardo de Barros to Claudio S.L. Barros or Barros C.S.L.

The corresponding Author should be one who guarantees contact with the Editorial Board of PVB. Elevate once more the asterisks for the call to the footnotes, so they appear larger.

- c. The Heading of the ABSTRACT should contain the shortened and inverted names of the authors, the year, the title [in brackets when translated], and the postal address of the laboratory or institution where the main part of the research was done (Always compare the authors of the paper and their listing in the Heading of the Abstract to avoid discrepancies).
- d. The footnote of the first page should contain the complete professional address of each Author (in the language of the Author's country where to correspondence could be posted, Portuguese, Spanish, English, etc.) as well as the underlined e-mail of the corresponding Author.
- e. The ABSTRACT should be a well-explained version of the Portuguese RESUMO, followed by "INDEX TERMS," which should include terms of the title, as they are not only Additional Index Terms.
- f. The RESUMO should contain (1) the title [within brackets and in bold type (2) what has been investigated, indicating (2) materials and methods used, (3) the most important results, and (4) the conclusion, followed by "TERMOS DE INDEXAÇÃO" (which also include words of the title, as they are not only Additional Index Terms).
- g. The INTRODUCTION must be short, with citation of the specific literature, followed by the research's objective.

- h. In MATERIALS AND METHODS, provide all data necessary to repeat the study.
- i. In RESULTS presented the data obtained in a concise form.
- j. In DISCUSSION, confront the results with the literature. Avoid mentioning research development or future planning to avoid the journal's commitment to publish the results.
- k. Base the CONCLUSIONS only on your results.
- l. Do not mention Acknowledgements in the text or footnotes, but after CONCLUSIONS.
- m. State any conflict of interest or "none" if it is the case.
- n. The REFERENCES should include all citations consulted and presented chronologically in the text. Write the list of References in alphabetical and chronological order, beginning with the first author's family name, followed by all other authors of the respective reference, in high and low case letters. Each Author divided only by a comma, followed by the year, title, and the data of the publication (extensively in case of doubt about abbreviation), according to www.pvb.com.br.

2. The style of the journal has to be met, as follows:

- a. Font Cambria at 10 pitch, simple space between lines; page format A4, with 2cm margins (superior, inferior, left and right), text in one column justified. Place Figure captions below the list of Reference List; do not repeat the captions along with the images of the Figures. Submit Figures and Tables separately.
- b. ABSTRACT and RESUMO are written in only one paragraph and should not contain references.
- c. The articles should be concise, always when possible in past tense and impersonal.
- d. The scientific names should be presented in full (p.ex. *Palicourea marcgravii*) at the beginning of each chapter (Title, Abstract, Resumo, Introduction, etc.) when they appear for the first time, followed with abbreviation of the genus (p.ex. *P. marcgravii*).
- e. In the Title of Tables and Figure captions, write the scientific names in full.
- f. In the text, calls to footnotes are given in Arabic numbers, in crescent order through the whole paper, without using "Insert final note" of Word. Note: Don't use spaces between numbers and their units to avoid separate them into two

lines (p.ex.: 100ppm, 10mm, 50cm, 18x10cm, $P < 0.05$. The abbreviation for the number is “n°” and not “nº”; for degree Celsius “°C” and not “ºC”.

- g. Tables and Figures should be cited in the text with their respective numbers in crescent order.
- h. Abbreviations of institutions, when presented for the first time, should be put within parentheses after the institution's full name.
- i. Citations of the literature in the text are given by "author and year" (p.ex. Caldas 2005). Cite papers with two authors using the two names (p.ex. Pedroso & Pimentel 2013.) Cite papers with more than two authors in the text by the first Author's name followed by "et al." and the year (p.ex. Brito et al. 2015). If two articles' citation is identical, make the distinction by adding small letters after the year of publication (p.ex. Barros 2017a, 2017b). The citation order in the text should be chronological (p.ex. Barbosa et al. 2003, Armién et al. 2004).
- j. Consult the full text of all cited articles; if not possible, cite the original reference in the manuscript text as, p.ex., Bancroft (1921); and then, in the List of References, it should appear as Bancroft 1921. title. ... journal (Apud Suvarna & Layton 2013). Also, include this in-full-consulted reference in the List of References.
- k. The use of “personal communication” and “unpublished data” should be exceptional and cited in the text as Author and Year (Barbosa 2016), and in the List of References as p.ex. Barbosa 2016. Personal Communication (Universidade Federal do Pará, campus Castanhal, Brazil).
- l. Figure captions (p.ex. "Fig.3.") should be sufficiently informative for understanding (because Figures are independent of the text).
- m. Title of Tables should be written in bold, and the Heading (titles of the columns) should be in clear (not bold), written in high and low case letters, and separated by two long horizontal lines. There are no vertical lines and no grey bottom; exceptionally can exist horizontal lines. The calls for footnotes should be in small letters or other signs, but not in Arabic numbers. Tables should be submitted in Word (not as images) to allow corrections according to the journal's style.

- n. Submit complex data should as graphics (but referred to as Figures) in 2D without grey bottom and horizontal lines. Write graphics, including text, with Cambria at 10 pitch.

3. Figure presentation:

- a. Format and dimension: Images must be in TIF format, RGB channel, 85 mm long, and 300 dpi resolution (pixel/inch) for color figures and 600 dpi (pixel/inch) for black & white figures (graphics and maps).
- b. Numbering: The figures must be named separately and identified only by numbers in the order they are cited in the text (Fig. 1, Fig. 2, Fig. 3, etc.). Do not use letters (Fig. 1A, 1B, 1C, etc.) to identify the figures.
- c. Identification of structures: If it is necessary to highlight specific structures within the image, use font "Cambria 8 points", black or white, or black or white arrows depending on the background of the figure.
- d. Micrographs: scale bars are not mandatory.
- e. Figure legends: Each figure must have a self-explanatory legend. It should contain what is in the image, followed by additional information (Example of figure legend format: Fig.1. Description of the image. Diagnosis, organ or tissue, animal species, case number. Histochemical (HE, PAS, etc.) or immunohistochemical (vimentin, etc.) method. When describing aspects of immunohistochemistry, use the term "immunolabeling" instead of "staining" or "positive." Indicate where "immunolabeling" occurred (nuclear, cytoplasmic, and membranous) and to what extent. Place Figure legends should appear in the main manuscript, after References.

4. All references cited in the text should be included in the List of References. Before submitting the paper, discrepancies have to be corrected by the Author. The system ScholarOne blocks automatically if such disparities exist). Examples for References:

○ Articles published in scientific journals:

- Ubiali D.G., Cruz R.A., De Paula D.A., Silva M.C., Mendonça F.S., Dutra V., Nakazato L., Colodel E.M. & Pescador C.A. 2013. Pathology of nasal infection caused by *Conidiobolus lamprauges* and *Pythium insidiosum* in sheep. J. Comp. Pathol. 149(2/3):137-145.
- Hooiveld M., Smit L.A., Wouters I.M., Van Dijk C.E., Spreeuwenberg P., Heederik D.J. & Yzermans C.J. 2016. Doctor-diagnosed health problems

in a region with a high density of concentrated animal feeding operations: a cross-sectional study. Environ. Health 17:15-24.(Note: The first letters of the words in the title of papers published in journals are small. It is preferable to indicate the number of the respective issue.)

○ Books:

- Marsh P. & Martin M. 1992. Oral Microbiology. 3rd ed. Chapman and Hall, London, p.167-196.
- Tokarnia C.H., Brito M.F., Barbosa J.D., Peixoto P.V. & Döbereiner J. 2012. Plantas Tóxicas do Brasil para Animais de Produção. 2ª ed. Helianthus, Rio de Janeiro, p.305-348.(Note: The first letter in the words of the title of books should be capital.)

○ Chapters of books:

- Uzal F.A., Plattner B.L. & Hostetter J.M. 2016. Alimentary system, p.1-257. In: Maxie M.G. (Ed.), Jubb, Kennedy and Palmer's Pathology of Domestic Animals. Vol.2. 6th ed. Elsevier, St Louis, Missouri.
- Barros C.S.L. 2007. Doenças víricas: leucose bovina, p.159-169. In: Riet-Correa F., Schild A.L., Lemos R.A.A. & Borges J.R.J. (Eds), Doenças de Ruminantes e Equídeos. Vol.1. 3ª ed. Pallotti, Santa Maria, RS.
- Tokarnia C.H., Brito M.F., Barbosa J.D., Peixoto P.V. & Döbereiner J. 2012. Plantas que afetam o funcionamento do coração, p.27-94. In: Ibid. (Eds), Plantas Tóxicas do Brasil para Animais de Produção. 2ª ed. Helianthus, Rio de Janeiro.

○ Dissertations and Theses:

- Rech R.R. 2007. Alterações no encéfalo de bovinos submetidos à vigilância das encefalopatias espongiformes transmissíveis. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria. 228p.(Note: Use articles which originated from dissertations or theses instead of these).

○ Abstracts published in Events:

- Massa A.T., Potter K.A. & Bradway D. 2016. Epizootic bovine abortion outbreak in Eastern Nevada cattle. Annual Meeting American College of Veterinary Pathologist (ACVP), New Orleans, Louisiana. (Abstract D-50)

- Mendonça F.S., Almeida V.M., Albuquerque R.F., Chaves H.A.S., Silva Filho G.B., Braga T.C., Lemos B.O. & Riet Correa F. 2016. Paralisia laríngea associada à deficiência de cobre em caprinos no semiárido de Pernambuco (IX Endivet, Salvador, BA). *Pesq. Vet. Bras.* 36(Supl.2):50-51. (Resumo)
- Pierezan F., Lemos R.A.A., Rech R.R., Rissi D.R., Kommers G.D., Cortada V.C.L.M., Mori A.E. & Barros C.S.L. 2007. Raiva em equinos. *Anais XIII Encontro Nacional de Patologia Veterinária, Campo Grande, MS*, p.145-146. (Resumo)(Note: Consult entire papers instead of only Abstracts)

ANEXO 4 – Normas de redação de manuscrito da revista Veterinary Comparative Oncology. Disponível em: [http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/\(ISSN\)1476-5829/homepage/ForAuthors.html](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/(ISSN)1476-5829/homepage/ForAuthors.html)

Manuscripts must be submitted as a Word or rtf file and should be written in English. The manuscript should be submitted in separate files: title page; main text file; figures.

Title page

The title page should contain:

- (i) a short informative title that contains the major key words. The title should not contain abbreviations (see Wiley's [best practice SEO tips](#));
- (ii) a short running title of less than 40 characters;
- (iii) the full names of the authors;
- (iv) the author's institutional affiliations at which the work was carried out;
- (v) acknowledgements.

The present address of any author, if different from that where the work was carried out, should be supplied in a footnote.

Authorship

Please refer to the journal's authorship policy the Editorial Policies and Ethical Considerations section for details on eligibility for author listing.

Acknowledgements

Contributions from anyone who does not meet the criteria for authorship should be listed, with permission from the contributor, in an Acknowledgments section. See section on Authorship for more detail. Financial and material support should also be mentioned. Thanks to anonymous reviewers are not appropriate.

Conflict of Interest Statement You will be asked to disclose conflicts of interest during the submission process. See the section 'Conflict of Interest' in the Editorial Policies and Ethical Considerations section for details on what to include in this section. Please ensure that you liaise with all co-authors to confirm agreement with the final statement. The Conflict of Interest statement should be included within the main text file of your submission.

Conflict of Interest Statement

You will be asked to provide a conflict of interest statement during the submission process. See the section 'Conflict of Interest' in the Editorial Policies and Ethical Considerations section for details on what to include in this section. Please ensure you liaise with all co-authors to confirm agreement with the final statement.

Cell Line Validation Statement

VCO strongly encourages authors to validate all cell lines used in the research submitted to the journal. All original research submissions must include a cell line validation statement even if validation testing has not been conducted (i.e. a null statement). VCO requests that authors detail what validation testing they have conducted, if any, in their validation statement. If validation testing has not been conducted, the reasons for this should be clearly stated in the validation statement. This statement should be provided in the Materials and Methods section of your manuscript under the heading, 'Cell Line Validation Statement'.

Main Text

As papers are double-blind peer reviewed the main text file should not include any information that might identify the authors.

The main text file should be presented in the following order: (i) title, author information, disclaimers, source(s) of support, word count, number of figures and tables, conflict of interest declaration, (ii) abstract and key words, (iii) introduction, (iv) methods, (v) results (vi) discussion, (vii) references, (viii) tables, (ix) illustrations (figures). Figures and supporting information should be supplied as separate files.

For further guidance on the content and style of the introduction, materials and methods, results and discussion, please follow the International Committee of Medical Journal Editors (ICJME) Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical

Journals: <http://www.icmje.org/recommendations/browse/manuscript-preparation/preparing-for-submission.html>

Editorials, Short Communications and Letters to the Editor should be written in continuous prose with appropriate references, figures and tables as required.

Abstract

Please provide an abstract of no more than 250 words.

Keywords

Please provide 3-6 keywords and list them in alphabetical order. Keywords should be taken from those recommended by the US National Library of Medicine's Medical Subject Headings (MeSH) browser list at <https://www.nlm.nih.gov/mesh/>.

References

All references should be numbered consecutively in order of appearance and should be as complete as possible. In text citations should cite references in consecutive order using Arabic superscript numerals. For more information about AMA reference style please consult [this guide](#), or the [AMA Manual of Style](#) website.

Sample references follow:

Journal Article (1-6 authors)

1. King VM, Armstrong DM, Apps R, Trott JR. Numerical aspects of pontine, lateral reticular, and inferior olivary projections to two paravermal cortical zones of the cat cerebellum. *J Comp Neurol* 1998;390:537-551.

Journal Article (more than 6 authors)

2. Barrett LE, Skorupski K, Brown DC, et al. Outcome following treatment of feline gastrointestinal mast cell tumours. *Vet Comp Oncol* 2018;16(2):188-193.

Entire Book

3. McKenzie BC. Medicine and the Internet: Introducing Online Resources and Terminology. 2nd ed. New York, NY: Oxford University Press; 1997.

Book Chapter

4. Guyton JL, Crockarell JR. Fractures of acetabulum and pelvis. In: Canale ST, ed. Campbell's Operative Orthopaedics. 10th ed. Philadelphia, PA: Mosby, Inc; 2003:2939-2984.

Internet Document

5. American Cancer Society. Cancer Facts & Figures 2003. <http://www.cancer.org/downloads/STT/CAFF2003PWSecured.pdf> Accessed March 3, 2003

Tables

Tables should be self-contained and complement, but not duplicate, information contained in the text. They should be supplied as editable files, not pasted as images. Legends should be concise but

comprehensive – the table, legend and footnotes must be understandable without reference to the text. All abbreviations must be defined in footnotes. Footnote symbols: †, ‡, §, ¶, should be used (in that order) and *, **, *** should be reserved for P-values. Statistical measures such as SD or SEM should be identified in the headings.

Figure Legends

Legends should be concise but comprehensive – the figure and its legend must be understandable without reference to the text. Include definitions of any symbols used and define/explain all abbreviations and units of measurement.

Preparing Figures

Although we encourage authors to send us the highest-quality figures possible, for peer-review purposes we are happy to accept a wide variety of formats, sizes, and resolutions.

[Click here](#) for the basic figure requirements for figures submitted with manuscripts for initial peer review, as well as the more detailed post-acceptance figure requirements.

Colour figures: Figures submitted in colour may be reproduced in colour online free of charge. Please note, however, that it is preferable that line figures (e.g. graphs and charts) are supplied in black and white so that they are legible if printed by a reader in black and white. If you wish to have figures printed in colour in hard copies of the journal, a fee will be charged by the Publisher.

Please submit a [Colour Work Agreement Form](#) if figure should be colour in print.

Please post or courier your completed form to:

Customer Services (OPI)
John Wiley & Sons Ltd,
European Distribution Centre
New Era Estate
Oldlands Way
Bognor Regis
West Sussex PO22 9NQ

Appendices

Appendices will be published after the references. For submission they should be supplied as separate files but referred to in the text. Supporting Information

Supporting Information

Supporting information is information that is not essential to the article but that provides greater depth and background. It is hosted online, and appears without editing or typesetting. It may include tables, figures, videos, datasets, etc. [Click here](#) for Wiley's FAQs on supporting information.

Note, if data, scripts or other artefacts used to generate the analyses presented in the paper are available via a publicly available data repository, authors should include a reference to the location of the material within their paper.