

UNIVERSIDADE PAULISTA

IURI SALLES BORELLI

**AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS ESTROMAIS MICROAMBIENTAIS COMO
INDICADORES DO COMPORTAMENTO BIOLÓGICO EM MASTOCITOMAS
CUTÂNEOS CANINOS**

SÃO PAULO

2025

IURI SALLES BORELLI

**AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS ESTROMAIS MICROAMBIENTAIS COMO
INDICADORES DO COMPORTAMENTO BIOLÓGICO EM MASTOCITOMAS
CUTÂNEOS CANINOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista - UNIP, para a obtenção do título de Mestre em Patologia Ambiental e Experimental, sob orientação do Prof. Dr. José Guilherme Xavier.

**SÃO PAULO
2025**

Borelli, Iuri Salles.

Avaliação de parâmetros estromais microambientais como indicadores do comportamento biológico em mastocitomas cutâneos caninos / Iuri Salles Borelli. - 2025.

87 f. : il. color. + CD-ROM.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista, São Paulo, 2025.

Área de concentração: Patologia.

Orientador: Prof. Dr. José Guilherme Xavier.

1. CAFs.
 2. Imunomarcação.
 3. Oncologia veterinária.
 4. Prognóstico.
 5. TAMs
- I. Xavier, José Guilherme (orientador).

II. Título.

IURI SALLES BORELLI

**AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS ESTROMAIS MICROAMBIENTAIS COMO
INDICADORES DO COMPORTAMENTO BIOLÓGICO EM MASTOCITOMAS
CUTÂNEOS CANINOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista - UNIP, para a obtenção do título de Mestre em Patologia Ambiental e Experimental, sob orientação do Prof. Dr. José Guilherme Xavier.

Aprovado em:

BANCA EXAMINADORA

_____ / ____ / _____

_____ / ____ / _____

_____ / ____ / _____

Dedicatória

Dedico este trabalho, primeiramente, à minha mãe, que durante todos esses anos esteve ao meu lado, me apoiando e me concedendo todo possível, e até o impossível, para que eu não desistisse até encontrar o que realmente amava fazer. Por me preencher diariamente com ensinamentos tão valiosos sobre a vida, que nenhuma escola seria capaz de proporcionar. Você sempre será minha principal fonte de energia, inspiração e amor.

À minha falecida avó, por me mostrar desde cedo a importância dos estudos e principalmente, a beleza, embora desafiadora, arte de ser um professor.

À minha namorada, Paula Beatriz Argese Sugimoto, por ser uma parceira tão completa, apesar de tão jovem. Obrigado por todo seu carinho, compreensão, apoio e amor durante todos esses anos. Sem você, toda essa jornada não teria a menor graça.

Às minhas filhas felinas Kiki, Kaia, e Matilda, por aguentarem minhas tóxicas demonstrações de afeto e por terem me escolhido como o humano agraciado com oportunidade de acompanhar as suas vidinhas tão preciosas.

Às minhas amadas professoras Cris Lopes, Silvia Regina Kleeb e Michele Venturini, por serem minhas fontes de inspiração inestimáveis. Vocês foram e sempre serão minhas modelos, minhas metas de profissionalismo e empatia. Se hoje tenho a oportunidade de estar aqui, foi tudo graças a vocês, que despertaram em mim a ânsia de um dia ser para alguém, pelo menos um pouquinho do que vocês representam para mim.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. José Guilherme Xavier pela orientação, paciência, apoio, dedicação e amizade, que tornaram esse trabalho possível.

Ao meu querido amigo Prof. M. Breno Salzedas pela dedicação do seu tempo em prol da qualidade do trabalho, por todo suporte e parceria.

Às minhas amigas Giovanna Damiani, Débora Matias, Beatriz Gazzola, Camila Bento, Renata Dutra e Isabella Monteiro pelo incentivo, companheirismo e por todos os momentos divertidos compartilhados.

À UNIP, pela oportunidade e estrutura oferecida.

Ao Hospital Veterinário Vet Popular, pela concessão das amostras.

À Capes pela bolsa concedida.

A todos os docentes do programa de pós-graduação da Universidade Paulista por compartilharem todo o conhecimento tão valioso.

A todos meus queridos colegas que tive a oportunidade de conhecer durante o curso.

Aos meus amigos do Centro Odontológico Veterinário Odontovet por todo auxílio e disponibilidade.

Ao Paulo Vedovato pela histotécnica.

ABSTRACT. - [Evaluation of Microenvironmental Stromal Parameters as Indicators of Biological Behavior in Canine Cutaneous Mast Cell Tumors].

Cutaneous mast cell tumor (MCT) is the most common malignant skin neoplasm in dogs and frequently exhibits regional lymph node dissemination. Although histopathological grading remains the primary prognostic tool, it does not fully capture the clinical and biological heterogeneity of the disease. In this context, stromal components of the tumor microenvironment have emerged as promising targets for prognostic refinement. In the present study, 31 canine cutaneous MCT samples and their corresponding regional lymph nodes were histologically evaluated, with lymph nodes classified according to the presence or absence of metastatic colonization. These findings were correlated with stromal parameters, including collagen deposition assessed by Masson's trichrome staining, and the presence of tumor-associated macrophages (TAMs) and myofibroblasts, quantified by immunohistochemistry. Nodal dissemination was more frequent in high-grade tumors. Tumors with lymph node colonization exhibited significantly higher populations of TAMs and myofibroblasts compared to non-metastatic cases (unpaired Student's t-test, $p < 0.05$). No significant differences in TAMs or myofibroblasts were observed between histological grades. Collagen deposition index showed no statistical association with any evaluated parameter. These findings reinforce previous reports demonstrating the influence of stromal components on neoplastic behavior and highlight their potential utility as prognostic markers and therapeutic targets.

Keywords: CAFs; immunohistochemistry; veterinary oncology; prognosis; TAMs

RESUMO. - [Avaliação de parâmetros estromais microambientais como indicadores do comportamento biológico em mastocitomas cutâneos canino]. O mastocitoma cutâneo é a neoplasia maligna cutânea mais comum em cães, apresentando frequente disseminação para linfonodos regionais. Embora a graduação histopatológica seja o principal instrumento prognóstico, isoladamente não é capaz de contemplar integralmente a heterogeneidade clínica e biológica observada na doença. Nesse cenário, componentes estromais do microambiente tumoral surgem como alvos promissores para o aprimoramento prognóstico. Neste estudo foram avaliadas histopatologicamente 31 amostras de mastocitomas cutâneos caninos, diagnosticadas e graduadas e os respectivos linfonodos, classificados quanto a presença ou não de colonização metastática, correlacionando-os à parâmetros estromais: deposição colagênica em cortes corados pelo tricrômico de Masson, presença de macrófagos associados ao tumor (TAMs) e de miofibroblastos, ambos por meio de imunomarcação. A disseminação nodal foi mais frequente em cães portadores de mastocitomas cutâneos de alto grau de malignidade. Identificou-se incremento na população de TAMs e de miofibroblastos nos mastocitomas cutâneos que desenvolveram colonização nodal em relação aos que não apresentaram disseminação (teste T de Student, não pareado, $p<0,05$). Não houve diferença estatística entre TAMs e miofibroblastos relacionada ao grau de malignidade tumoral. Já o índice de deposição colagênica não apresentou significância estatística em relação a nenhum dos parâmetros avaliados. Tais achados ratificam dados da literatura, evidenciando a influência de componentes estromais sobre o comportamento neoplásico e sua potencial utilidade como parâmetros prognósticos e alvos terapêuticos.

Palavras-chave: CAFs; imunomarcação; oncologia veterinária; prognóstico; TAMs.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Estadiamento da OMS para mastocitomas cutâneos caninos baseado em critérios clínicos segundo Owen, 1980.

Figura 2. Protocolo de graduação histopatológica para mastocitomas cutâneos segundo Kiupel *et al*, 2010.

Figura 3. Frequência das raças de cães acometidas por mastocitoma cutâneo provenientes de Hospitais Veterinários localizados na cidade de São Paulo no período de 2023 e 2025.

Figura 4. Proporção de machos e fêmeas acometidos por mastocitoma cutâneo provenientes de Hospitais Veterinários localizados na cidade de São Paulo no período de 2023 e 2025.

Figura 5. Frequência das faixas etárias de cães acometidos por mastocitoma cutâneo provenientes de Hospitais Veterinários localizados na cidade de São Paulo no período de 2023 e 2025.

Figura 6. Frequência de cães de porte pequeno e médio acometidos por mastocitoma cutâneo segundo a classificação etária, provenientes de Hospitais Veterinários localizados na cidade de São Paulo no período de 2023 e 2025.

Figura 7. Frequência de cães de porte grande e gigante acometidos por mastocitoma cutâneo segundo a classificação etária, provenientes de Hospitais Veterinários localizados na cidade de São Paulo no período de 2023 e 2025.

Figura 8. Proporção das regiões anatômicas comprometidas por mastocitomas cutâneos provenientes de Hospitais Veterinários localizados na cidade de São Paulo, no período de 2023 e 2025.

Figura 9. Proporção de mastocitomas cutâneos graduados em baixo e alto grau segundo o protocolo estabelecido por Kiupel *et al*. (2010) provenientes de Hospitais Veterinários localizados na cidade de São Paulo, no período de 2023 e 2025.

Figura 10. Proporção de linfonodos classificados segundo o protocolo de Weishaar *et al*. (2014) provenientes de Hospitais Veterinários localizados na cidade de São Paulo, no período de 2023 e 2025

Figura 11. Proporção da classificação nodal nos casos graduados como baixo grau, provenientes de Hospitais Veterinários localizados na cidade de São Paulo, no período de 2023 e 2025.

Figura 12. Proporção da classificação nodal nos casos graduados como alto grau provenientes de Hospitais Veterinários localizados na cidade de São Paulo, no período de 2023 e 2025.

Figura 13. Fotomicrografia de corte histológico de mastocitoma de baixo grau, HN0, evidenciando a menor celularidade e o discreto pleomorfismo citonuclear. Hematoxilina-eosina, objetiva 40x

Figura 14. Fotomicrografia de corte histológico de mastocitoma de alto grau, HN3, evidenciando abundante colonização por mastócitos neoplásicos com intensa atipia citonuclear. Hematoxilina-eosina, objetiva 40x

Figura 15. Fotomicrografia de corte histológico de mastocitoma de baixo grau, HN0, evidenciando disposição de macrófagos positivos para iba-1, entre grupos de células neoplásicas. DAB contracorada com hematoxilina, objetiva 60x.

Figura 16. Fotomicrografia de corte histológico de mastocitoma de alto grau, HN3, evidenciando disposição de macrófagos positivos para iba-1, entre grupos de células neoplásicas. DAB contracorada com hematoxilina, objetiva 60x.

Figura 17. Fotomicrografia de corte histológico de mastocitoma de baixo grau, HN0, evidenciando disposição de miofibroblasto positivo para actina de músculo liso, entre grupos de células neoplásicas. DAB contracorada com hematoxilina, objetiva 60x.

Figura 18. Fotomicrografia de corte histológico de mastocitoma de alto grau, HN3, evidenciando disposição de miofibroblastos positivos para actina de músculo liso, entre grupos de células neoplásicas. DAB contracorada com hematoxilina, objetiva 60x.

Figura 19. Quantificação macrofágica em cães portadores de mastocitomas cutâneos de baixo e alto grau de malignidade, a partir de cortes submetidos à imunomarcação com anticorpo iba1, evidenciando ausência de diferença estatisticamente significante entre os grupos, $p>0,05$ ($n=14$).

Figura 20. Quantificação miofibroblástica em cães portadores de mastocitomas cutâneos de baixo e alto grau de malignidade, a partir de cortes submetidos à imunomarcação com anticorpo para alfa actina de músculo liso, evidenciando ausência de diferença estatisticamente significante entre os grupos, $p>0,05$ ($n=12$).

Figura 21. Quantificação macrofágica em cães com linfonodos estadiados e classificados em metastáticos ou não metastáticos, a partir de cortes submetidos à imunomarcação com anticorpo iba1, evidenciando presença de diferença estatisticamente significante entre os grupos, $p<0,05$ ($n=10$).

Figura 22. Quantificação miofibroblástica em cães com linfonodos estadiados e classificados em metastáticos ou não metastáticos, a partir de cortes submetidos à imunomarcação com anticorpo para alfa actina de músculo liso, evidenciando presença de diferença estatisticamente significante entre os grupos, $p<0,05$ ($n=9$).

Figura 23. Fotomicrografia de corte histológico de mastocitoma de baixo grau, evidenciando delicada deposição de fibras colágenas coradas em azul, em meio a agregados de células neoplásicas. Tricrômico de Masson, objetiva 40x

Figura 24. Quantificação percentual da deposição colagênica em cães portadores de mastocitomas cutâneos de baixo e alto grau de malignidade, a partir de cortes submetidos a coloração histoquímica por tricrômico de Masson, evidenciando ausência de diferença estatisticamente significante entre os grupos, $p>0,05$ ($n=10$).

Figura 25. Quantificação percentual da deposição colagênica em cães com linfonodos estadiados e classificados em metastáticos ou não metastáticos, a partir de cortes submetidos a coloração histoquímica por tricrômico de Masson, evidenciando ausência de diferença estatisticamente significante entre os grupos, $p>0,05$ ($n=10$).

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 . Painel de marcadores imuno-histoquímicos.

Quadro 2. Dados clínicos, localização e graduação histopatológica das neoplasias primárias e dos linfonodos avaliados.

LISTA DE ABREVIATURAS

- APCs – Células Apresentadoras de Antígenos
CAFs – Fibroblastos Associados ao Câncer
DNMTs – DNA-metiltransferases
ECM – Matriz Extracelular
EMT – Transição Epitélio-Mesenquimal
FAP – Proteína de Superfície de Fibroblastos
FNAC – Punção Aspirativa por Agulha Fina
HE - Hematoxilina e Eosina
HPF - Campo de Grande Aumento
Iba1 – Anticorpo pan-macrofágico
MI - Índice Mitótico
MHC II – Complexo de Histocompatibilidade de Classe II
MMPs – Metaloproteinases
RNS – Espécies Reativas de Nitrogênio
ROS – Espécies Reativas de Oxigênio
TACS – Assinaturas de Colágeno Associadas a Tumores
TAMs – Macrófagos Associados ao Câncer
TIMPs – Inibidores de Metaloproteinases
TLRs – Receptores Toll-Like
TNF – Fator de Necrose Tumoral
TNM – Tumor Nodo Metástase
TME – Microambiente Tumoral
VEGF – Fator de Crescimento Endotelial Vascular
α-SMA – Fibroblastos positivos para Alfa-Actina de Músculo Liso

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 Mastocitoma Cutâneo em Cães	15
2.1.2 Aspectos Clínicos	17
2.1.3 Diagnóstico	19
2.1.4 Aspectos Histológicos	20
2.1.5 Graduação Histopatológica	21
2.1.6 Estadiamento Tumoral	25
2.1.7 Tratamento	26
2.1.8 Marcadores Prognósticos.....	28
2.2 Oncogênese e Microambiente Tumoral	31
2.3 Fibroblastos Associados ao Câncer e Colágeno	35
2.4 Macrófagos Associados ao Câncer	39
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	44
3.1 Amostras	44
3.2 Avaliação histopatológica	45
3.3 Avaliação histoquímica - tricrômico de Masson.....	45

3.4 Procedimento imuno-histoquímico.....	46
3.5 Tratamento Estatístico	48
4. RESULTADOS	48
5. DISCUSSÃO.....	61
6. CONCLUSÃO.....	69
REFERÊNCIAS.....	70

1. INTRODUÇÃO

As neoplasias cutâneas representam uma parcela importante das doenças tumorais caninas, sendo o mastocitoma cutâneo a mais prevalente em cães, compreendendo aproximadamente 20-25% dos tumores de pele na espécie. Proveniente das células mastocitárias, a doença apresenta um comportamento biológico e clínico altamente heterogêneo que nem sempre reflete sua graduação histopatológica, com frequente disseminação para linfonodos regionais. Apesar do tratamento cirúrgico em muitos casos se mostrar eficaz e resolutivo, surgem limitações quando do diagnóstico tardio, especialmente pela dificuldade em se alcançar margens cirúrgicas livres, o que implica em procedimentos mais mutilantes, lesões recorrentes e fomento ao potencial metastático.

Uma fração de cães com tumores classificados como de baixo grau, frequentemente apresenta lesões mais agressivas do que o esperado para essa categoria, reforçando a necessidade de parâmetros adicionais que aumentem a precisão prognóstica.

Nos últimos anos, a compreensão sobre o papel do microambiente tumoral na progressão neoplásica, influenciando seu crescimento, invasão, angiogênese, escape imune e metástase tem avançado substancialmente possibilitando a identificação de biomarcadores que possam auxiliar na estimativa da evolução tumoral.

Os macrófagos associados ao câncer (TAMs) são células plásticas originadas de monócitos circulantes ou de macrófagos residentes, capazes de adquirir dois fenótipos distintos, M1 e M2, dos quais o último destaca-se como a população imune inata predominante no microambiente tumoral, relacionando-se a diversos fatores vinculados à indução e progressão tumoral, favorecendo processos como angiogênese, imunossupressão e disseminação metastática.

Já os fibroblastos associados ao câncer (CAFs) são fibroblastos modulados fenotipicamente no microambiente tumoral, adquirindo plasticidade funcional, aumento da atividade secretora e contrátil, vinculados a deposição e remodelação de componentes da matriz extracelular, contribuindo para a formação de um estroma

desmoplásico, rígido e denso, associando-se predominantemente a ações pró-tumorigênicas.

A matriz extracelular, por sua vez, especialmente o colágeno, desempenha papel estrutural e funcional relevante na progressão tumoral. Alterações em sua densidade, composição e na organização das fibras colagênicas, modulam processos biológicos e moleculares como adesão, motilidade celular e elasticidade tecidual, estabelecendo relação direta com a agressividade biológica da doença oncológica.

Dessa forma, alterações quantitativas desses marcadores, uma vez justificadas e compreendidas, podem contribuir com informações importantes sobre a evolução desses processos.

Nesse sentido, o presente estudo tem por objetivo comparar os TAMs, os miofibroblastos (CAFs) e a deposição colagênica, com a graduação histopatológica, e a presença ou ausência de metástases linfonodais em mastocitomas cutâneos caninos, visando identificar possíveis associações destes parâmetros com a progressão da doença.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Mastocitoma Cutâneo em Cães

O mastocitoma é uma neoplasia, proveniente de mastócitos, caracterizada como o tumor cutâneo mais comum em cães e com menor prevalência entre os felinos e outras espécies domésticas (PALMA *et al.*, 2025). Os mastócitos são provenientes de células hematopoéticas pluripotentes CD34+ que migram pelo sangue até atingirem os tecidos periféricos, onde sofrem maturação e diferenciação para as células mastocitárias residentes e funcionais, sob influência de fatores locais (KIRSHENBAUM *et al.*, 1991). Sua incidência, principalmente cutânea e subcutânea, representa cerca de 20 a 25% de todos os tumores cutâneos em cães, sendo a segunda neoplasia maligna mais prevalente, após os tumores de glândula mamária (SOUZA *et al.*, 2006; MEIRELLES *et al.*, 2010; SABATTINI *et al.*, 2014; HORTA *et al.*, 2018)

Não há predileção por sexo e, apesar da possibilidade de acometimento de qualquer raça, estudos sugerem que os braquicefálicos apresentam-se predispostos. Villamil *et al.*, 2011, sugerem que a forma cutânea da doença apresenta uma incidência até dez vezes maior em Boxers do que em cães sem raça definida (2,35% vs 0,23%). Outras raças predispostas são Boston Terrier, Buldogue Inglês e Francês, Shar-pei, Pug e Dachshund (BOSTOCK, 1973; MEIRELLES *et al.*, 2010; PALMA *et al.*, 2025). Apesar da predisposição, Boxers e Pugs, de maneira geral, parecem apresentar tumores com comportamentos menos agressivos, enquanto Shar-peis e Labradores geralmente desenvolvem tumores de graus mais elevados, com piores prognósticos (MOCHIZUKI *et al.*, 2016; TOSTES *et al.*, 2017). Segundo estudo retrospectivo recente, baseado em uma ampla amostragem, a frequência de mastocitomas de alto grau foi significativamente maior em Labradores (45,2%; 14/31; $p=0,002$), enquanto todos os Pugs (100%, 12/12) presentes no levantamento apresentaram tumores de baixo grau, com melhores prognósticos (TAMLIN *et al.*, 2022).

Apesar de ser passível de ocorrer em qualquer idade, com casos relatados em cães de 7 meses, a incidência aumenta com a idade, acometendo animais em uma faixa etária média de 8,5 anos (OLIVEIRA *et al.*, 2020; LONDON; SEGUIN, 2003).

Embora não possua uma etiologia completamente elucidada, fatores genéticos, epigenéticos e inflamatórios já foram apontados como predisponentes para o desenvolvimento da doença (DALECK *et al.*, 2016; NARDI *et al.*, 2022).

A diferenciação entre as formas de apresentação, cutânea ou subcutânea, é extremamente relevante, uma vez que implica em uma gama de particularidades em relação à prevalência, diagnóstico, aplicabilidade dos sistemas de graduação histopatológicos, prognóstico, abordagem terapêutica, comportamento biológico, tempo de sobrevida, taxa de recidiva e risco metastático (LLORENS *et al.*, 2025).

Os mastocitomas cutâneos originam-se na derme e podem se estender para o subcutâneo subjacente até atingir camadas musculares, sendo esta a forma mais comum e geralmente mais agressiva da doença (MINNOYE *et al.*, 2024).

Já a forma subcutânea origina-se na hipoderme, apresentando um padrão de crescimento expansivo e bem delimitado, geralmente restrito ao tecido adiposo

subcutâneo. É menos frequente que os cutâneos e, em geral menos agressivo. Inicialmente, não compromete a derme ou a epiderme, motivo pelo qual a pele sobrejacente pode permanecer íntegra, sem sinais de ulceração. Contudo, com o crescimento tumoral, pode haver compressão de estruturas adjacentes como pele, vasos e músculos superficiais (MINNOYE *et al.*, 2004; RIBEIRO *et al.*, 2022).

2.1.2 Aspectos Clínicos

Clinicamente notam-se lesões nodulares com crescimento único ou múltiplo, de aspecto elevado, eritematoso e alopecico, sua apresentação pode variar de nódulos soltos e móveis até lesões mais infiltrativas e aderidas aos planos profundos, principalmente em casos de maior agressividade, acometendo a pele e, menos frequentemente, o subcutâneo (KIUPEL & CAMUS, 2019). Esses nódulos, no entanto, apresentam grande heterogeneidade, com tamanhos e aspectos variados, podendo ocorrer desde nódulos firmes, elevados, pruriginosos e ulcerados até formas mais irregulares, de consistência mole, sem eritema ou ulceração, assemelhando-se muito a lipomas cutâneos (LONDON; SEGUIN, 2003; NARDI; DALECK, 2016).

Vale ressaltar que as manifestações cutâneas e subcutâneas são macroscopicamente semelhantes e apenas o exame histopatológico é capaz de diferenciá-las (NARDI; DALECK, 2016).

Tumores dérmicos medem em sua maioria até 3 centímetros, porém há relatos de massas que alcançaram 10 centímetros ou mais (LONDON; SEGUIN, 2003).

Entre as lesões cutâneas, os locais mais acometidos são tronco e região perineal (50-63%), seguido pelos membros (33-40%), afetando de maneira semelhante membros pélvicos e torácicos, e menos frequentemente cabeça e pescoço (10-15%) (LONDON; SEGUIN, 2003; NARDI; DALECK, 2016; SLEDGE; WEBSTER; KIUPEL, 2016; RIBEIRO *et al.*, 2022). Lesões com incidência em escroto e plano nasal foram relacionadas a graus mais altos da doença com piores prognósticos e índice metastático precoce (HORTA *et al.*, 2018).

Os linfonodos regionais são os sítios metastáticos mais comuns, ressaltando a importância da avaliação linfonodal durante o estadiamento clínico (RIBEIRO *et al.*, 2022).

Os órgãos internos são menos acometidos, entretanto apresentam piores prognósticos e são mais difíceis de detecção ao exame clínico, podendo ocorrer principalmente em intestino, fígado, baço e rim (SLEDGE; WEBSTER; KIUPEL, 2016; RIBEIRO *et al.*, 2022).

Além da presença das formações tumorais, sinais secundários estão presentes em até metade dos cães afetados e são, em suma, relacionados a síndromes paraneoplásicas decorrentes da excessiva degranulação mastocitária e a consequente liberação exacerbada de histamina, heparina, fatores quimiotáticos para eosinófilos e enzimas proteolíticas, que provocam diversos sinais clínicos, como anorexia, vômito, hematoquezia, melena, anemia, dor abdominal decorrentes de ulcerações gastrointestinais, que podem evoluir para perfurações gastrointestinais, peritonite e sepse (WELLE *et al.*, 2008; NARDI; DALECK, 2016).

O atraso na cicatrização e a deiscência dos pontos observados após a ressecção cirúrgica são atribuídas à liberação de aminas vasoativas e enzimas proteolíticas que, ao se ligarem a receptores H1 e H2, exercem um efeito supressor sobre os fatores de crescimento fibroblásticos, reduzindo a fibroplasia e o processo cicatricial no cerne da ferida cirúrgica (NARDI; DALECK, 2016).

A degranulação mastocitária exacerbada pode ser evidenciada ao exame físico, uma vez que, com a manipulação da área tumoral, surgem eritemas, edemas e pápulas, logo após a palpação, caracterizando o típico sinal de Darier, um fenômeno clínico evidente em tumores mastocitários (LONDON; SEGUIN, 2003). Casos mais graves também são relatados com a presença de distúrbios de coagulação, hipotensão e colapso circulatório, todos decorrentes da massiva liberação de histamina e aminas vasoativas (WELLE *et al.*, 2008).

2.1.3 Diagnóstico

A citologia permanece como o método de eleição para diagnóstico inicial de mastocitomas. É rotineiramente realizada por meio de punção aspirativa por agulha fina (FNAC) ou por imprint das lesões em lâminas de vidro, seguido por colorações de Romanowsky, Giemsa ou Azul de Toluidina (LONDON; SEGUIN, 2003; MACKNEILL, 2011). É uma técnica rápida, de baixo custo e minimamente invasiva, capaz de conferir um diagnóstico precoce (MACKNEILL, 2011).

Apesar de sua utilidade e notável facilidade de realização, a citologia apresenta limitações, o que torna o exame histopatológico o fator prognóstico individual mais relevante para cães e gatos portadores de mastocitomas (SLEDGE; WEBSTER; KIUPEL, 2016).

Além de informar o tipo tumoral e a adequação da excisão cirúrgica, a histopatologia auxilia na graduação da doença, conferindo informações valiosas acerca de diversos parâmetros celulares e estromais, que se traduzem sob a perspectiva prognóstica, possibilitando, até certo ponto, prever comportamentos tumorais mais ou menos agressivos, discernir sobre as melhores estratégias terapêuticas e até mesmo estimar o risco de ocorrência de quadros metastáticos (PATNAIK; EHLER; MACEWEN, 1984; KIUPEL *et al.*, 2010).

A classificação histológica, apesar de essencial e pertinente para fornecer subsídios sobre o potencial metastático da doença, não prediz isoladamente o comportamento biológico esperado. Nesse contexto, marcadores imuno-histoquímicos como o Ki67 e KIT, e a detecção de mutação ativa do gene c-kit por RT-PCR, surgem como abordagens alternativas e enriquecedoras (SABATTINI *et al.*, 2014).

Para o prognóstico, deve ser também considerado o estadiamento, de maneira que todos os animais com suspeita de mastocitoma devem ser estadiados, envolvendo desde uma abordagem mínima - hemograma, bioquímica sérica e punção de linfonodos regionais para avaliação citológica - até avaliações mais completas com ultrassonografia abdominal, radiografia torácica e, quando possível, punção de fígado, baço e avaliação da medula óssea (STEFANELLO *et al.*, 2015).

Apesar da citologia de linfonodos ser relevante como triagem para casos metastáticos, resultados falsos negativos não são raros de ocorrer, por isso, a linfadenectomia, para avaliação histopatológica completa do linfonodo, é sempre recomendada (COSTA-CASAGRANDE *et al.*, 2008; GIULIANO *et al.*, 2016).

Conforme proposto pela Organização Mundial da Saúde, o estadiamento clínico permite avaliar a extensão da doença, estando diretamente relacionado ao prognóstico esperado para cada caso. (Figura 1) (OWEN, 1980; LONDON; SEGUIN, 2003).

Estágio	Definição	Subestágio (OMS)
0	Tumor único excisado incompletamente (comprovado histologicamente, sem envolvimento de linfonodo regional.	A: Sem sinais sistêmicos B: Com sinais sistêmicos
I	Um tumor confinado à derme, sem envolvimento de linfonodo regional.	A: Sem sinais sistêmicos B: Com sinais sistêmicos
II	Um tumor dérmico com envolvimento de linfonodo regional.	A: Sem sinais sistêmicos B: Com sinais sistêmicos
III	Múltiplos tumores dérmicos OU um tumor grande/infiltrativo, com ou sem envolvimento de linfonodo regional	A: Sem sinais sistêmicos B: Com sinais sistêmicos
IV	Qualquer tumor com metástase distante (inclui mastocitemia e/ou acometimento de medula óssea)	-

Figura 1. Estadiamento da OMS para mastocitomas cutâneos caninos baseado em critérios clínicos segundo Owen, 1980.

Estágios clínicos mais altos estão associados à redução do intervalo livre de doença e do tempo de sobrevida (O'KEEFE, 1990).

2.1.4 Aspectos Histológicos

Ao exame histológico, os mastócitos são caracterizados como células pleomórficas, podendo assumir formatos esféricos, estrelados ou fusiformes; possuem núcleos arredondados e grânulos citoplasmáticos de conteúdo predominantemente

proteoglicano ácido, formado por inúmeras substâncias como histamina, heparina e enzimas proteolíticas, sendo este material intracelular, o responsável por conferir a tonalidade violeta quando corado por corantes do tipo Romanowsky ou Azul de Toluidina, fenômeno denominado de “metacromasia” (DUNCAN; PRASSE, 1979).

Os mastócitos neoplásicos podem apresentar grânulos em quantidade variável conforme o grau de diferenciação tumoral, de maneira que, em neoplasias pouco diferenciadas, alguns podem até perder a sua capacidade de expressão, ou expressá-los em quantidades insuficientes para a visualização, um fator frequentemente relatado como dificultador do diagnóstico. Nessas ocasiões, os métodos histoquímicos de evidenciação, como os corantes de Giemsa ou Azul de Toluidina são os mais indicados, destacando os grânulos em púrpura (WELLE *et al.*, 2008).

Mastocitomas geralmente apresentam mastócitos dispostos em cordões ou fileiras, uma disposição vinculada a graus tumorais mais baixos, ou então podem aparecer em grupos, em um arranjo arquitetural com padrão em lençóis, denso e difuso, com maior celularidade, pleomorfismo e incremento mitótico (HORTA *et al.*, 2018). Seus núcleos podem variar em formato e tamanho conforme o grau de progressão tumoral, apresentando células bi ou multinucleadas, com a presença frequente de figuras de mitoses em tumores pouco diferenciados (BOSTOCK, 1973).

2.1.5 Graduação Histopatológica

Acerca do comportamento biológico, os mastocitomas cutâneos apresentam um perfil variado associado à sua graduação histopatológica, e por conseguinte, a sua velocidade de desenvolvimento e potencial metastático (SLEDGE; WEBSTER; KIUPEL, 2016).

Dois sistemas de graduação histopatológica são comumente utilizados para mastocitomas cutâneos caninos. O protocolo de Patnaik, em três graus, e o sistema de Kiupel, em dois graus. Em ambos, graus mais altos predizem maior agressividade, com maior potencial metastático e maior mortalidade relacionada, orientando manejo cirúrgico e adjuvante (PATNAIK; EHLER; MACEWEN, 1984; KIUPEL *et al.*, 2010; RIBEIRO *et al.*, 2022).

O sistema de graduação de Patnaik para mastocitomas cutâneos foi proposto em 1984 e rapidamente se tornou o sistema mais utilizado mundialmente, sendo o primeiro a conseguir correlacionar com sucesso os achados histológicos com o tempo de sobrevida dos pacientes (PATNAIK; EHLER; MACEWEN, 1984). As lesões foram graduadas com base em características histomorfológicas que incluem celularidade, morfologia celular, invasividade, atividade mitótica, extensão do envolvimento tecidual e reação estromal. Sob esse prisma, mastocitomas de grau I, ou seja, bem diferenciados, apresentam um bom prognóstico, e em geral, são curados apenas com as ressecções cirúrgicas completas, ao passo que, mastocitomas de grau III, são pouco diferenciados, localmente invasivos e com elevado potencial metastático. Já os mastocitomas de grau intermediário (grau II), são os mais difíceis de prever e são apontados como potencialmente curados através de ressecções cirúrgicas mais amplas, apesar de apresentarem entre 5 e 22% de metastatização (SABATTINI *et al.*, 2024).

Nesse sistema de graduação, Patnaik e colaboradores estabeleceram as seguintes características atribuídas a cada grau histológico:

Grau 1: fileiras ou aglomerados de mastócitos neoplásicos bem diferenciados e monomórficos, núcleos arredondados, pequenos grânulos intracitoplasmáticos, proliferação confinada à derme, sem figuras de mitose ou binucleação, com mínima reação estromal/necrose.

Grau 2: mastócitos moderadamente pleomórficos, núcleos redondos/pleomórficos, granulação variável, extensão à derme profunda e ao subcutâneo, ocasionalmente mais profundo; zero a duas mitoses por campo de maior aumento, áreas discretas de edema, necrose e hialinização colagênica.

Grau 3: mastócitos com pleomorfismo acentuado, núcleos vesiculares pleomórficos com múltiplos nucléolos; células em camadas densas substituindo o subcutâneo e planos profundos; três a seis mitoses por campo de grande aumento, com hemorragia, edema, necrose e hialinização.

Apesar de ter sido considerado o padrão-ouro por muitos anos, a alta prevalência de casos diagnosticados como Grau II, a alta variabilidade interobservador, e

comportamentos biológicos variados, foram apontadas como causas importantes que reduziam a acurácia do método (NARDI *et al.*, 2022).

Em 2010, Kiupel *et al.* propuseram uma nova forma de graduação histológica para mastocitomas cutâneos, baseada em um sistema de apenas duas categorias, a fim de predizer com maior acurácia o comportamento biológico dos tumores, e por conseguinte, agregar um valor prognóstico mais assertivo à prática, sendo este o protocolo mais utilizado atualmente.

Nesse sistema, critérios citológicos mais objetivos são levados em consideração, reduzindo a variabilidade interobservador e principalmente, auxiliando na caracterização dos casos intermediários e heterogêneos de Patnaik, o que alinhou de maneira mais coesa o comportamento biológico esperado com a sua respectiva graduação (KIUPEL *et al.*, 2010).

Dessa maneira, os tumores que possuírem um ou mais dos seguintes critérios apresentados a seguir são caracterizados como alto grau (Grau II de Kiupel), enquanto os tumores de baixo grau (Grau I de Kiupel) não apresentam nenhuma delas (Figura 2) (DE NARDI *et al.*, 2022).

Kiupel - Sistema de Graduação para Mastocitoma Cutâneo em Pequenos Animais - Grau II (Alto) incluem a presença de qualquer uma das seguintes características:
✓ 7 Figuras Mitóticas em 10 campos de alta potência (HPF)
✓ ≥ 3 Células multinucleadas (pelo menos 3 núcleos) em 10 HPF
✓ \geq Núcleos bizarros em HPF
✓ Cariomegalia (os diâmetros nucleares variam pelo menos duas vezes em $\geq 10\%$ das células)

Figura 2. Protocolo de graduação histopatológica para mastocitomas cutâneos segundo Kiupel *et al.*, 2010.

Os pacientes com mastocitomas de alto grau apresentam uma média de sobrevivência menor que quatro meses e maiores chances de metástase, enquanto os diagnosticados como baixo grau, obtiveram uma média de sobrevivência maior que dois anos e menores chances de metástase (KIUPEL *et al.*, 2010).

Em um estudo recente que utilizou 95 mastocitomas cutâneos para comparar os métodos de graduação, evidenciou-se que, com base no sistema de Patnaik, 74,6%

dos patologistas concordaram no diagnóstico de mastocitomas de grau III, 63% no diagnóstico de grau II e 63,1% no de grau I, ao passo que, valendo-se do sistema de graduação de Kiupel, todos os 6 patologistas identificaram os mesmos 10 mastocitomas como tumores de alto grau, corroborando os resultados indicados pelo estudo original de Kiupel que identificou uma consistência de 96,8% de acordos entre os laudos de diferentes avaliadores (KIUPEL *et al.*, 2010).

O sistema de Kiupel tem a vantagem de eliminar o grau intermediário, mantendo um alto valor preditivo sobre a mortalidade tumoral (SABATTINI, 2014).

Em conclusão, a literatura é de maneira geral, consonante sobre o melhor valor prognóstico do sistema de duas categorias proposto por Kiupel, sendo um método capaz de associar significativamente mastocitomas de alto grau com aumento da mortalidade e maior risco de desenvolvimento metastático, fornecendo informações valiosas sobre a necessidade de terapia adicional na abordagem terapêutica dos cães acometidos (KIUPEL *et al.*, 2010; SABATTINI *et al.*, 2024). Com esse sistema, tumores de comportamentos mais agressivos podem ser prontamente identificados, permitindo ao tutor e ao clínico, lançar mão de testes complementares como a expressão de KIT ou triagem de mutações em c-kit para selecionar a terapia mais adequada (KIUPEL *et al.*, 2010).

Como levantado pelo próprio trabalho de Kiupel e Camus (2019), embora as características histológicas forneçam informações imprescindíveis para predizer o comportamento biológico da doença, aproximadamente 5% dos cães portadores de mastocitomas de baixo grau morrerão em decorrência da doença enquanto até 20% deles desenvolverão tumores adicionais que podem refletir quadros metastáticos. Até 15% dos cães com mastocitomas de baixo grau já exibem disseminação para os linfonodos regionais no momento da apresentação (SLEDGE; WEBSTER; KIUPEL, 2016). Horta *et al.* (2018) identificaram maior risco de óbito relacionado ao mastocitoma em pacientes com recidivas (locais ou distantes) e metástase linfonodal. Esses dados ressaltam a importância de que o prognóstico da doença não deve se basear exclusivamente na graduação histopatológica, independentemente do sistema utilizado, mas sim considerar também, os resultados do estadiamento clínico. A

disseminação linfonodal é um fator chave para recomendação de tratamento sistêmico associado a abordagem cirúrgica (STEFANELLO *et al.*, 2015).

Mesmo tumores de baixo grau devem ser monitorados clinicamente e ter seu risco avaliado com ferramentas adicionais, como marcadores proliferativos, expressão de KIT e análise de mutações em c-kit para melhor estimar o risco metastático (KIUPEL *et al.*, 2010).

2.1.6 Estadiamento Tumoral

O estadiamento tumoral é utilizado para descrever a extensão da doença neoplásica, permitindo assim uma maior compreensão do seu comportamento biológico, conferindo critérios imprescindíveis para o correto diagnóstico, prognóstico e terapêutica. Sua realização envolve diversos critérios, desde a medição do tumor até a avaliação dos gânglios linfáticos e utilização de técnicas de diagnóstico por imagem quando indicado (YAMAGAMI *et al.*, 1996).

Sabe-se que as taxas de sobrevida são maiores nos casos em que a doença está localizada do que naquelas em que a lesão se estende além do órgão de origem, difundindo-se para sítios secundários à distância (TORÍBIO *et al.*, 2012).

Segundo os autores, dentre os diversos sistemas de estadiamento tumoral, o sistema conhecido como TNM (Tumor-Nodo-Metástase) adotado pela Organização Mundial de Saúde, sendo T – Extensão do tumor primário; N – Ausência ou presença do acometimento de linfonodos regionais; M – Ausência ou presença de metástase à distância, é o sistema padrão para a maioria dos tumores em medicina veterinária, desenvolvido e publicado pela União Internacional contra o Câncer, possibilitando a caracterização da extensão anatômica da doença (OWEN, 1980).

2.1.7 Tratamento

Sempre que possível, após o diagnóstico citológico, a biópsia excisional deve ser empregada a fim de remover completamente a massa tumoral (SLEDGE; WEBSTER; KIUPEL, 2016).

O manejo de cães e gatos acometidos por mastocitomas cutâneos deve ser pautado sobretudo no estadiamento clínico, graduação histológica e a localização anatômica do tumor. Lesões únicas e menos severas, como as de grau I e algumas de grau II, que sejam passíveis de remoção completa, embasadas por margens de pelo menos 2 centímetros livres de tumor à análise histopatológica, são geralmente abordadas apenas com a ressecção cirúrgica, que se presta tanto ao propósito terapêutico como diagnóstico (HORTA *et al.*, 2018; OLIVEIRA *et al.*, 2020).

De maneira geral, o tratamento de eleição é a excisão cirúrgica que, embora muitas vezes seja resolutivo, exige margens cirúrgicas de 1 a 3 centímetros do nódulo, o que muitas vezes reflete em taxas de recorrência variáveis, de 3% a 11% em tumores totalmente excisados e de 18% a 38% em tumores excisados de maneira incompleta (DE NARDI *et al.*, 2022). Mastocitomas recorrentes estão associados a mau prognóstico, com taxas de óbito de 86% a 100% dos casos, conforme relatado em estudos prévios (BOSTOCK, 1973; PATNAIK; EHLER; MACEWEN, 1984). Em casos de massas de maiores proporções, a citorredução do tumor, bem como a redução da inflamação peritumoral, pode ser promovida por rádio ou quimioterapia pré-operatória, ou por fármacos como a vinblastina e a prednisolona, evitando-se assim cirurgias mais agressivas (HORTA *et al.*, 2018; OLIVEIRA *et al.*, 2020). A amputação de membros, garantindo ressecção completa com margens livres de pelo menos 2 centímetros, é a opção mais agressiva, que pode comprometer a qualidade de vida e deve ser ponderada cuidadosamente (DICKERSON *et al.*, 2015).

É necessário cuidado adicional durante o procedimento cirúrgico, uma vez que, devido à descarga exacerbada de heparina, pode haver indução à coagulopatia, promovendo sangramento exacerbado (SLEDGE; WEBSTER; KIUPEL, 2016).

Associado à excisão cirúrgica, a linfadenectomia deve ser realizada sempre que possível (OLIVEIRA *et al.*, 2020). Em linfonodos metastáticos, a remoção dos

linfonodos regionais tem potencial terapêutico, promovendo redução de recidivas locais e de metástases distantes (DE NARDI *et al.*, 2022). Para metástases linfonodais confirmadas, ou em tumores de alto grau, o estadiamento completo e a terapia sistémica devem ser prontamente empregados independentemente de outros achados (SLEDGE; WEBSTER; KIUPEL, 2016). Para tumores de baixo grau, a terapia sistêmica deve ser considerada, uma vez que haja de Ki-67 elevado, mutação no exón 11 de c-kit ou padrão de KIT 2 ou 3 (SLEDGE; WEBSTER; KIUPEL, 2016).

A radioterapia pode ser empregada após a cirurgia, com ou sem quimioterapia, e tem sido sugerida de forma profilática em linfonodos regionais de alto risco, mesmo quando citologicamente negativos (LEJEUNE *et al.*, 2013).

A eletroquimioterapia (ECT) é uma técnica utilizada para lesões cutâneas neoplásicas com alta eficácia e baixa toxicidade, através da combinação de quimioterápicos com pulsos elétricos permeabilizantes (eletroporação), permitindo uma potencialização da passagem transmembranal dos quimioterápicos e consequente maior captação pelas células tumorais, culminando em dano ao DNA e morte celular; além do efeito citotóxico direto, outras vantagens da técnica são descritas como potencial efeito antitumoral, como vasoconstrição e recrutamento imunológico (MIR *et al.*, 1998; SPUGNINI *et al.*, 2006).

Para quadros metastáticos, doença avançada ou tumores inoperáveis, a cura completa não é esperada, sendo instaurado tratamento paliativo visando estabilização e qualidade de vida (CARLSTEN *et al.*, 2011; OLIVEIRA *et al.*, 2020).

As terapias de suporte são importantes adjuvantes para minimizar os efeitos secundários provocados pelos mastocitomas, como a hiper-histaminemia. Antihistamínicos H1 (como difenidramina, clorfeniramina) e H2 (como cimetidina, famotidina ou ranitidina) reduzem a hipersecreção de ácido clorídrico associada à liberação anormal de histamina pelas células tumorais; para as ulcerações gastrointestinais, o sucralfato pode ser utilizado como protetor de mucosa (O'KEEFE, 1990).

2.1.8 Marcadores Prognósticos

Dada a prevalência e o comportamento biológico variável dos mastocitomas cutâneos em cães, o estabelecimento de prognóstico acurado é de suma importância, permitindo assim que a melhor abordagem terapêutica seja selecionada, caso a caso (MISDORP, 2004; SLEDGE; WEBSTER; KIUPEL, 2016).

Diversas características clínicas são reconhecidas como tendo utilidade prognóstica, incluindo local e tamanho do tumor, presença de nódulos satélites, ocorrência de sinais paraneoplásicos como o sinal de Darier, vômitos e hemorragias gastrointestinais, estadiamento clínico, status metastático de linfonodos e órgãos viscerais (WELLE *et al.*, 2008; THOMPSON *et al.*, 2010; STEFANELLO *et al.*, 2015).

A presença de lesões múltiplas ao diagnóstico deve ser considerada, mas não indica necessariamente doença mais agressiva (TAMLIN *et al.*, 2022).

Linfonodos sentinelas são definidos como os primeiros a receber drenagem linfática de um tumor e representam o principal local de metástase (THOMPSON *et al.*, 2010).

Estudos apontam que cães com metástase confirmada na cirurgia apresentam risco 4 vezes maior de óbito em até 12 meses do que cães sem metástase, ao passo que, a linfadenectomia em cães com metástase linfonodal tem sido associada a maior probabilidade de sobrevida em 12 meses (94% com linfadenectomia vs 78% sem linfadenectomia) (TAMLIN *et al.*, 2022).

O diagnóstico histopatológico, segundo a graduação de Kiupel, tem sido apontado como o fator prognóstico independente mais importante para os mastocitomas cutâneos (STEFANELLO *et al.*, 2015). Ainda assim, enfatiza-se que nenhum parâmetro isolado é completamente eficiente (TAMLIN *et al.*, 2022).

Atualmente uma gama de diversos fatores prognósticos associados aos mastocitomas cutâneos são descritos pela literatura, sendo eles: características clínicas, critérios histológicos considerados pelos sistemas de graduação de Patnaik e Kiupel, contagem mitótica, atividade proliferativa abordada pelo índice de Ki-67, mutação de proto-oncogenes como o c-kit e padrão de expressão da proteína KIT (SLEDGE; WEBSTER; KIUPEL, 2016).

A proliferação celular indica o número de células no ciclo celular (fração de crescimento) e a velocidade com que as células progridem nesse ciclo (taxa de proliferação). Nenhum índice único é capaz de avaliar simultaneamente fração de crescimento e taxa de proliferação, o que significa que é necessário a avaliação de múltiplos marcadores para aferir plenamente a proliferação celular (DE NARDI *et al.*, 2022).

Apesar de não refletirem a fração de crescimento global, as contagens mitóticas têm incontestável valor prognóstico e podem ser realizadas prontamente com o exame de lâminas coradas por hematoxilina e eosina (HE) (SLEDGE; WEBSTER; KIUPEL, 2016). O índice mitótico (MI) é uma medida indireta de proliferação celular, realizada de maneira visual pelo patologista, e correlaciona-se diretamente ao grau histológico; cães com MI ≤ 5 sobrevivem significativamente mais que aqueles com MI >5 , enquanto cães com MI >5 em 10 campos de grande aumento têm sido associados a desfechos clínicos desfavoráveis e a um maior potencial metastático (ROMANSIK *et al.*, 2007; KIUPEL; CAMUS, 2019). No entanto, alguns mastocitomas cutâneos biologicamente agressivos, apresentando baixo índice mitótico, já foram descritos na literatura (KIUPEL *et al.*, 2010). De fato, as mitoses distinguem apenas as células na fase “M” do ciclo celular, o que pode levar à subestimação da fração de crescimento total, quando analisada exclusivamente, uma vez que muitas células podem estar em ciclo proliferativo, mas em fases distintas, G1, S, G2. Outra limitação da técnica é a sua inerente subjetividade, visto que, por ser um método manual de avaliação, sempre há a possibilidade de variabilidade entre os observadores (SLEDGE; WEBSTER; KIUPEL, 2016).

Em contraste, um índice de fração de crescimento, avaliado por imuno-histoquímica, como o Ki-67, identifica células em todas as fases do ciclo celular, através da quantificação de um proteína nuclear expressa por células em ciclo celular, conferindo uma visão mais ampla e quantitativamente fidedigna sobre a atividade proliferativa tumoral, além de ser menos sujeito a interpretações distintas e subjetivas (STREFEZZI *et al.*, 2009). No entanto ela não é capaz de informar sobre a velocidade com que as células progridem no ciclo (FREYTAG *et al.*, 2021).

Mastocitomas de baixo grau, com baixo índice de proliferação, determinado por baixo Ki-67, têm probabilidade muito baixa de recidivar, mesmo com margens cirúrgicas incompletas (LONDON; SEGUIN, 2003).

A avaliação de fatores moleculares também agrega grande valor prognóstico; um deles é a mutação no proto-oncogene kit, que codifica a proteína KIT, um receptor tirosina-quinase transmembrana envolvido no desenvolvimento, proliferação e função de mastócitos, melanócitos, células intersticiais de Cajal e células-tronco hematopoiéticas (KIUPEL; CAMUS, 2019).

Oncogenes são genes envolvidos na transformação neoplásica, derivados de proto-oncogenes, ou seja, genes normais e constituintes de toda e qualquer célula, regulando o crescimento e diferenciação celulares (DE NARDI *et al.*, 2022).

No caso do proto-oncogene kit, sua função está vinculada a codificação de uma proteína que atua como receptor transmembranal do tipo tirosina quinase, responsável por se ligar ao Fator de Células Tronco (SCF), uma citocina capaz de estimular desenvolvimento, maturação e sobrevivência de mastócitos e outras linhagens celulares hematopoéticas já descritas (LONDON; SEGUIN, 2003).

Mutações neste gene provocam sobretudo uma ativação constitutiva do receptor, mesmo na ausência do seu ligante, fazendo com que, em última análise, sobrevivência, proliferação celular desregulada e secreção de citocina quimiotáticas para mastócitos sejam promovidas (LONDON; SEGUIN, 2003; HORTA *et al.*, 2018).

Pesquisas acerca do tema denotam o papel central desse processo no desenvolvimento de mastocitomas cutâneos caninos, estando diretamente associado a pior prognóstico, maior risco de metástase e morte (SLEDGE; WEBSTER; KIUPEL, 2016; RIBEIRO *et al.*, 2022). Freytag *et al.* (2021) observaram níveis mais altos de KIT à medida que diminuía a diferenciação tumoral, identificando mutações em tumores grau II e III, mas não em grau I; sugerindo que mutações e expressão de KIT podem estar relacionadas à tumorigênese e progressão dos mastocitomas.

A variabilidade clínica observada em tumores classificados como de baixo grau, mas que ainda assim evoluem com recidivas, metástases ou óbito, reforça a necessidade de métodos complementares capazes de ampliar a acurácia prognóstica. Nesse contexto, cresce o interesse pela avaliação de componentes do microambiente

tumoral, incluindo os macrófagos associados ao tumor (TAMs), os fibroblastos associados ao câncer (CAFs), e a deposição e organização do colágeno na matriz extracelular (SLEDGE; WEBSTER; KIUPEL, 2016).

Esses elementos estromais participam ativamente da progressão neoplásica por meio da remodelação tecidual, promoção angiogênica, modulação imune e facilitação da disseminação metastática. Assim, a caracterização do infiltrado celular e da matriz extracelular, bem como sua interação com as células tumorais, desporta como ferramenta promissora para refinar a capacidade prognóstica e preditiva, permitindo a identificação mais acurada de tumores biologicamente agressivos e favorecendo a adoção de condutas terapêuticas customizadas (RIBEIRO *et al.*, 2022).

2.2 Oncogênese e Microambiente Tumoral

Até o final do século XX, a oncogênese era compreendida predominantemente como um processo de base genética, sustentado pela ideia de que alterações moleculares direcionavam o desenvolvimento tumoral, conceito fortalecido pelas descobertas de J. Michael Bishop e Harold Varmus, laureados com o Prêmio Nobel em 1989, que demonstraram que os oncogenes derivam de proto-oncogenes celulares normalmente envolvidos na regulação do crescimento e diferenciação, mas que, quando mutados, contribuem para a tumorigênese (NUSSE; VARMUS, 1982).

De forma básica, até esse momento, a oncogênese era tida como resultado do acúmulo de mutações em oncogenes e genes supressores tumorais, que permitiam que células normais superassem restrições de replicação celular, atingindo um potencial de crescimento ilimitado e descontrolado (BIED *et al.*, 2023).

Embora inicialmente a compreensão da doença oncológica tenha enfocado especificamente as características das células neoplásicas, com o avanço das técnicas de investigação, tornou-se evidente que as condições microambientais relativas ao sítio de crescimento tumoral influenciam decisivamente no devir da doença oncológica (HANAHAN; WEINBERG, 2000). Nesse contexto, no início do século XXI, surge uma grande mudança no paradigma oncológico, particularmente salientado pela revisão de Hanahan & Weinberg, 2000, consolidando uma visão

multifatorial para a gênese tumoral. Em seu trabalho, os autores destacam a expansão tumoral como um processo heterotípico, com importante participação do estroma tecidual, sendo um ambiente hospitaleiro necessário para a viabilização da expansão neoplásica em um sítio secundário (HANAHAN; WEINBERG, 2000). Diversos estudos têm demonstrado que a aquisição de fenótipos mais agressivos pelas células tumorais é dependente das interações diretas e/ou indiretas com os componentes do microambiente tumoral (TME) (BRANDNER e HAASS, 2016).

A relação entre inflamação crônica e tumorigênese foi proposta pela primeira vez por Rudolf Virchow em 1863, após a observação de que leucócitos infiltrantes eram uma característica marcante dos tumores (apud VIRCHOW, 1873; QUAIL; JOYCE, 2013).

Atualmente, o papel inflamatório na tumorigênese é amplamente aceito, sendo este um componente essencial de todos os tumores, atuando em diferentes estágios do desenvolvimento tumoral, desde sua iniciação e promoção, até sua conversão maligna, invasão e metástase, com evidentes repercussões sobre o sistema imunológico, e consequentemente sobre as respostas à terapêutica aplicada (SICA; ALLAVENA; MANTOVANI, 2008; MANTOVANI, 2017; HANAN, 2022).

Um dos mecanismos descritos pelo qual a inflamação é capaz de incitar a iniciação tumoral é pela produção de fatores de crescimento e citocinas, substâncias capazes de conferir um fenótipo semelhante ao de células-tronco a progenitores tumorais, ampliando assim o *pool* de células alvo para os processos mutagênicos mais relevantes (CHEN *et al.*, 2008). Outro aspecto relevante é notado pela grande requisição de suprimento sanguíneo intratumoral, à medida que o tumor cresce, sua demanda metabólica e nutricional supera o aporte disponível, gerando hipóxia; a deficiência de oxigênio ativa vias de resposta celular, promovendo a produção de fatores angiogênicos, como VEGF, e citocinas, como a IL-6 (KARIN; GRETEN, 2005). Paralelamente, a morte celular provocada pela baixa concentração de oxigênio atua como um potente estímulo inflamatório, recrutando células do estroma e do sistema imune para fomentar a neovascularização; forma-se, assim, um ciclo vicioso no qual inflamação, angiogênese e progressão tumoral se retroalimentam, favorecendo a manutenção e expansão da neoplasia (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Com base na renovação celular contínua e na proliferação induzida pela inflamação associada ao tumor, tumores foram chamados de “feridas que não cicatrizam” (DVORAK, 1986).

Como aponta Mantovani *et al.*, 2002, a maioria, senão todas, as neoplasias sólidas desencadeiam uma resposta inflamatória intrínseca capaz de moldar um microambiente pró-tumorigênico, no qual a inflamação, primariamente comprometida em uma resposta fisiológica de cicatrização e reparação tecidual, é subvertida em benefício do desenvolvimento tumoral. Assim, alterações nos componentes microambientais podem definir consequências notáveis sobre as propriedades da ECM, modificando características como composição molecular, rigidez e orientação das fibras, atuando diretamente em processos biológicos que fomentam a progressão tumoral, como adesão e motilidade celular, neoangiogênese, evasão imune e metástase (PAOLILLO; SCHINELLI, 2019). Entendemos, portanto, o microambiente tumoral, não apenas como o local de desenvolvimento do tumor, mas também como um complexo ecossistema, onde além das células neoplásicas, há uma grande população de células da imunidade inata (incluindo macrófagos, neutrófilos, mastócitos, células mieloides supressoras, células dendríticas e células NK), células da imunidade adaptativa (linfócitos T e B) e células estromais, como fibroblastos, células endoteliais, pericitos, células mesenquimais, componentes da matriz extracelular (ECM), como colágeno, enzimas remodeladoras como as metaloproteinases (MMPs), citocinas e quimiocinas inflamatórias, fatores de crescimento e nutrientes, todos em constante comunicação por meio de contato direto ou por sinalização química via citocinas, seja de maneira autócrina ou parácrina (VISSER; EICHTEN; COUSSENS, 2006; JOYCE; POLLARD, 2008).

Desse modo, o microambiente tumoral pode ser compreendido como um sítio de inflamação latente, no qual uma grande gama de componentes celulares e moleculares estão implicados em alterações fenotípicas sobre as células tumorais, modulando a evolução da doença (KOMI; REDEGELD, 2019; ROGERS; HOLEN, 2011; EBLE; NILAND, 2019; HANAHAN, 2022).

O desenvolvimento de metástases é descrito como um processo complexo composto por etapas: invasão local, intravasamento para os vasos sanguíneos ou

linfáticos, sobrevivência na circulação, extravasamento para o sítio secundário e colonização do nicho pré-metastático (MICALIZZI; MAHESWARAN; HABER, 2017). Estudos correlacionam de maneira direta diversas vertentes do processo metastático com a colaboração entre células cancerosas, imunes e inflamatórias do estroma tumoral (KALLURI; WEINBERG, 2009).

Outro ponto chave, relaciona-se à conexão do processo inflamatório e mecanismos epigenéticos, como o silenciamento gênico por microRNAs e a metilação do DNA, ambos envolvidos na inativação de genes supressores tumorais como o INK4a e APC, comprometidos, portanto, com a progressão da doença (COOPER; FOSTER, 2008).

Também células T podem exercer tanto funções anti como pró-tumorigênicas, de modo que, o aumento no número de linfócitos citotóxicos e T auxiliares de perfil Th1, por exemplo, correlacionam-se com maior sobrevida em alguns cânceres, como carcinoma colorretal, melanoma, mieloma múltiplo e carcinoma de pâncreas (GRIVENNIKOV; GRETEN; KARIN, 2010). Por outro lado, há evidências de subconjuntos de células T implicadas em promoção tumoral, incluindo células Th2 e Th17 (DENARDO *et al.*, 2009). Esta ambiguidade funcional pode ser evidenciada até mesmo em células Treg, que além da sua função pró-tumorigênica, implicada na supressão das respostas imunológicas, eventualmente antagonizam a progressão tumoral por meio da supressão inflamatória (GALLIMORE; SIMON, 2008). O que determina se prevalecerá uma resposta inflamatória favorável ao crescimento tumoral ou não, está diretamente relacionado ao perfil de mediadores imunológicos presentes, às citocinas atuantes, à quantidade e ao grau de ativação das diferentes populações celulares que compõem o TME (LIN; KARIN, 2007).

Vários tipos celulares além dos linfócitos estão associados ao TME e ao seu contexto inflamatório; fibroblastos associados ao tumor (CAFs) e macrófagos associados ao tumor (TAMs) são dois exemplos de importância central (RASKOV *et al.*, 2021).

A coexistência de CAFs e TAMs em cânceres de mama e oral foi correlacionada a piores prognósticos e menor sobrevida (CENDROWICZ *et al.*, 2021). Juntos CAFs e TAMs coordenam a inflamação pró-tumoral, formam barreiras físicas e químicas que limitam a atuação de fármacos e comprometem a ação imunológica antitumoral,

atuando sinergicamente. São frequentemente detectados em regiões semelhantes do tecido tumoral, e sua presença combinada é indicativo de prognóstico desfavorável em vários cânceres em humanos (COMITO *et al.*, 2013; MANTOVANI *et al.*, 2022).

Por muitos anos, as abordagens terapêuticas concentraram-se em atuar diretamente sobre as células tumorais, no entanto, com o crescente entendimento sobre os mecanismos envolvidos no TME e sua correlação multifatorial com o desenvolvimento e progressão do câncer, pesquisas recentes visam outras abordagens farmacológicas; células estromais do microambiente são geneticamente estáveis em comparação com as células tumorais e provavelmente menos suscetíveis a mecanismos de resistência terapêutica (MARUSYK; ALMENDRO; POLYAK, 2012).

Nas próximas sessões, o papel multifatorial e dinâmico de CAFs e TAMs será melhor destrinchado, a fim de se ressaltar todos os seus principais papéis na complexidade inerente ao microambiente tumoral.

2.3 Fibroblastos Associados ao Câncer e Colágeno

Os fibroblastos são os tipos celulares residentes predominantes no tecido conjuntivo, descritos pela primeira vez ao final do século XIX, como células de origem mesenquimal que não pertencem aos compartimentos epitelial, vascular ou imune, essenciais para a manutenção da arquitetura tecidual e dos componentes estromais (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2018; ROBBINS e COTRAN, 2021). São responsáveis pela síntese e secreção de diversos componentes, como colágenos tipo I, III, IV e V, fibronectina e laminina, fornecendo o arcabouço necessário para outros tipos celulares (TOMASEK *et al.*, 2002). No tecido íntegro, em condições homeostáticas, na ausência de sinais ativadores, mantêm-se em estado quiescente, com baixa taxa proliferativa e atividade secretora reduzida, sendo então denominados fibrócitos (GLABMAN; CHOYKE; SATO, 2022). Por sua notória capacidade de secreção dos principais componentes da ECM, a ação fibroblástica, quando inserida no contexto reparador, envolve incremento proliferativo e secretor, o que caracteriza a sua “ativação”, mediada sobretudo por sinais inflamatórios (KALLURI, 2016), possibilitando o remodelamento da ECM, orquestrado pela capacidade de secreção de MMPs e seus

inibidores (TIMPs), regulando tanto a deposição como a degradação colagênica (ÖHLUND, D.; ELYADA, E.; TUVESEN, 2014). Entre o leque de perfis de ativações possíveis, destaca-se o fenótipo miofibroblástico, caracterizado pela expressão de alfa actina de músculo liso (α -SMA), uma proteína intracitoplasmática que confere elevada capacidade contrátil, codificada pelo gene ACTA2, semelhante às células musculares, motivo pelo qual sua nomenclatura foi atribuída (ZEISBERG, E.M; ZEISBERG, M, 2012). Miofibroblastos foram identificados e descritos inicialmente em feridas cutâneas, associados principalmente à fase proliferativa e cicatricial do processo inflamatório, momento no qual a contração da ferida é facilitada pelo seu ganho de habilidade contrátil (ÖZDEMİR *et al.*, 2014). No contexto neoplásico, essa mesma via de ativação fibroblástica é cooptada pelo tumor, originando uma população que, embora fenotipicamente similar, é funcionalmente distinta, referida pela literatura como fibroblastos associados ao câncer (CAFs) (MUELLER; FUSENIG, 2004). Fibroblastos associados ao câncer compartilham inúmeras características de fibroblastos metabolicamente ativos durante o reparo, como alta taxa proliferativa, secreção potencializada de colágeno e maior capacidade de remodelação da ECM, porém mantêm seu perfil de ativação de forma persistente, fornecendo sinais oncogênicos parácrinos ao tecido em transformação, o que os correlaciona diretamente à modulação e progressão da doença tumoral, fomentando processos como angiogênese, invasão, imunossupressão e metástase (BHOWMIC; NEILSON; MOSES, 2004; ORIMO; WEINBERG, 2006; FRANCO *et al.*, 2010). A maioria dos estudos aponta para a possibilidade de vários precursores celulares, além dos fibroblastos residentes teciduais, células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea, células epiteliais, adipócitos, células endoteliais e pericitos estão potencialmente implicados na sua gênese resultando em uma variação em seu fenótipo, expressão gênica e consequentemente, função (HINSHAW; SHEVDE, 2019; PING *et al.*, 2021). Como há múltiplos fenótipos possíveis, geralmente aplica-se uma combinação de marcadores, sendo os mais estabelecidos, alfa-actina de músculo liso (α -SMA), proteína de superfície de fibroblastos (FAP), PDGFR- α e β , vimentina e prolil-4-hidroxilase (TOGO *et al.*, 2013).

CAF_s α-SMA+ geralmente associam-se, mas não se limitam, a maior produção e modulação da matriz, facilitando a adesão célula-ECM e modulando componentes da imunidade adaptativa. Por outro lado, CAF_s FAP+ frequentemente são descritos, sobretudo em neoplasias epiteliais humanas, em especial, carcinomas, como subpopulações imunossupressivas, responsáveis por conferir maior rigidez e alinhamento de fibras secretadas (NURMIK *et al.*, 2019).

CAF_s são implicados em diversas vertentes pró-tumorais, o estroma reativo e desmoplásico modulado pela sua ação contém maiores quantidades de componentes da ECM que contribuem para a manutenção das características do TME, influenciando diretamente processos como migração e invasão celular, angiogênese, disponibilidade de fatores de crescimento, influência sobre o metabolismo e epigenoma das células tumorais, indução à imunossupressão, transição epitelio-mesenquimal e metástase (KRAMAN *et al.*, 2010; EREZ *et al.*, 2010; KALLURI, 2016).

Diversos estudos demonstram que a presença de CAF_s ativados no TME está associada a um pior prognóstico em múltiplos cânceres, associando-se diretamente a resistência farmacológica, fomento a metástase e incentivo à quadros recidivantes (FENG *et al.*, 2022).

Fibroblastos normais, quando co-injetados com células neoplásicas, promoveram maior crescimento tumoral em comparação com células tumorais isoladas (ORIMO; WEINBERG, 2006). Em carcinomas mamários, estudos apontam que até 80% dos fibroblastos estromais são modulados para o fenótipo de CAF (WINER; ADAMS; MIGNATTI, 2018). Ensaio *in vivo* evidenciaram que tumores co-injetados com CAF_s não só cresceram em menos tempo, mas também apresentaram maior vascularização e menor necrose do que tumores formados apenas por células tumorais (EREZ *et al.*, 2010). O estroma reativo do TME apresenta aumento expressivo de fibroblastos ativados, maior densidade capilar, acúmulo de fibrina e deposição anormal de colágeno tipo I, com um padrão mais rígido e contrátil (KALLURI, 2016). Essa constante desregulação da ECM resulta em alterações biomecânicas e bioquímicas que facilitam o crescimento, invasão e metástase tumoral (EBLE; NILAND, 2019). A deposição colagênica exacerbada constitui uma barreira física que protege as células tumorais, impedindo a infiltração de linfócitos citotóxicos no tumor, dificultando a ação

farmacológica e promovendo escape imune (SALMON *et al.*, 2012). A fibrose também eleva a pressão do fluido intersticial e reduz a penetração de quimioterápicos no tumor (HELDIN *et al.*, 2004).

Além de suas propriedades na manutenção e progressão das doenças neoplásicas, pesquisas também atribuem aos CAFs um papel relevante na iniciação tumoral. Em modelos murinos, o enxerto de células epiteliais prostáticas transformadas co-injetadas com CAFs levou ao desenvolvimento de neoplasias de grandes volumes, ao passo que, quando estas mesmas células neoplásicas eram co-injetadas com fibroblastos normais, não apenas o volume tumoral foi reduzido, como também a sua viabilidade, formando tumores transitórios sem suporte por neovascularização ou deposição de matriz alterada, culminando com a regressão da massa tumoral (OLUMI *et al.*, 2000).

Além dos efeitos evidentes sobre as células tumorais, o colágeno também influenciaativamente células infiltrantes, como linfócitos e macrófagos (XU *et al.*, 2019).

Além dos fatores solúveis, leucócitos infiltrantes decorrentes do processo inflamatório também contribuem para a modulação de fibroblastos em CAFs através de contato direto, mediado por moléculas de adesão como ICAM-1 e VCAM-1, destacando mais uma vertente de conexão entre a inflamação crônica, induzida pelo insulto tumorigênico ininterrupto e formação de um microambiente que propicia ainda mais a progressão tumoral (DVORAK, 1986).

Segundo Raskov *et al.* (2021) a modulação de fibroblastos para CAFs também pode ser desencadeada pelo acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS), comum em quadros de inflamação crônica e em processos neoplásicos, devido ao metabolismo tumoral desregulado pela alta taxa glicolítica e pela hipóxia. Esses radicais livres ativam vias intracelulares em fibroblastos locais, estimulando a expressão de fatores de crescimento como PDGF e TGF- β , induzindo a liberação de mais quimiocinas da família CXCL12. Fibroblastos residentes também podem estimular sua própria transformação em CAFs, ativando de forma autócrina a via TGF β /Smad (LYN *et al.*, 2021).

Em termos metabólicos, CAFs parecem mimetizar o estado glicolítico observado em células altamente proliferativas (VANDER; CANTLEY; THOMPSON, 2009). O grupo de pesquisa coordenado por Michael P. Lisanti (2014), atribui aos CAFs um conceito metabólico sinérgico as células tumorais, conhecido como Efeito Warburg Reverso, no qual, fibroblastos ativados sofrem reprogramações metabólicas induzidas por fatores do TME, como estresse oxidativo e sinalizações parácrinas mediadas por citocinas e exossomos, conduzindo-os a um estado semelhante de preferência por glicólise aeróbica (LIANG *et al.*, 2022).

Embora tais alterações metabólicas sejam amplamente descritas em tumores epiteliais, sobretudo em células carcinomatosas, há evidências de que sarcomas também exibem coexistência entre metabolismo glicolítico e fosforilação oxidativa mitocondrial. Estudos já observaram o aumento da expressão de marcadores como GLUT1 e HIF-1 α em mastocitomas, sugerindo o mesmo tipo de reprogramação metabólica (DEBERARDINIS *et al.*, 2008).

Além da ampla gama de funções atribuídas aos CAFs, evidências também os implicam em funções imunorregulatórias, que favorecem o estabelecimento de um estado imunossupressor, modulando o tráfego e o fenótipo de células imunes (MONTERAN; EREZ, 2019).

Mastócitos representam outra população celular com interações pró-tumorais significativas com os CAFs. Evidências provenientes de modelos *in vitro* e de tumores prostáticos humanos indicam que mastócitos podem induzir a diferenciação de fibroblastos residentes em CAFs, enquanto estes, por sua vez, recrutam mastócitos por eixos quimiocínicos como CXC12/CXCR4 (ELLEM *et al.*, 2014). Uma vez estimulados, mastócitos CXCR4+ secretam VEGFs, TGF- β , MMPs e IL-6, contribuindo para a agressividade tumoral e induzindo a transformação maligna de células epiteliais (QUAIL; JOYCE, 2013).

2.4 Macrófagos Associados ao Câncer

Os macrófagos são células fagocitárias profissionais, componentes da imunidade inata, de origem hematopoietica, tendo os monócitos circulantes como seus

precursores. Uma vez infiltrados nos tecidos, monócitos diferenciam-se em macrófagos especializados na detecção, fagocitose e destruição de componentes nocivos ao hospedeiro, fornecendo defesa imediata (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017). Após detectarem insultos teciduais estas células utilizam receptores de superfície, como os receptores Toll-like (TLRs), capazes de reconhecer componentes de patógenos, desencadeando cascatas de sinalização para produção de fatores solúveis, como citocinas, enzimas e mediadores inflamatórios que afetam não apenas o microambiente envolvido, mas também medeiam interações entre outros tipos celulares do sistema imune (MARTINEZ, 2008). Além de atuarem como componentes diretos na destruição de抗ígenos, macrófagos também são células apresentadoras (APCs), capazes de apresentar peptídeos抗ígenicos através do complexo de histocompatibilidade de classe II (MHC II), atuando principalmente na reativação de linfócitos T CD4+ previamente sensibilizados (HIRAYAMA; LIDA; NAKASE, 2017).

Assim como ocorre nos CAFs, essas células podem ser moduladas fenotípica e funcionalmente para perfis distintos envolvidos em papéis específicos. No TME, macrófagos são frequentemente desviados para perfis envolvidos em diversas vertentes pró-tumorais, fomentando o crescimento e progressão da doença (TAGLIAVINI, 2022).

Pesquisas indicam que existem ao menos dois estados principais distintos de ativação entre macrófagos, a ativação clássica, M1, envolvida no combate a patógenos e ações primordialmente anti-tumorais, e a ativação alternativa, M2, envolvida no reparo tecidual, imunossupressão e ação pró-tumoral (MANTOVANI *et al.*, 2002). Entre os componentes imunes do TME, os TAMs são frequentemente descritos como a população mais abundante e apresentam predominantemente fenótipos semelhantes ao perfil M2, frequentemente correlacionados a pior prognóstico (BIED *et al.*, 2023). Macrófagos M2 apresentam um perfil transcricional distinto daqueles M1, com capacidade de secreção de citocinas, quimiocinas e vias de ativação metabólicas próprias, desempenhando funções fundamentais na progressão da tumorigênese, atuando como promotores de proliferação e invasividade celular, fomentando a angiogênese, metástase e resistência farmacológica, e atuando ainda na liberação de fatores de crescimento que induzem

a progressão da doença tumoral, como VEGF e MMPs (VITALE *et al.*, 2019; CHEN; *et al.*, 2021).

TAMs também são associados a características biológicas em neoplasias caninas; Raposo *et al.* (2013) e Withers *et al.* (2019), correlacionaram a maior infiltração de macrófagos com diminuição na sobrevida e com o menor intervalo livre de doença em neoplasias mamárias e osteossarcomas.

Há evidências de que diferentes morfologias de macrófagos refletem distintos estados de polarização, sendo os de perfil M1 mais propensos a assumir formas arredondadas, enquanto os M2 tendem para uma morfologia mais alongada e fusiforme (MCWHORTER *et al.*, 2013; DONADON *et al.*, 2020). Corroborando essa teoria, o estudo de Bertola *et al.* (2024), buscou investigar a presença de TAMs em mastocitomas caninos, observando que em todos os mastocitomas avaliados, macrófagos Iba1+ foram a principal população celular infiltrante, representando até 14% da área tumoral, dados compatíveis com os de oncologia humana. Adicionalmente, os autores observaram um predomínio de macrófagos estrelados e fusiformes, principalmente em linfonodos metastáticos, sugerindo um perfil de ativação semelhante ao M2 ao passo que, em mastocitomas não metastáticos, a predominância observada foi de macrófagos com morfologias mais esféricas e arredondadas, sugerindo um perfil de ativação semelhante a M1 (BERTOLA *et al.*, 2024).

TAMs estão vinculados a uma hiperexpressão de ligantes inibitórios como a PD-L1, atuando como freios imunológicos que levam os linfócitos T CD8+ a um estado de exaustão funcional, comprometendo sua capacidade de atacar as células tumorais (PAN *et al.*, 2020).

Atualmente, reconhece-se que TAMs raramente exibem fenótipos M1 e M2 “puros”, e diversos subtipos já foram descritos, como M2a, M2b, M2c, M2d, cada qual com uma combinação distinta de perfis secretores, daí a preferência da literatura pela denominação “semelhante a M1 ou M2”, sugerindo possíveis modulações fenotípicas mais próximas a polarização M1 ou M2 (SICA *et al.*, 2008).

Em cães, a caracterização imunofenotípica dos macrófagos é limitada, uma vez que não há anticorpos amplamente validados para a diferenciação inequívoca entre

M1 e M2 na espécie (MONTEIRO *et al.*, 2021). Do ponto de vista morfológico, essa diferenciação também não é fidedigna, uma vez que macrófagos em diferentes estados de ativação podem apresentar morfologias semelhantes nas preparações histológicas convencionais (MANTOVANI, 2017).

O anticorpo que reconhece Iba1 (*Ionized calcium-binding adaptor molecule 1*) é amplamente empregado como marcador pan-macrófágico, permitindo a identificação geral dessas células no tecido, sem distinção funcional quanto ao perfil de ativação (MONTEIRO *et al.*, 2021).

No âmbito tumoral, é atualmente aceito que a população de TAMs derive de duas populações macrofágicas distintas, sendo uma delas, a de macrófagos residentes teciduais derivados da linhagem embrionária, e outra proveniente da diferenciação de monócitos da medula óssea (MANTOVANI *et al.*, 2022; TAGLIAVINI, 2025).

A acidificação do meio provocada pelo alto nível de ácido láctico proveniente do metabolismo tumoral e das células estromais, além da privação de nutrientes e inerente hipóxia associada ao TME, também estão entre os componentes de destaque neste processo (TAGLIAVINI, 2025).

Estudos indicam que a hipóxia perene no microambiente tumoral pode exercer uma pressão significativa na transição fenotípica de macrófagos; a secreção de citocinas como endotelina e VEGF, pelas células cancerosas, sobretudo em áreas hipóxicas e necróticas do TME, é uma grande responsável pelo povoamento de TAMs semelhantes a M2, que uma vez atraídos e modulados, perpetuam os sinais angiogênicos, amplificando o processo e reforçando a neovascularização local (LEWIS; MURDOCH, 2005).

Uma vez polarizados para o perfil M2, TAMs intensificam a hipóxia microambiental, estimulando a formação de vasos aberrantes, ineficientes no transporte de oxigênio, ou remodelando e densificando o estroma, o que comprime a vasculatura, dificultando a perfusão (LEWIS; MURDOCH, 2005).

Ao promover a acidificação do meio, células tumorais inibem as vias glicolíticas das células estromais em detrimento da ativação de genes vinculados a fosforilação oxidativa e oxidação de ácidos graxos, como resultado, células infiltrantes do estroma tumoral, como os macrófagos M2, deixam de ser competidoras, “economizando”

glicose e deixando-as disponíveis para o metabolismo de células tumorais e células Tregs, que também preferem vias glicolíticas, perpetuando o estado imunossupressor e sustentando o crescimento tumoral (COLEGIO *et al.*, 2014).

Uma vez estabelecidos, macrófagos M2 estão envolvidos em uma gama de vertentes pró-tumorais, contribuindo para angiogênese, linfangiogênese, supressão imunológica, tumorigênese induzida por hipóxia, secreção de fatores de crescimento, metaloproteinases, metástase, resistência farmacológica, dentre outros, assumindo papéis relevantes desde a iniciação tumoral até sua progressão para nichos secundários (HAO *et al.*, 2012).

Em tumores mamários, por exemplo, a maior expressão de TAMs correlacionou-se positivamente com invasão celular, metástase linfonodal, aumento da angiogênese e menor sobrevida (MONTEIRO *et al.*, 2021).

Já em sarcomas de tecidos moles caninos, a maior infiltração de TAMs foi relacionada ao maior grau histológico e maior atividade proliferativa tumoral (MONTEIRO *et al.*, 2021; TAGLIAVINI, 2025).

TAMs também estão envolvidos ativamente no remodelamento da ECM, degradando componentes da matriz com suas MMPs, aumentando sua rigidez através de ação enzimática, e reorganizando fibras de colágeno, atuando de maneira associada aos CAFs na confecção de um estroma construído a favor da manutenção tumoral (AFIK *et al.*, 2016; MADSEN *et al.*, 2017).

De fato, a correlação entre o recrutamento de TAMs durante a progressão tumoral e as taxas metastáticas é evidenciada por diversos autores (QIAN *et al.*, 2009; DENARDO *et al.*, 2009; LIN *et al.*, 2001; MANTOVANI *et al.*, 2017).

Camundongos nocautes para o gene CSf1, um fator de crescimento macrofágico importante, apresentam um grande atraso no desenvolvimento de carcinomas metastáticos (LIN *et al.*, 2001). Em pacientes com câncer pancreático, macrófagos polarizados para o perfil M2 foram associados ao crescimento acelerado de metástases hepáticas (YOSHIKAWA *et al.*, 2012). Em modelos murinos, o bloqueio no recrutamento de TAMs através de anticorpos neutralizantes, reduziu a carga metastática em cânceres de pulmão e fígado (AUGUSTE *et al.*, 2007).

Dessa maneira, concentrações elevadas de TAMs no TME estão geralmente associadas a piores prognósticos e a baixa sensibilidade ao tratamento em diversos tipos tumorais (DENARDO *et al.*, 2009; CASSETA; POLLARD, 2018).

Analogamente às novas perspectivas terapêuticas direcionadas aos CAFs, TAMs também têm sido alvo de inúmeras pesquisas de cunho translacional e oncológico, visando à sua modulação ou reprogramação como estratégia de intervenção antitumoral (CENDROWICZ *et al.*, 2021).

A repolarização dos TAMs para um fenótipo pró-inflamatório semelhante a M1 parece restaurar, ao menos parcialmente, sua capacidade citotóxica direta e estimular respostas imunológicas do tipo Th1, configurando uma abordagem terapêutica promissora (PATHRIA; LOUIS; VARNER, 2019)

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Amostras

Foram analisadas 31 amostras de mastocitomas cutâneos caninos e 21 linfonodos sentinelas e/ou regionais, incluindo amostras recém excisadas e emblocadas, que passaram por avaliação macroscópica, processamento histológico e coloração, provenientes dos serviços de patologia cirúrgica dos hospitais veterinários Hvet-UNIP/SP e Vet Popular, mediante autorização dos tutores pela assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). As amostras coletadas foram imediatamente imersas em solução de formol a 10%, e fixadas por ao menos 24 horas para posterior emblocagem em parafina e realização de cortes histológicos de 4 μ m para diagnóstico microscópico. Os cortes de pele foram submetidos às colorações pela hematoxilina-eosina e tricrômico de Masson. No caso dos linfonodos, além da hematoxilina-eosina também foi empregada a coloração pelo azul de toluidina, para evidenciação da metacromasia em grânulos citoplasmáticos, auxiliando na identificação dos mastócitos. O estudo adotou como único critério de inclusão a confirmação histopatológica de mastocitoma cutâneo. Não houveram critérios de

exclusão ou restrição quanto a raça, gênero ou idade. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) sob o número de protocolo 3141101224.

3.2 Avaliação histopatológica

Todas as amostras cutâneas foram submetidas a diagnóstico e graduação histopatológica de malignidade de acordo com o protocolo estabelecido por Kiupel e colaboradores (2010), no qual as lesões tumorais são identificadas como de baixo ou alto grau segundo parâmetros estabelecidos pelos autores, e os linfonodos classificados de acordo com o protocolo de Weishaar e colaboradores (2014), como livres de metástase (HN0), pré-metastáticos (HN1), e metastáticos (HN2-3).

As lâminas foram examinadas por 2 avaliadores em fotomicroscópio OPTICAM® acoplado à câmera digital, OPUHD 14.3MP.

3.3 Avaliação histoquímica - tricrômico de Masson

Cortes histológicos de mastocitomas cutâneos foram submetidos à coloração pelo tricrômico de Masson permitindo a evidenciação das fibras colágenas coradas em azul. Para a quantificação da deposição colagênica nas lesões foram selecionados 5 campos de grande aumento (objetiva de 40x), para cada caso, em áreas tumorais com a maior intensidade de marcação (“hot spots”). A partir destes foram obtidas imagens digitalizadas, com o emprego do fotomicroscópio OPTICAM® acoplado à câmera digital, OPUHD 14.3MP. Com o auxílio do software de análise de imagem ImageJ (National Institutes of Health; Bethesda, MD, EUA), foi mensurado o percentual da área ocupada por colágeno por campo, permitindo o cálculo do índice de colágeno (ICo), obtido a partir da média dos cinco campos avaliados em cada caso (DANIEL *et al.*, 2019).

3.4 Procedimento imuno-histoquímico

Foram realizados, nas amostras em que dispúnhamos de graduação histológica e classificação nodal, cortes de aproximadamente 4 µm, submetidos a desparafinização na estufa a 60-65°C por uma hora, posteriormente passando por uma bateria de Xitol e diluições decrescentes de álcool. Seguiu-se a recuperação antigênica por calor durante um minuto a 125°C na panela elétrica Decloacker. Após resfriamento da solução, procedeu-se a lavagem das lâminas em solução TBS. Em sequência o material foi submetido a bloqueio da peroxidase endógena por cinco minutos, seguindo-se lavagem das lâminas com TBS. Em sequência as amostras foram incubadas com os anticorpos primários, overnight. Como anticorpo secundário foi utilizado o sistema EnvisionFlex. Seguiu-se lavagem com solução TBS/água deionizada e a revelação procedida com emprego da diaminobenzidina (DAB) e a contracoloração com Hematoxilina de Harris por 15 minutos. Os anticorpos empregados, suas origens e reatividade estão listados no quadro 1.

Quadro 1 - Painel de marcadores imuno-histoquímicos

Anticorpo	Natureza	Origem	Reatividade	Clone	Fabricante
Alfa actina de músculo liso	Monoclonal	Camundongo	Anti-humano	1a4	DAKO
Iba1	Policlonal	Coelho	Anti-humano		Fujifilm Wako

As lâminas foram examinadas em microscópio óptico Opticam® acoplado à câmera, obtendo-se imagens digitalizadas, com o emprego do fotomicroscópio OPTICAM® acoplado à câmera digital, OPUHD 14.3MP, para documentação dos achados e morfometria.

3.4.1 Avaliação imuno-histoquímica – macrófagos associados ao tumor (Iba1+)

Dezesseis amostras foram submetidas ao procedimento, das quais quatorze mostraram-se adequadas para quantificação. A imunomarcação para Iba1, foi caracterizada pela presença de material intracitoplasmático castanho, frequentemente em padrão granular.

As imagens obtidas foram submetidas a quantificação celular manual em objetiva de 60x, selecionando-se 3 campos para cada caso, permitindo a contagem de células imunopositivas (TAMs) e mastócitos, gerando o índice macrofágico (Ima), cujo valor final foi obtido através da relação entre a somatória de macrófagos em função da somatória de mastócitos nos três campos quantificados:

$$Ima = \frac{\Sigma \text{ macrófagos Iba1 (3 campos)}}{\Sigma \text{ mastócitos neoplásicos (3 campos)}}$$

3.4.2 Avaliação imuno-histoquímica – miofibroblastos (α SMA+)

Dezesseis amostras foram submetidas ao procedimento, das quais doze mostraram-se adequadas para quantificação. A imunomarcação para alfa actina de músculo liso (1a4+), foi caracterizada pela presença de material intracitoplasmático castanho. As imagens obtidas foram submetidas a quantificação celular manual das células imunomarcadas em objetiva de 60x, selecionando-se 5 campos contíguos para cada caso, partindo de áreas com maior concentração de células imunopositivas (“hot spots”).

3.5 Tratamento Estatístico

A avaliação estatística foi realizada com o emprego do software GraphPad Prism 9®. Todas as lâminas que tiveram seus parâmetros estromais analisados, índice macrofágico, população miofibroblástica e índice colagênico, foram confrontadas com os graus histopatológicos de seus respectivos casos, pelo sistema de dois grupos (baixo grau x alto grau) em um primeiro momento, e posteriormente com a presença ou ausência de metástase nodal (HN0 x HN2-3), ambos com o emprego do teste T de Student não pareado, considerando-se $p \leq 0,05$.

4. RESULTADOS

O estudo compreendeu a avaliação de mastocitomas cutâneos de 29 cães, totalizando 31 lesões, considerando que um dos cães apresentava 3 formações distintas, que foram avaliadas independentemente.

Prevaleceram animais sem raça definida (SRD) (15 de 29; 51,7%), fêmeas (20 de 29; 69%), com idade média de 9,5 anos (Figuras 3 a 7). A localização anatômica mais frequente da neoplasia foi a região do tronco (15 de 31; 48,3%) (Figura 8). As informações acerca dos casos avaliados estão descritas no Quadro 2.

Quadro 2. Dados clínicos, localização e graduação histopatológica das neoplasias primárias e dos linfonodos avaliados. provenientes de Hospitais Veterinários localizados na cidade de São Paulo no período de 2023 e 2025.

Caso	Raça	Idade (anos)	Gênero	Tumor Primário	Graduação Histopatológica	Classificação Nodal
1	SRD	8	F	Perivulvar	Baixo	HN0
2	Labrador Retriever	8	F	Pavilhão auricular	Alto	HN3
3	Pinscher	12	F	Mama	Baixo	HN1
4	Pitbull Terrier	5	M	Dorso	Baixo	HN2
5	SRD	10	M	Tórax	Alto	HN2
6	Buldogue Francês	-	M	Pavilhão auricular	Baixo	HN3
7	Labrador Retriever	8	F	-	Baixo	-
8	Pinscher	5	F	Dorso	Baixo	-
9	SRD	4	F	Coxim	Baixo	-
10	Maltês	7	F	-	Baixo	HN0
11	Shih Tzu	15	F	Mama	Baixo	-
12	Golden Retriever	-	M	Flanco	Baixo	HN0
13	SRD	-	F	Membro pélvico	Baixo	HN1
14	Pitbull Terrier	11	M	Membro pélvico	Baixo	HN0
15	SRD	6	F	Abdome	Baixo	-
16	SRD	12	F	-	Baixo	-
17-A	Golden Retriever	9	M	Flanco	Baixo	HN0
17-B	Golden Retriever	9	M	Axila	Baixo	HN0
17-C	Golden Retriever	9	M	Tórax	Baixo	HN0
18	SRD	14	F	Cotovelo	Baixo	-
19	Yorkshire Terrier	11	F	Cervical	Baixo	-
20	SRD	10	F	Membro pélvico	Alto	HN3
21	Dogo Argentino	7	F	Membro pélvico	Baixo	HN2
22	SRD	-	F	Membro pélvico	Alto	HN0
23	SRD	14	M	Tórax	Baixo	HN0
24	SRD	5	F	Dígi	Alto	HN2
25	SRD	9	F	Membro torácico	Baixo	HN3
26	SRD	-	F	Flanco	Baixo	HN0
27	Pitbull Terrier	10	F	Mama	Alto	HN0
28	SRD	15	M	Peitoral	Alto	HN3
29	SRD	13	M	Membro pélvico	Baixo	HN0

As amostras descritas como "A, B e C" são provenientes do mesmo animal, porém, são tumorações distintas, avaliadas independentemente.

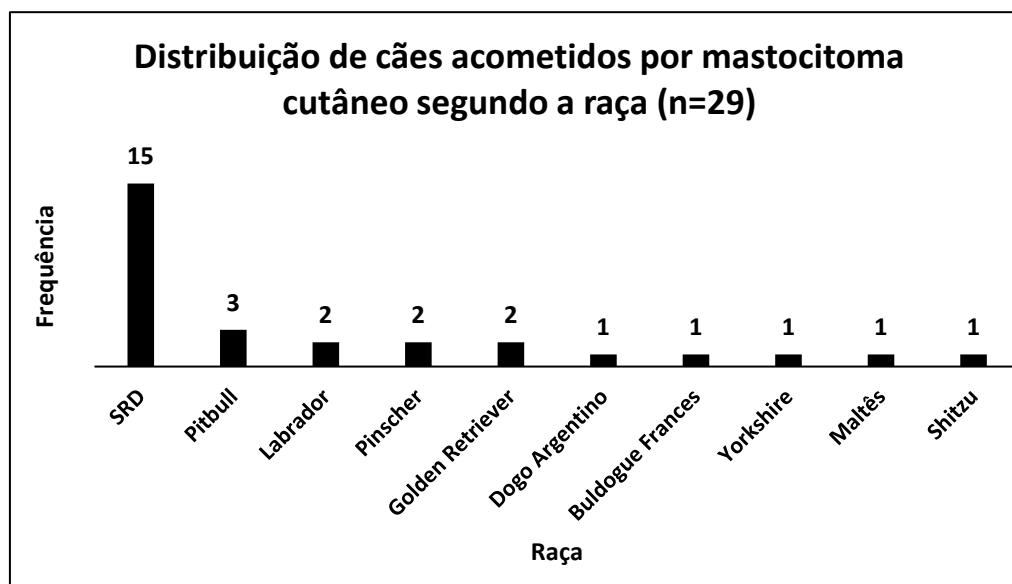


Figura 3. Frequência das raças de cães acometidas por mastocitoma cutâneo provenientes de Hospitais Veterinários localizados na cidade de São Paulo no período de 2023 e 2025.

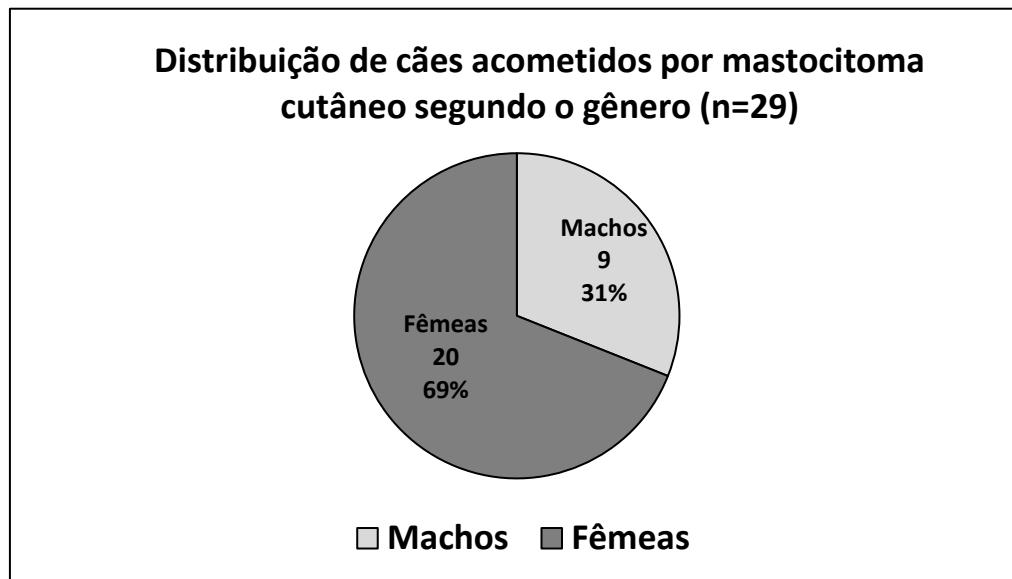


Figura 4. Proporção de machos e fêmeas acometidos por mastocitoma cutâneo provenientes de Hospitais Veterinários localizados na cidade de São Paulo no período de 2023 e 2025.

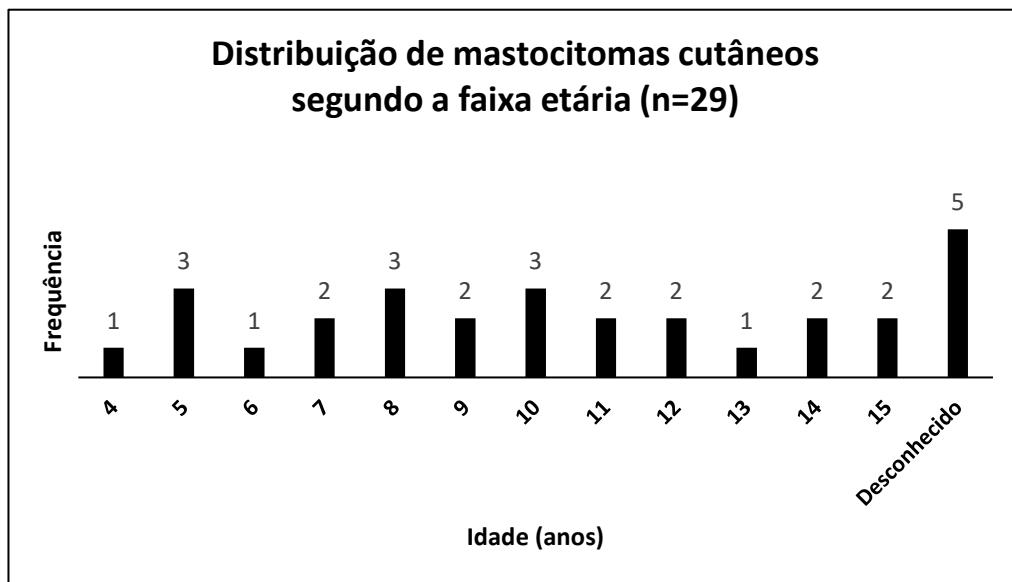


Figura 5. Frequência das faixas etárias de cães acometidos por mastocitoma cutâneo provenientes de Hospitais Veterinários localizados na cidade de São Paulo no período de 2023 e 2025.

A figura 6 e 7 confere uma classificação etária com base em critérios específicos para cada porte, uma abordagem fundamentada no fato de que cães de porte pequeno atingem a senilidade em idades mais avançadas, enquanto cães de maiores portes apresentam envelhecimento mais precoce, assegurando assim maior acurácia biológica nas comparações. Os animais sem raça definida (SRD) não foram incluídos nessa categorização devido à heterogeneidade fenotípica intrínseca ao grupo, o que dificulta a determinação acurada do porte real e, consequentemente, dos respectivos limites etários (BONAGURA; KIRK, 2009).

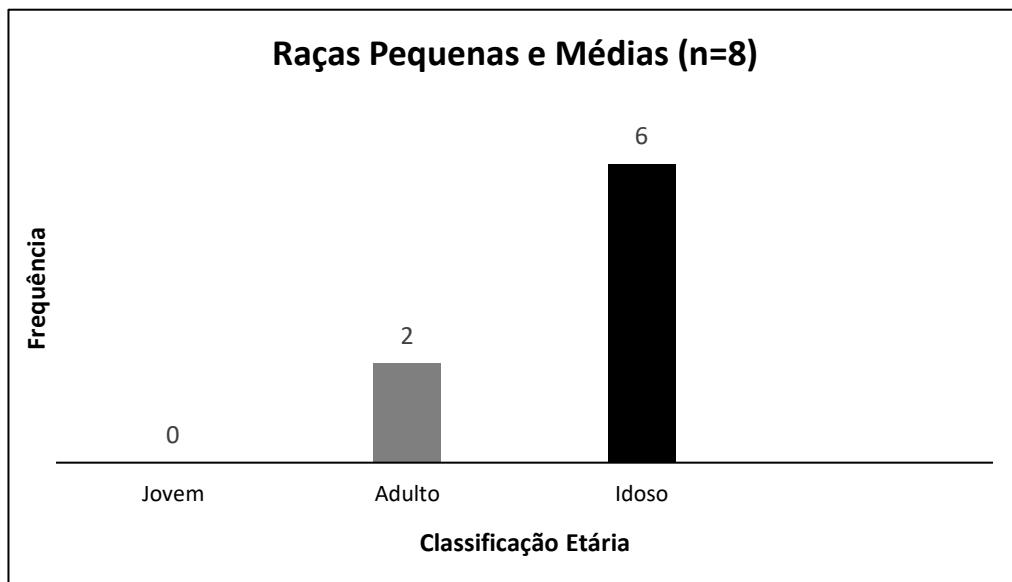


Figura 6. Frequência de cães de porte pequeno e médio acometidos por mastocitoma cutâneo segundo a classificação etária, provenientes de Hospitais Veterinários localizados na cidade de São Paulo no período de 2023 e 2025.

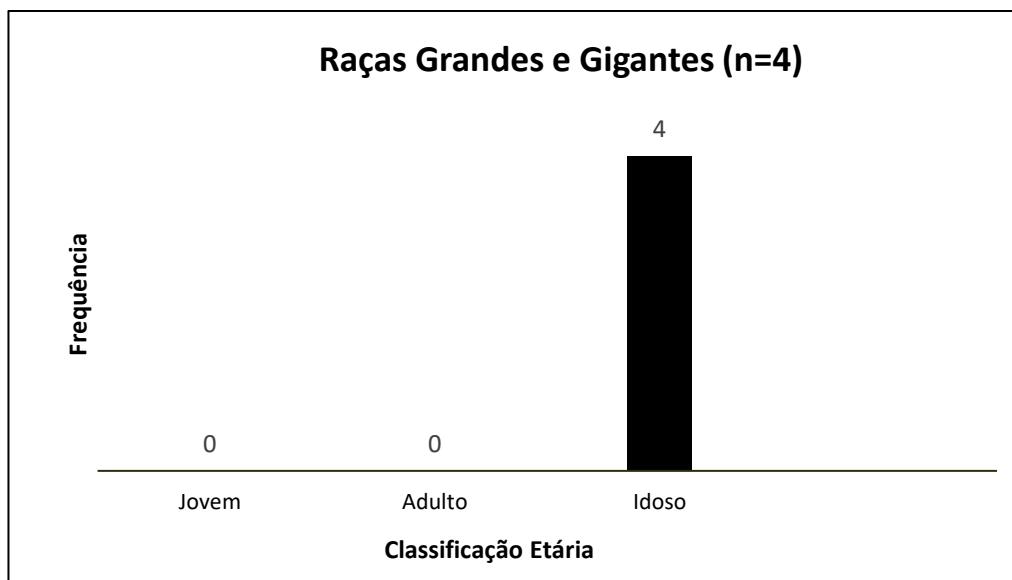


Figura 7. Frequência de cães de porte grande e gigante acometidos por mastocitoma cutâneo segundo a classificação etária, provenientes de Hospitais Veterinários localizados na cidade de São Paulo no período de 2023 e 2025.

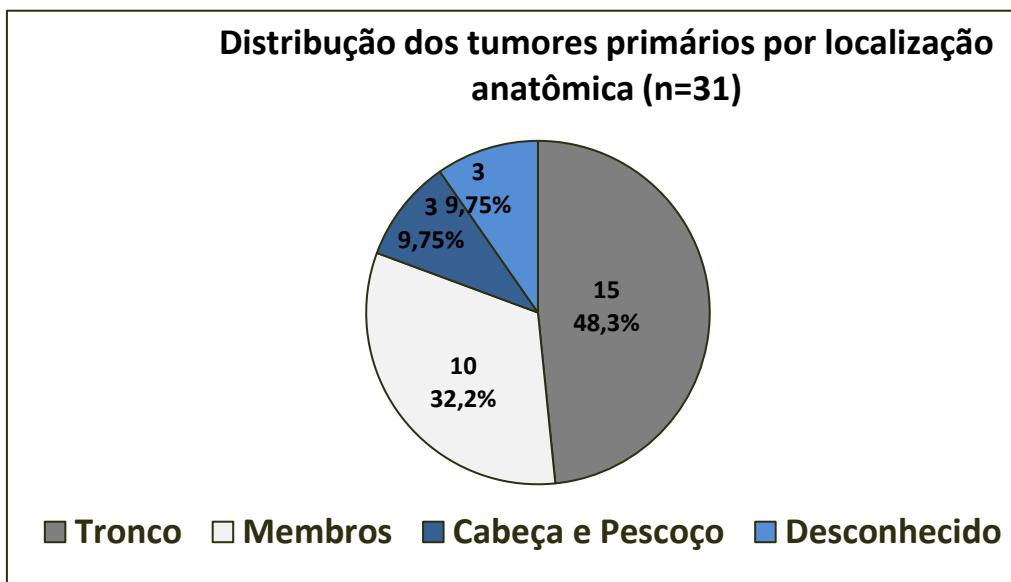


Figura 8. Proporção das regiões anatômicas comprometidas por mastocitomas cutâneos provenientes de Hospitais Veterinários localizados na cidade de São Paulo, no período de 2023 e 2025.

Em relação à graduação histopatológica, a maioria das lesões foi classificada como tumores de baixo grau (24 de 31; 77%), conforme evidenciado na Figura 9.

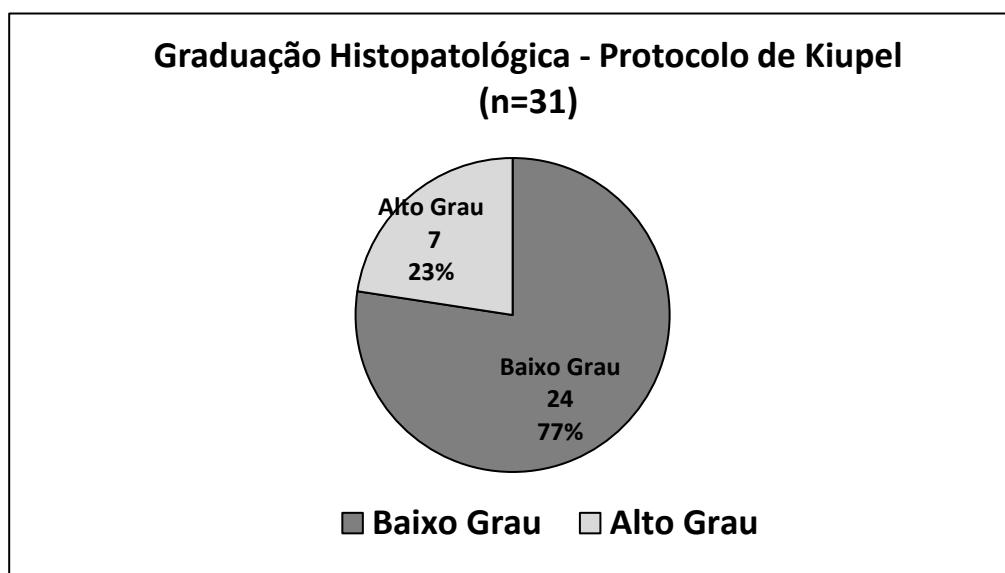


Figura 9. Proporção de mastocitomas cutâneos graduados em baixo e alto grau segundo o protocolo estabelecido por Kiupel *et al.* (2010) provenientes de Hospitais Veterinários localizados na cidade de São Paulo, no período de 2023 e 2025.

No que diz respeito à classificação linfonodal, a maioria dos casos foram classificados como HN0 (10 de 21; 47,5%), como pode ser observado na Figura 10.

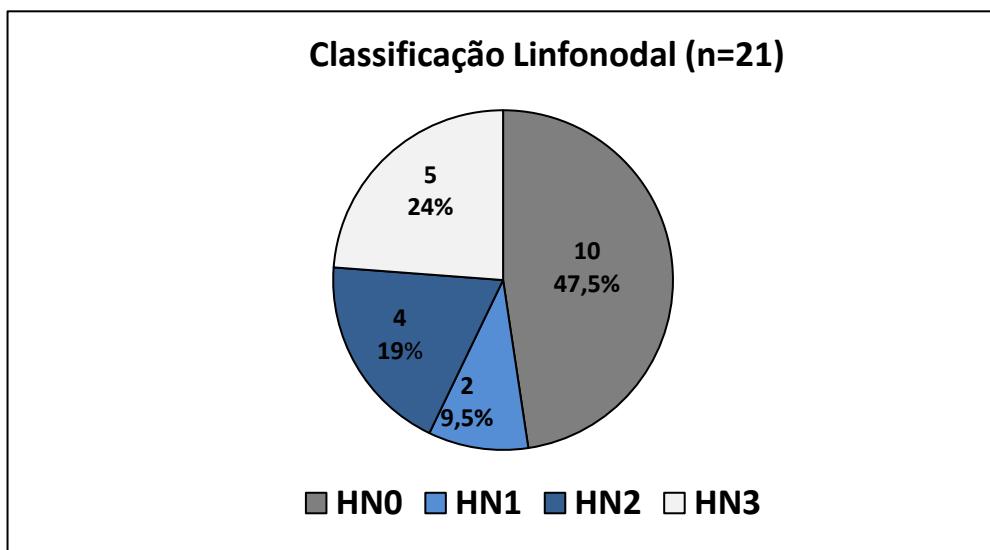


Figura 10. Proporção de linfonodos classificados segundo o protocolo de Weishhaar *et al.* (2014) provenientes de Hospitais Veterinários localizados na cidade de São Paulo, no período de 2023 e 2025

Entre os casos graduados histopatologicamente como baixo grau de Kiupel, a maioria apresentou linfonodos classificados como HN0 (8 de 14; 57,1%), conforme Figura 11.

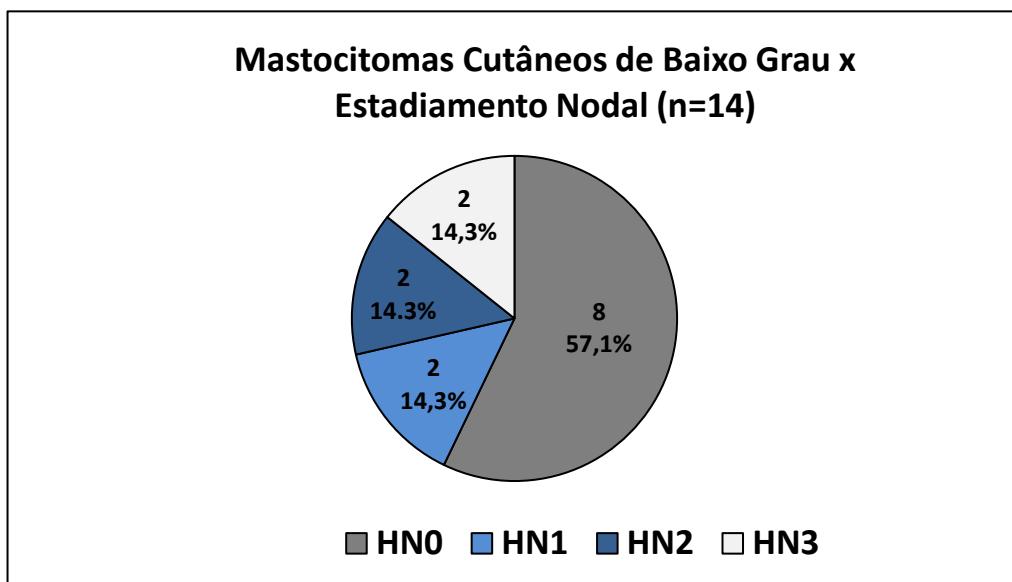


Figura 11. Proporção da classificação nodal nos casos graduados como baixo grau, provenientes de Hospitais Veterinários localizados na cidade de São Paulo, no período de 2023 e 2025.

Já para os casos graduados histopatologicamente como alto grau de Kiupel, a maioria apresentou linfonodos classificados como HN3 (3 de 7; 43%), conforme Figura 12.

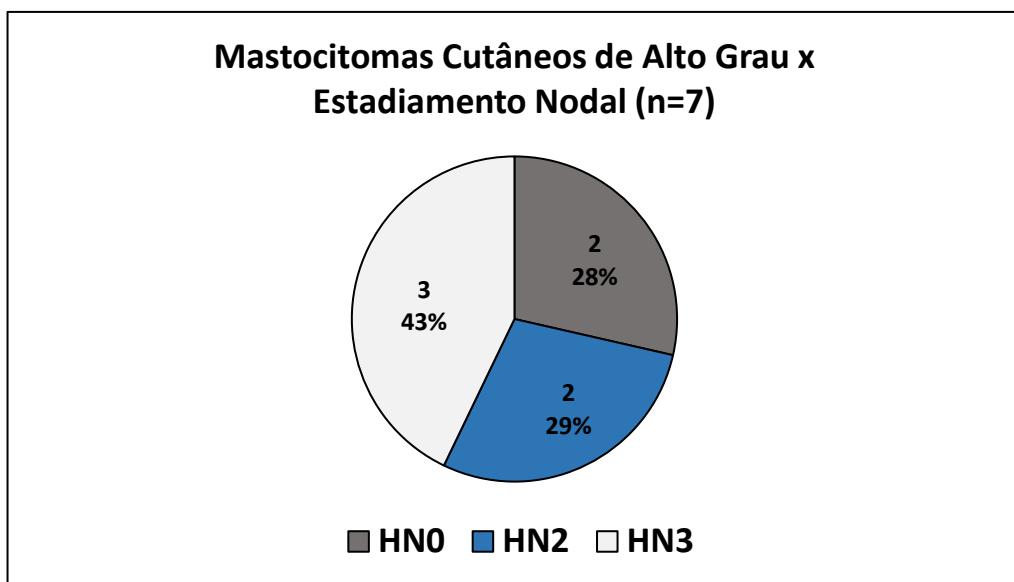


Figura 12. Proporção da classificação nodal nos casos graduados como alto grau provenientes de Hospitais Veterinários localizados na cidade de São Paulo, no período de 2023 e 2025.

Cortes histológicos corados em HE foram analisados, permitindo a diferenciação entre os padrões de baixo e alto grau segundo os critérios de Kiupel. As figuras 13 e 14 evidenciam diferenças morfológicas entre os graus de malignidade, destacando-se a arquitetura relativamente ordenada, maior uniformidade celular e nuclear, baixa celularidade e discreto pleomorfismo nos casos de baixo grau, em contraste com a marcante desorganização tecidual, intensa atipia citonuclear e elevada densidade celular observadas nos tumores de alto grau.

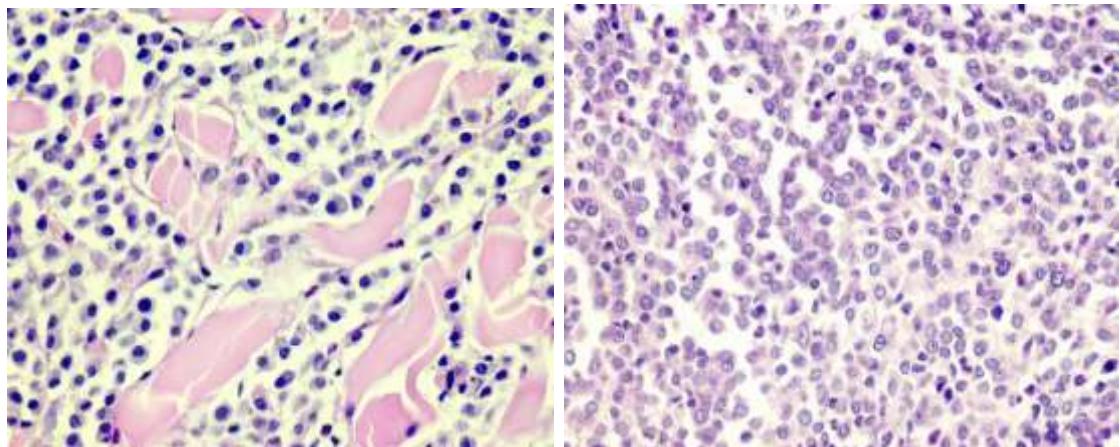


Figura 13. Fotomicrografia de corte histológico de mastocitoma de baixo grau, HN0, evidenciando a menor celularidade e o discreto pleomorfismo citonuclear. Hematoxilina-eosina, objetiva 40x

Figura 14. Fotomicrografia de corte histológico de mastocitoma de alto grau, HN3, evidenciando abundante colonização por mastócitos neoplásicos com intensa atipia citonuclear. Hematoxilina-eosina, objetiva 40x

A análise histológica das lâminas marcadas por imuno-histoquímica, permitiu não apenas caracterizar morfologicamente a distribuição das células tumorais como também identificar as populações celulares estromais de interesse. As figuras 15 a 18 apresentam fotomicrografias de cortes histológicos de mastocitomas de baixo e alto grau, classificados respectivamente como HN0 e HN3, nas quais é possível observar a disposição de macrófagos positivos para iba-1 e miofibroblastos positivos para actina de músculo liso (ambos marcados em castanho) entre o grupo de células neoplásicas. Vale a referência à morfologia frequentemente alongada da população macrofágica infiltrante.

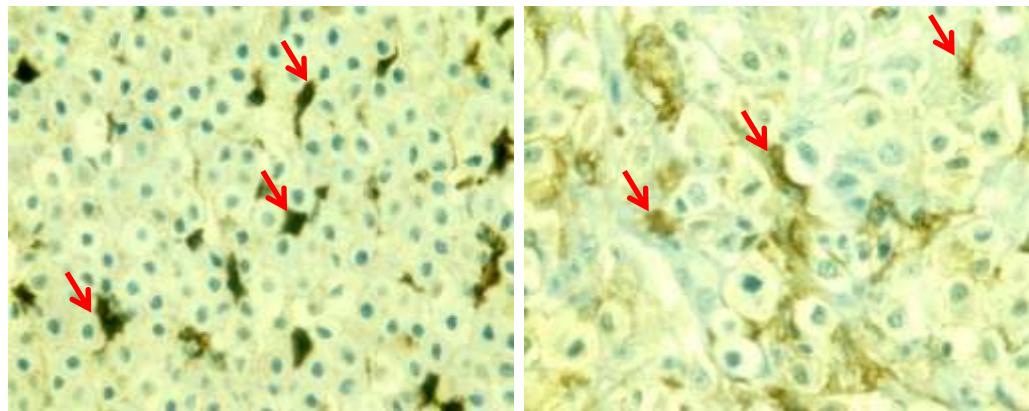


Figura 15. Fotomicrografia de corte histológico de mastocitoma de baixo grau, HN0, evidenciando disposição de macrófagos positivos para iba-1 (setas), entre grupos de células neoplásicas. DAB contracorada com hematoxilina, objetiva 60x.

Figura 16. Fotomicrografia de corte histológico de mastocitoma de alto grau, HN3, evidenciando disposição de macrófagos positivos para iba-1 (setas), entre grupos de células neoplásicas. DAB contracorada com hematoxilina, objetiva 60x.

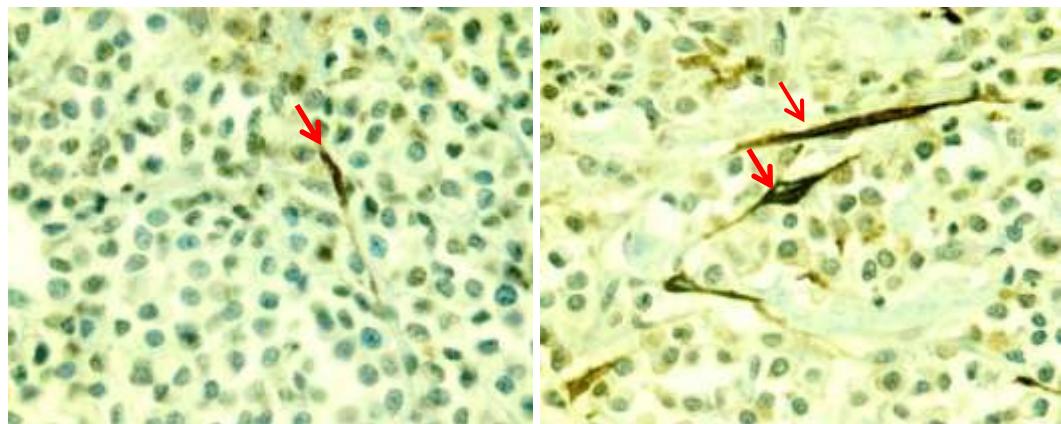


Figura 17. Fotomicrografia de corte histológico de mastocitoma de baixo grau, HN0, evidenciando disposição de miofibroblasto positivo para actina de músculo liso (setas), entre grupos de células neoplásicas. DAB contracorada com hematoxilina, objetiva 60x.

Figura 18. Fotomicrografia de corte histológico de mastocitoma de alto grau, HN3, evidenciando disposição de miofibroblastos positivos para actina de músculo liso (setas), entre grupos de células neoplásicas. DAB contracorada com hematoxilina, objetiva 60x.

Ambos, índice macrofágico e contagem miofibroblástica, não apresentaram diferenças estatísticas significantes em relação à graduação histopatológica (Figuras 19 e 20).

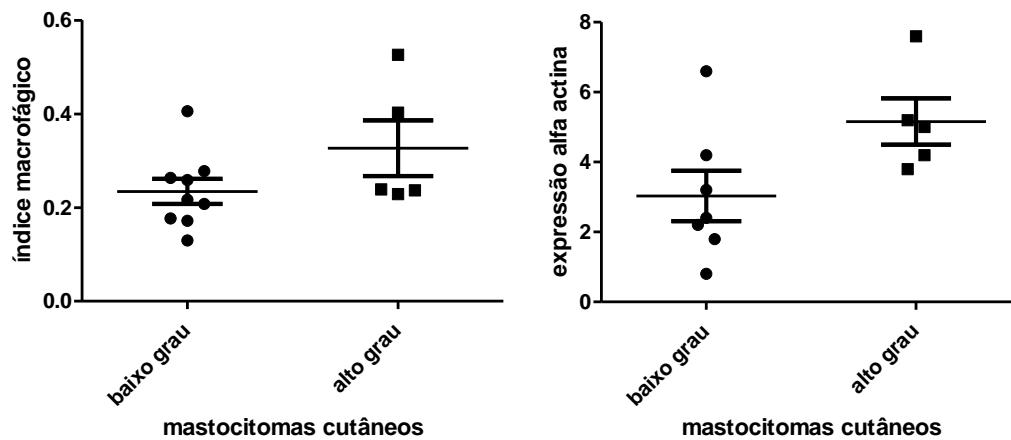


Figura 19. Quantificação macrofágica em cães portadores de mastocitomas cutâneos de baixo e alto grau de malignidade, a partir de cortes submetidos à imunomarcação com anticorpo iba1, evidenciando ausência de diferença estatisticamente significante entre os grupos, $p>0,05$ ($n=14$).

Figura 20. Quantificação miofibroblástica em cães portadores de mastocitomas cutâneos de baixo e alto grau de malignidade, a partir de cortes submetidos à imunomarcação com anticorpo para alfa actina de músculo liso, evidenciando ausência de diferença estatisticamente significante entre os grupos, $p>0,05$ ($n=12$).

Em contrapartida, para ambos, observou-se correlação significativa entre linfonodos metastáticos e não metastáticos, com aumento da infiltração associada à disseminação tumoral ($p<0,05$, teste T de Student não pareado), (Figuras 21 e 22).

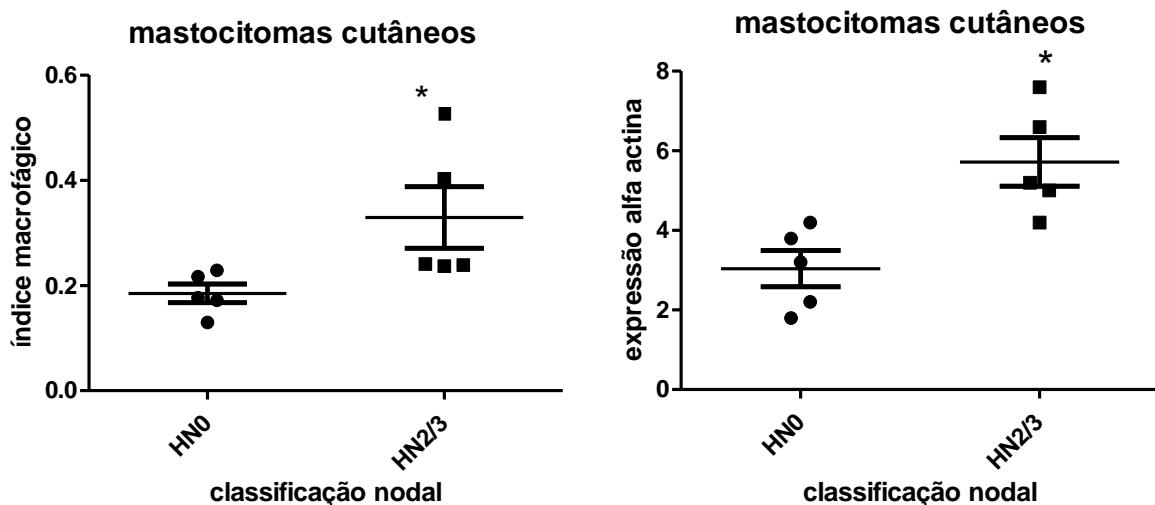


Figura 21. Quantificação macrofágica em cães com linfonodos estadiados e classificados em metastáticos ou não metastáticos, a partir de cortes submetidos à imunomarcação com anticorpo iba1, evidenciando presença de diferença estatisticamente significante entre os grupos, $p<0,05$ ($n=10$).

Figura 22. Quantificação miofibroblástica em cães com linfonodos estadiados e classificados em metastáticos ou não metastáticos, a partir de cortes submetidos à imunomarcação com anticorpo para alfa actina de músculo liso, evidenciando presença de diferença estatisticamente significante entre os grupos, $p<0,05$ ($n=10$).

Já para a análise histoquímica, realizada a partir do tricrômico de Masson, foi possível observar os feixes de fibras colagênicas (azul) dispostas entre os agrupamentos de células neoplásicas (Figura 23).

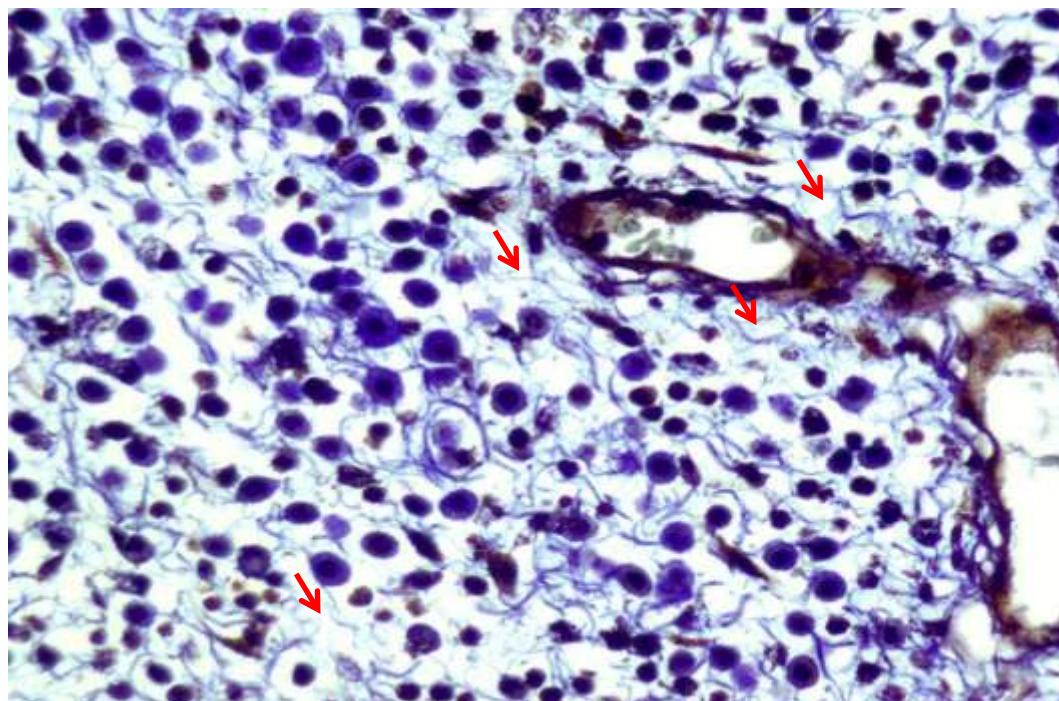


Figura 23. Fotomicrografia de corte histológico de mastocitoma de baixo grau, evidenciando delicada deposição de fibras colágenas coradas em azul (setas), em meio a agregados de células neoplásicas. Tricrômico de Masson, objetiva 40x.

A quantificação do percentual de área ocupada pelas fibras colagênicas e sua posterior correlação com as graduações histopatológicas e os estadiamentos nodais não revelaram significância estatística (Figuras 24 e 25).

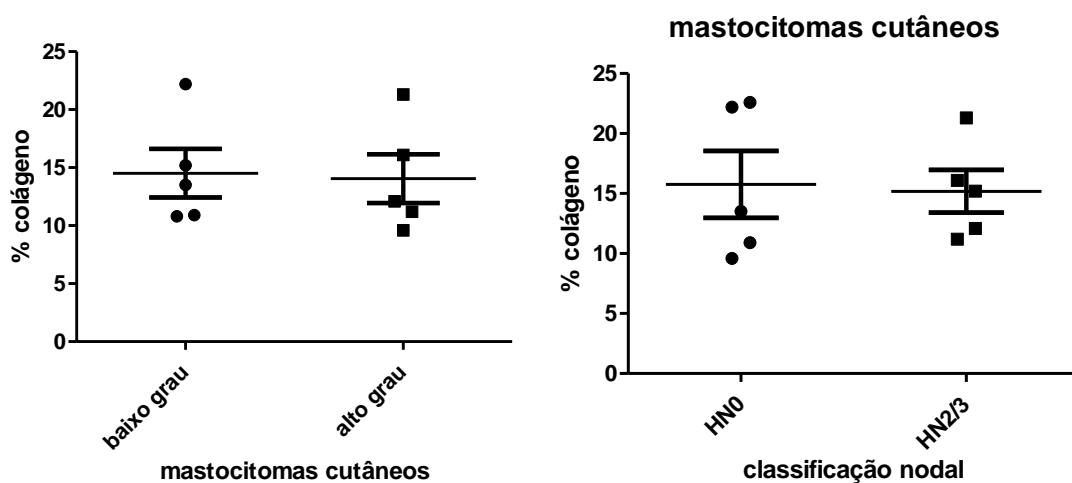


Figura 24. Quantificação percentual da deposição colagênica em cães portadores de mastocitomas cutâneos de baixo e alto grau de malignidade, a partir de cortes submetidos a coloração histoquímica por tricrômico de Masson, evidenciando ausência de diferença estatisticamente significante entre os grupos, $p>0,05$ ($n=10$).

Figura 25. Quantificação percentual da deposição colagênica em cães com linfonodos estadiados e classificados em metastáticos ou não metastáticos, a partir de cortes submetidos a coloração histoquímica por tricrômico de Masson, evidenciando ausência de diferença estatisticamente significante entre os grupos, $p>0,05$ ($n=10$).

5. DISCUSSÃO

O câncer é hoje compreendido como um espectro de doenças distintas, tornando-o altamente diversificado e imprevisível, marcado por inúmeras variáveis que o moldam de maneira única, tanto em relação a miríade de diferentes tumores possíveis, cada qual com suas peculiaridades, como também entre os diferentes indivíduos acometidos por um mesmo tipo tumoral, culminando em processos de caráter multifacetado e de complexo manejo (HANAHAN, 2022). Recentemente, a interação entre células tumorais e o microambiente tumoral tem atraído grande interesse científico envolvendo um número crescente de terapias direcionadas a essas interações (COSTA *et al.*, 2018).

Embora imprescindíveis, os sistemas de graduação histomorfológicos apresentam limitações, não sendo capazes de prever de forma acurada o comportamento biológico de lesões tão heterogêneas como as neoplásicas (STREFEZZI *et al.*, 2009).

É nesse âmbito que elementos não neoplásicos ganham destaque. Componentes estromais, diferentemente das células tumorais, estão menos sujeitos a alterações genéticas recorrentes capazes de conferir resistência terapêutica, geralmente apresentam grande plasticidade sendo passíveis de modulação, em grande parte epigenética, moldadas pelas próprias características do microambiente tumoral, o que os torna alvos prognósticos e terapêuticos promissores (KALLURI, 2016; SAHAI, 2020).

Na medicina humana, CAFs, TAMs e a própria matriz colagênica, vêm sendo protagonistas em diversas pesquisas, visando o ganho terapêutico e a redução de efeitos colaterais. No entanto, em oncologia veterinária este campo permanece ainda pouco explorado (GIULIANO *et al.*, 2016; BERTOLA *et al.*, 2024).

Dada esta lacuna de conhecimento, este estudo se propôs a investigar a correlação entre componentes estromais do microambiente tumoral e graduação e disseminação em mastocitomas cutâneos caninos, avaliando seu potencial prognóstico.

Os achados deste estudo permitiram observar que, como descrito na literatura, os linfonodos foram frequentemente colonizados por células tumorais (11 de 21; 52,3%), constituindo o principal sítio metastático identificado (WEISHAAR *et al.*, 2014).

No que diz respeito às graduações histopatológicas e às classificações nodais, observou-se maior frequência de índices metastáticos elevados (HN2-HN3) em pacientes diagnosticados com mastocitomas de alto grau (5 de 7; 71,4%), corroborando os achados de Stefanello *et al.* (2015) e Horta *et al.* (2018).

No entanto, é importante ressaltar que, mesmo entre as amostras com baixo grau de malignidade observou-se colonização linfonodal em estágio evolutivo avançado (HN2-HN3) (4 de 14, 25,5%), reforçando o caráter altamente heterogêneo da doença e a limitação dos métodos diagnósticos clássicos em preverem, isoladamente, comportamentos biológicos agressivos.

Estudos em oncologia humana e veterinária indicam que CAFs e TAMs atuam de forma sinérgica na promoção da invasão e da metástase, modulando tanto a arquitetura da matriz extracelular quanto o perfil imunológico local, apresentando elevado potencial prognóstico (COMITO *et al.*, 2013; GIULIANO *et al.*, 2016; RASKOV *et al.*, 2021; BERTOLA *et al.*, 2024).

Nesse estudo foram empregados anticorpos anti-humano que apresentam reatividade cruzada com tecido canino, e que se mostraram adequados para a investigação proposta (STREFEZZI *et al.*, 2009).

Os TAMs apresentaram morfologia heterogênea, com frequente tortuosidade citoplasmática e presença de projeções, evento já relatado por Bertola *et al.* (2024) em estudo com mastocitomas caninos, sugerindo uma modulação para um perfil M2 (MCWHORTER *et al.*, 2013; DONADON *et al.*, 2020). Em nossa amostragem o índice macrofágico e a contagem miofibroblástica não se correlacionou com a graduação histopatológica de Kiupel, em contraste com os achados de Costa *et al.* (2022) e Takaki (2025), nos quais foi observado maior percentual de Iba1+ em mastocitomas cutâneos de alto grau e maior expressão de miofibroblastos em carcinomas de células escamosas felino, respectivamente. Também Gregório *et al.* (2016) observaram associação positiva entre a alta infiltração de macrófagos e tumores de graus mais elevados em um estudo com 50 amostras de mastocitomas cutâneos caninos.

Por outro lado, observou-se correlação significativa dessas populações celulares no tumor cutâneo primário e a presença de disseminação nodal (HN2-HN3), sugerindo uma participação mais direta desses componentes estromais nos eventos de disseminação e progressão do que nas características morfológicas do tumor primário. Estes resultados corroboram, ao menos em parte, os achados de Bertola *et al.* (2024). Embora os autores tenham demonstrado intensa infiltração de macrófagos Iba1+ nos mastocitomas cutâneos caninos, algo não observado no presente estudo, eles também relataram que células Iba1+ com morfologia fusiforme/estrelada se associaram a linfonodos sentinelas classificados como HN2-HN3, sugerindo um fenótipo TAM pró-tumoral.

A ausência de correlação entre a marcação para α -SMA e a graduação histopatológica observada neste estudo pode, em parte, refletir diferenças intrínsecas entre subpopulações de fibroblastos associados ao tumor; uma vez que nossa análise contemplou apenas CAFs α -SMA+. Não foram avaliados fibroblastos ativados FAP+, marcador utilizado por Giuliano *et al.* (2016), os quais demonstraram correlação significativa com os sistemas de Patnaik e Kiupel e com índices proliferativos. Assim, é possível que diferentes subtipos de CAFs apresentem relevâncias biológicas distintas no mastocitoma canino.

É também relevante considerar que a ausência de correlação entre a quantidade absoluta de TAMs/CAF_s e o grau histopatológico não implica necessariamente ausência de relevância biológica. Diversos autores ressaltam que a função dessas células depende mais de seu estado de ativação, polarização e perfil secretor do que de sua densidade numérica (MANTOVANI *et al.*, 2017; KIEFFER *et al.*, 2020; SAHAI *et al.*, 2020). Assim, é possível que tumores histologicamente semelhantes apresentem microambientes profundamente diferentes, nos quais TAMs e CAF_s, mesmo em números estáveis, exibem atividades pró-metastáticas intensificadas, o que seria consistente com os achados do presente estudo. Essas interpretações podem ser reforçadas pelo trabalho de Pulz & Strefezzi (2019), que identificaram, por meio de análise molecular guiada por RNA-sec, hiperexpressão de genes funcionalmente relacionados à ativação de CAF_s e à remodelação da matriz extracelular em mastocitomas de alto risco, mesmo quando as diferenças histológicas eram pouco marcantes.

Dessa forma, os resultados reforçam a importância de incluir marcadores estromais na avaliação, uma vez que esses parâmetros fornecem informações adicionais sobre aspectos dinâmicos da interação tumor–estroma, complementando as interpretações obtidas pela graduação morfológica. Assim, a infiltração macrofágica e miofibroblástica pode refletir sobretudo a capacidade invasiva e metastática e o estado funcional do microambiente, mais do que o grau morfológico clássico.

TAMs de tumores que metastatizam podem estar hiperpolarizados para fenótipos M2, caracterizado pela secreção de citocinas imunossupressoras como IL-10 e TGF- β , mesmo sem aumento numérico (PAN *et al.*, 2020; MANTOVANI *et al.*, 2022). CAF_s podem apresentar hiperexpressão gênica associada ao perfil secretor, resultando na síntese aumentada de citocinas pró-tumorigênicas e imunossupressivas como CXCL12, TGF- β e IL-6 (ORIMO *et al.*, 2005; SAHAI, 2020). Os CAF_s, particularmente aqueles com fenótipo miofibroblástico α -SMA+, são os principais responsáveis pela produção e remodelamento do colágeno intratumoral, modulando rigidez, orientação e densidade das fibras, assim, a

deposição colagênica representa, em grande medida, um produto da sua atividade funcional (KALLURI, 2016; SAHAI *et al.*, 2020).

Salzedas (2025) demonstrou incremento significativo de colágeno nos nichos de colonização nodal, caracterizando desmoplasia, mesmo sem aumento concomitante da celularidade miofibroblástica, sugerindo que a remodelação estromal pode refletir maior atividade funcional dessas células sem expansão numérica associada. No presente estudo, a quantificação da deposição colagênica por meio do tricrômico de Masson não evidenciou diferenças significativas entre mastocitomas cutâneos graduados histopatologicamente em baixo e alto grau, tampouco entre os distintos estágios de comprometimento linfonodal. Esses achados sugerem que, ao menos na casuística avaliada, o percentual de área colagênica intratumoral, isoladamente, não se associa de forma direta à agressividade histopatológica nem ao potencial metastático da neoplasia. No entanto, o incremento na deposição colagênica é amplamente relatado como fator prognóstico negativo em diversos tipos tumorais. O aumento da densidade de deposição colagênica já foi associado à iniciação, progressão e invasão em carcinomas mamários murinos (PROVENZANO *et al.*, 2008).

Paes *et al.* (2022), apresentaram resultados contrários, relatando que fibroblastos e fibras de colágeno foram frequentemente encontrados em aspirados citológicos de cães acometidos por mastocitomas cutâneos de baixo grau, embora esta técnica não tenha apresentado valor prognóstico definido. Em sua pesquisa, os autores descreveram que o colágeno parece refletir o tempo de doença e não necessariamente o grau de agressividade. Mastocitomas de baixo grau, com evoluções mais crônicas, apresentavam maior presença de fibroblastos e fibras colágenas, enquanto quadros mais agudos, ulcerados e proliferativos, apresentavam pequena quantidade de colágeno e frequentemente associados a casos biologicamente mais agressivos (PAES *et al.*, 2022). Daniel *et al.* (2019), também observaram uma relação inversa, sendo que menores índices de colágeno no tumor estavam presentes em lesões de alto grau de malignidade, talvez como desdobramento de elevada atividade proliferativa tumoral associada à síntese de MMPs. Esses pacientes apresentaram menor tempo de sobrevida

pós-cirúrgica. É importante salientar, contudo, que o estudo de Daniel e colaboradores avaliou o colágeno em relação a desfechos clínicos como mortalidade e tempo de sobrevida, enquanto, no presente trabalho, a análise foi direcionada principalmente à graduação histológica e ao estadiamento linfonodal, ou seja, aspectos que não necessariamente refletem o mesmo momento da evolução tumoral. Além disso, diferenças metodológicas, como o número amostral e a forma de seleção dos campos, podem explicar, ao menos em parte, a ausência de correlação encontrada na casuística atual.

Apesar da relativa limitação prognóstica atribuída ao tricrômico de Masson, esta técnica permanece como uma das mais utilizadas, principalmente devido a sua acessibilidade e facilidade de emprego, permitindo a avaliação concomitante de características citonucleares, além de destacar as fibras colagênicas. A avaliação de colágeno intratumoral corado por tricrômico de Masson possibilita uma quantificação global, mensurável pelo software ImageJ; com a captura predominante de feixes mais espessos de colágeno, particularmente tipo I, ao passo que fibras mais finas, potencialmente enriquecidas em outros tipos colagênicos, podem ser subestimadas. Estudos recentes têm sugerido que subtipos específicos de colágeno e frações mais delicadas da matriz, como fibras pericelulares e reticulares, podem exercer efeitos distintos sobre a atividade de células imunes e sobre a biologia tumoral (PAOLILLO; SCHINELLI, 2019; XU *et al.*, 2019).

No estudo de Takaki (2025), em felinos acometidos por carcinomas de células escamosas, foi observada maior tendência a agregação colagênica em lesões de maior grau histológico.

Xu *et al.* (2019) reforça que não existe um sentido único que correlacione colágeno e agressividade biológica tumoral, sua interação é altamente dependente de inúmeras variáveis inseridas em um sistema multidimensional que está a todo momento sendo alterado.

Diversas linhas de pesquisa convergem em assumir que provavelmente o mais relevante não seja a quantidade, mas sim a organização e arquitetura das fibras de colágeno (SALMON *et al.*, 2012; DRIFKA *et al.*, 2016; XU *et al.*; 2019).

O fato do colágeno atuar como marcador prognóstico positivo em determinadas neoplasias e negativo em outras, evidencia a complexidade do papel biológico da matriz extracelular (DANIEL *et al.*, 2019; PAOLILLO; SCHINELLI, 2019; XU *et al.*, 2019). Ainda não está totalmente esclarecido o que determina essa dualidade, mas é plausível que fatores epigenéticos, imunológicos e biomecânicos, além da composição celular do microambiente sejam determinantes. (ZEISBERG, E.M; ZEISBERG, M, 2012; ÖHLUND, D.; ELYADA, E.; TUVESON, 2014; HINSAW; SHEVDE, 2019). Nesse contexto, a ausência de correlação entre o percentual de deposição colagênica e a graduação histopatológica ou o estadiamento linfonodal observada neste estudo não exclui a relevância biológica do colágeno no microambiente dos mastocitomas, mas indica que seu impacto prognóstico possivelmente depende de parâmetros arquiteturais e funcionais mais refinados. Estudos futuros, com amostras mais amplas e ferramentas analíticas capazes de explorar aspectos adicionais da matriz colagênica, são necessários para esclarecer de forma mais abrangente o papel desse componente estromal.

Sob a vertente epidemiológica, os resultados demonstraram que, embora a maioria dos cães acometidos por mastocitomas cutâneos caninos seja idosa, com idade média equivalente a 9,5 anos, como descrito na literatura, quatro casos (13,7%), ocorreram em animais mais jovens, com idade entre 4 e 5 anos, evidenciando a grande relevância de abordagens diagnósticas, mesmo para animais fora da faixa etária de maior risco.

Apesar de a maioria dos cães diagnosticados não ter apresentado raça definida (15 de 29; 51,7%), dentre os animais com raça predominaram os com reconhecida predisposição, como os retrievers (labrador e golden) (WELLE *et al.*, 2008).

As amostras estudadas foram majoritariamente de fêmeas (20 de 29; 69%), embora não haja descrição de predileção sexual para o acometimento da doença (LONDON; SEGUIN, 2003).

Em relação à localização das lesões primárias, os achados corroboraram plenamente o exposto pela literatura, sendo a região do tronco a mais afetada (15

de 31; 48,3%), seguida pelos membros (10 de 31; 32,2%) e menos frequentemente a cabeça e o pescoço (3 de 31; 9,75%) (WELLE *et al.*, 2008).

Este estudo apresentou algumas limitações que devem ser consideradas na interpretação dos resultados. A principal refere-se ao tamanho amostral reduzido, o que pode limitar o poder estatístico e a detecção de associações mais sutis entre os parâmetros avaliados. Além disso, não foi possível obter acesso aos dados clínicos longitudinais como estadio tumoral, intervalo livre de doença ou sobrevida, impedindo a análise direta do impacto prognóstico dos achados estromais.

No âmbito metodológico, a caracterização celular restringiu-se a marcadores únicos, incapazes de abranger todas as possíveis sub-estratificações celulares, uma vez que a população macrofágica foi avaliada exclusivamente por Iba1, sem discriminação fenotípica mais ampla, e os fibroblastos associados ao câncer apenas por meio da expressão de α -SMA. De forma semelhante, a avaliação da matriz colagênica concentrou-se na densidade absoluta das fibras, não contemplando aspectos estruturais, como orientação, rigidez ou composição dos diferentes subtipos de colágeno.

Embora o Tricrômico de Masson seja amplamente utilizado para a identificação de fibras colagênicas, a técnica não permite a distinção entre diferentes tipos ou graus de maturação das fibras, restringindo a análise à densidade total de colágeno. Assim, o emprego futuro de métodos mais sensíveis e específicos, como imunomarcações direcionadas a componentes da matriz extracelular ou técnicas capazes de diferenciar classes fibrilares, poderia fornecer uma caracterização estromal mais refinada e biologicamente informativa. Tais limitações reforçam a necessidade de estudos futuros com casuísticas mais amplas e metodologias capazes de capturar outros fatores inerentes a complexidade funcional do microambiente tumoral e o avanço efetivo em termos prognósticos e terapêuticos.

6. CONCLUSÃO

O mastocitoma cutâneo canino apresenta, com frequência, disseminação nodal, mesmo em lesões de baixo grau histológico, existindo uma relação direta entre infiltração macrofágica e miofibroblástica no tumor primário e comportamento metastático. A deposição colagênica não apresentou correlação significativa com a graduação histopatológica ou com a disseminação nodal nas amostras avaliadas.

REFERÊNCIAS

- AFIK, R. *et al.* Tumor macrophages are pivotal constructors of tumor collagenous matrix. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 213, n. 11, p. 2315–2331, 17 out. 2016.
- AGGARWAL, B. B.; VIJAYALEKSHMI, R. V.; SUNG, B. Targeting Inflammatory Pathways for Prevention and Therapy of Cancer: Short-Term Friend, Long-Term Foe. **Clinical Cancer Research**, v. 15, n. 2, p. 425–430, 15 jan. 2009.
- AO, Z. *et al.* Identification of Cancer-Associated Fibroblasts in Circulating Blood from Patients with Metastatic Breast Cancer. **Cancer Research**, v. 75, n. 22, p. 4681–4687, 15 nov. 2015.
- AUGUSTE, P. *et al.* The Host Inflammatory Response Promotes Liver Metastasis by Increasing Tumor Cell Arrest and Extravasation. **The American Journal of Pathology**, v. 170, n. 5, p. 1781–1792, maio 2007.
- BELHABIB, I. *et al.* Extracellular Matrices and Cancer-Associated Fibroblasts: Targets for Cancer Diagnosis and Therapy? **Cancers**, v. 13, n. 14, p. 3466, 11 jul. 2021.
- BERTOLA, L. *et al.* Tumor-associated macrophages and tumor-infiltrating lymphocytes in canine cutaneous and subcutaneous mast cell tumors. **Veterinary Pathology**, v. 61, n. 6, p. 882–895, 22 abr. 2024.
- BHOWMICK, N. A.; NEILSON, E. G.; MOSES, H. L. Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. **Nature**, v. 432, n. 7015, p. 332–337, 18 nov. 2004.
- BIED, M. *et al.* Roles of macrophages in tumor development: a spatiotemporal perspective. **Cellular & Molecular Immunology**, v. 20, n. 9, p. 983–992, 1 set. 2023.

BONAGURA, J. D.; ROBERT WARREN KIRK. **Kirk's current veterinary therapy XIV.** v. 14, p. 1265-1277, Philadelphia, Pa.: Elsevier Saunders, 2009.

BOSTOCK, D. E. The prognosis following surgical removal of mastocytomas in dogs. **Journal of Small Animal Practice**, v. 14, n. 1, p. 27–40, jan. 1973.

BRANDNER, J. M.; HAASS, N. K. Melanoma's connections to the tumour microenvironment. **Pathology**, v. 45, n. 5, p. 443–452, 26 fev. 2016.

CARLSTEN, K. S. *et al.* Multicenter Prospective Trial of Hypofractionated Radiation Treatment, Toceranib, and Prednisone for Measurable Canine Mast Cell Tumors. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 26, n. 1, p. 135–141, 19 dez. 2011.

CASSETTA, L.; POLLARD, J. W. Targeting macrophages: therapeutic approaches in cancer. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 17, n. 12, p. 887–904, 26 out. 2018.

CENDROWICZ, E. *et al.* The Role of Macrophages in Cancer Development and Therapy. **Cancers**, v. 13, n. 8, p. 1946, 18 abr. 2021.

CHEN, S. *et al.* Harnessing and Enhancing Macrophage Phagocytosis for Cancer Therapy. **Frontiers in Immunology**, v. 12, 10 mar. 2021.

CHEN, X. *et al.* Integration of external signaling pathways with the core transcriptional network in embryonic stem cells. **Cell**, v. 133, n. 6, p. 1106–1117, 13 jun. 2008.

CHEN, Y. *et al.* Type I collagen deletion in α SMA+ myofibroblasts augments immune suppression and accelerates progression of pancreatic cancer. **Cancer Cell**, v. 39, n. 4, p. 548-565.e6, abr. 2021.

COLEGIO, O. R. *et al.* Functional polarization of tumour-associated macrophages by tumour-derived lactic acid. **Nature**, v. 513, n. 7519, p. 559–563, 25 set. 2014.

COMITO, G. *et al.* Cancer-associated fibroblasts and M2-polarized macrophages synergize during prostate carcinoma progression. **Oncogene**, v. 33, n. 19, p. 2423–2431, 3 jun. 2013.

COOPER, C.; C. STEPHEN FOSTER. Concepts of epigenetics in prostate cancer development. **British Journal of Cancer**, v. 100, n. 2, p. 240–245, 11 nov. 2008.

COSTA, A. *et al.* Fibroblast Heterogeneity and Immunosuppressive Environment in Human Breast Cancer. **Cancer Cell**, v. 33, n. 3, p. 463-479.e10, mar. 2018.

COSTA-CASAGRANDE, T. A. *et al.* ESTUDO RETROSPECTIVO DO MASTOCITOMA CANINO NO SERVIÇO DE CIRURGIA DE PEQUENOS ANIMAIS - HOSPITAL VETERINÁRIO DA FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. **Archives of Veterinary Science**, v. 13, n. 3, 30 set. 2008.

COSTA, V. R. *et al.* Exploring the association of intratumoral immune cell infiltrates with histopathologic grade in canine mast cell tumors. **Research in Veterinary Science**, v. 147, p. 83–91, 1 out. 2022.

DANIEL, J. *et al.* Intratumoral collagen index predicts mortality and survival in canine cutaneous mast cell tumours. **Veterinary dermatology**, v. 30, n. 2, p. 162-e48, abr. 2019.

DE MARTEL, C.; FRANCESCHI, S. Infections and cancer: Established associations and new hypotheses. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 70, n. 3, p. 183–194, 1 jun. 2009.

DE NARDI, A. B. *et al.* Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine Cutaneous and Subcutaneous Mast Cell Tumors. **Cells**, v. 11, n. 4, p. 618, 10 fev. 2022.

DE STREFEZZI, R. F. *et al.* Nuclear Morphometry in Cytopathology: A Prognostic Indicator for Canine Cutaneous Mast Cell Tumors. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 21, n. 6, p. 821–825, nov. 2009.

DE VISSER, K. E.; EICHTEN, A.; COUSSENS, L. M. Paradoxical roles of the immune system during cancer development. **Nature Reviews Cancer**, v. 6, n. 1, p. 24–37, jan. 2006.

DEBERARDINIS, R. J. *et al.* The Biology of Cancer: Metabolic Reprogramming Fuels Cell Growth and Proliferation. **Cell Metabolism**, v. 7, n. 1, p. 11–20, jan. 2008.

DENARDO, D. G. *et al.* CD4+ T Cells Regulate Pulmonary Metastasis of Mammary Carcinomas by Enhancing Protumor Properties of Macrophages. **Cancer Cell**, v. 16, n. 2, p. 91–102, ago. 2009.

DICKERSON, V. M. *et al.* Outcomes of dogs undergoing limb amputation, owner satisfaction with limb amputation procedures, and owner perceptions regarding postsurgical adaptation: 64 cases (2005–2012). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 247, n. 7, p. 786–792, out. 2015.

DONADON, M. *et al.* Macrophage morphology correlates with single-cell diversity and prognosis in colorectal liver metastasis. **Journal of Experimental Medicine**, v. 217, n. 11, 12 ago. 2020.

DRIFKA, C. R. *et al.* Highly aligned stromal collagen is a negative prognostic factor following pancreatic ductal adenocarcinoma resection. **Oncotarget**, v. 7, n. 46, p. 76197–76213, 20 out. 2016.

DUNCAN, J. R.; PRASSE, K. W. Cytology of Canine Cutaneous Round Cell Tumors. **Veterinary Pathology**, v. 16, n. 6, p. 673–679, nov. 1979.

DVORAK, H. F. Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. **The New England journal of medicine**, v. 315, n. 26, p. 1650–9, 1986.

EBLE, J. A.; NILAND, S. The extracellular matrix in tumor progression and metastasis. **Clinical & Experimental Metastasis**, v. 36, n. 3, p. 171–198, 11 abr. 2019.

ELLEM, S. J. *et al.* A pro-tumourigenic loop at the human prostate tumour interface orchestrated by oestrogen, CXCL12 and mast cell recruitment. **The Journal of Pathology**, v. 234, n. 1, p. 86–98, 9 jul. 2014.

EREZ, N. *et al.* Cancer-Associated Fibroblasts Are Activated in Incipient Neoplasia to Orchestrate Tumor-Promoting Inflammation in an NF-κB-Dependent Manner. **Cancer Cell**, v. 17, n. 2, p. 135–147, fev. 2010.

FENG, B. *et al.* Cancer-associated fibroblasts and resistance to anticancer therapies: status, mechanisms, and countermeasures. **Cancer Cell International**, v. 22, p. 166, 29 abr. 2022.

FORSSELL, J. *et al.* High Macrophage Infiltration along the Tumor Front Correlates with Improved Survival in Colon Cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 13, n. 5, p. 1472–1479, 1 mar. 2007.

FRANCO, O. E. *et al.* Cancer associated fibroblasts in cancer pathogenesis. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 21, n. 1, p. 33–39, 1 fev. 2010.

FREYTAG, J. *et al.* Prognostic value of immunohistochemical markers in canine cutaneous mast cell tumours: A systematic review and meta-analysis. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 19, n. 3, p. 529–540, 27 mar. 2021

GALLIMORE, A. M.; SIMON, A. K. Positive and negative influences of regulatory T cells on tumour immunity. **Oncogene**, v. 27, n. 45, p. 5886–5893, out. 2008.

GIULIANO, A. *et al.* Expression of Fibroblast Activating Protein and Correlation with Histological Grade, Mitotic Index and Ki67 Expression in Canine Mast Cell Tumours. **Journal of Comparative Pathology**, v. 156, n. 1, p. 14–20, 24 nov. 2016.

GLABMAN, R. A.; CHOYKE, P. L.; SATO, N. Cancer-Associated Fibroblasts: Tumorigenicity and Targeting for Cancer Therapy. **Cancers**, v. 14, n. 16, p. 3906, 12 ago. 2022.

GREGÓRIO, H. *et al.* High COX-2 expression in canine mast cell tumours is associated with proliferation, angiogenesis and decreased overall survival. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 15, n. 4, p. 1382–1392, 7 nov. 2016.

GRIVENNIKOV, S. I.; GRETEN, F. R.; KARIN, M. Immunity, Inflammation, and Cancer. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 883–899, mar. 2010.

HANAHAN, D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. **Cancer Discovery**, v. 12, n. 1, p. 31–46, 12 jan. 2022.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The Hallmarks of Cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57–70, 7 jan. 2000.

HANAHAN, D.; WEINBERG, ROBERT A. Hallmarks of cancer: the next Generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, mar. 2011.

HAO, N.-B. *et al.* Macrophages in tumor microenvironments and the progression of tumors. **Clinical & developmental immunology**, v. 2012, p. 948098, 2012.

HELDIN, C.-H. *et al.* High interstitial fluid pressure — an obstacle in cancer therapy. **Nature Reviews Cancer**, v. 4, n. 10, p. 806–813, out. 2004.

HINSHAW, D. C.; SHEVDE, L. A. The Tumor Microenvironment Innately Modulates Cancer Progression. **Cancer Research**, v. 79, n. 18, p. 4557–4566, 26 jul. 2019.

HIRAYAMA, D.; LIDA, T.; NAKASE, H. The Phagocytic Function of Macrophage-Enforcing Innate Immunity and Tissue Homeostasis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 1, p. 92, 29 dez. 2017.

HORTA, R. S. *et al.* Assessment of Canine Mast Cell Tumor Mortality Risk Based on Clinical, Histologic, Immunohistochemical, and Molecular Features. **Veterinary Pathology**, v. 55, n. 2, p. 212–223, 16 jan. 2018.

JOYCE, J. A.; POLLARD, J. W. Microenvironmental regulation of metastasis. **Nature Reviews Cancer**, v. 9, n. 4, p. 239–252, 12 mar. 2008.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Tecido conjuntivo. In: JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica: texto e atlas**. 14. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2018. p. 115–138.

KALLURI, R. The biology and function of fibroblasts in cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 16, n. 9, p. 582–598, 23 ago. 2016.

KALLURI, R.; WEINBERG, R. A. The basics of epithelial-mesenchymal transition. **Journal of Clinical Investigation**, v. 119, n. 6, p. 1420–1428, 1 jun. 2009.

KARIN, M.; GRETEN, F. R. NF-κB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. **Nature Reviews Immunology**, v. 5, n. 10, p. 749–759, 20 set. 2005.

KIEFFER, Y. *et al.* Single-Cell Analysis Reveals Fibroblast Clusters Linked to Immunotherapy Resistance in Cancer. **Cancer Discovery**, v. 10, n. 9, p. 1330–1351, 20 maio 2020.

KIRSHENBAUM, A. S. *et al.* Demonstration of the origin of human mast cells from CD34+ bone marrow progenitor cells. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 146, n. 5, p. 1410–5, jan. 1991.

KIUPEL, M. *et al.* Impact of Tumour Depth, Tumour Location and Multiple Synchronous Masses on the Prognosis of Canine Cutaneous Mast Cell Tumours. **Journal of Veterinary Medicine Series A**, v. 52, n. 6, p. 280–286, ago. 2005.

KIUPEL, M. *et al.* Proposal of a 2-Tier Histologic Grading System for Canine Cutaneous Mast Cell Tumors to More Accurately Predict Biological Behavior. **Veterinary Pathology**, v. 48, n. 1, p. 147–155, 9 nov. 2010.

KIUPEL, M.; CAMUS, M. Diagnosis and Prognosis of Canine Cutaneous Mast Cell Tumors. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 49, n. 5, p. 819–836, set. 2019.

KOMI, D. E. A.; REDEGELD, F. A. Role of Mast Cells in Shaping the Tumor Microenvironment. **Clinical Reviews in Allergy & Immunology**, v. 58, n. 3, p. 313–325, 29 jun. 2019.

KRAMAN, M. *et al.* Suppression of Antitumor Immunity by Stromal Cells Expressing Fibroblast Activation Protein- α . **Science**, v. 330, n. 6005, p. 827–830, 5 nov. 2010.

LEJEUNE, A. *et al.* Aggressive local therapy combined with systemic chemotherapy provides long-term control in grade II stage 2 canine mast cell tumour: 21 cases (1999–2012). **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 13, n. 3, p. 267–280, 31 maio 2013.

LEWIS, C.; MURDOCH, C. Macrophage Responses to Hypoxia. **The American Journal of Pathology**, v. 167, n. 3, p. 627–635, set. 2005.

LI, T. *et al.* Colorectal carcinoma-derived fibroblasts modulate natural killer cell phenotype and antitumor cytotoxicity. **Medical oncology (Northwood, London, England)**, v. 30, n. 3, p. 663, 2013.

LIANG, L. *et al.* “Reverse Warburg effect” of cancer-associated fibroblasts (Review). **International Journal of Oncology**, v. 60, n. 6, p. 67, 1 jun. 2022.

LIN, E. Y. *et al.* Colony-Stimulating Factor 1 Promotes Progression of Mammary Tumors to Malignancy. **Journal of Experimental Medicine**, v. 193, n. 6, p. 727–740, 19 mar. 2001.

LIN, W.-W.; KARIN, M. A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. **Journal of Clinical Investigation**, v. 117, n. 5, p. 1175–1183, 1 maio 2007.

LIN, Y. *et al.* CAFs shape myeloid-derived suppressor cells to promote stemness of intrahepatic cholangiocarcinoma through 5-lipoxygenase. **Hepatology**, v. 75, n. 1, p. 28–42, 5 dez. 2021.

LLORENS, X. E. *et al.* Retrospective Analysis of Clinical Presentation, Prognostic Factors and Outcome in 32 Dogs with Subcutaneous Mast Cell Tumours Treated with a Curative-Intent Approach. **Veterinary Medicine and Science**, v. 11, n. 2, 1 mar. 2025.

LONDON, C. A.; SEGUIN, B. Mast cell tumors in the dog. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 33, n. 3, p. 473–489, maio 2003.

MACNEILL, A. L. Cytology of Canine and Feline Cutaneous and Subcutaneous Lesions and Lymph Nodes. **Topics in Companion Animal Medicine**, v. 26, n. 2, p. 62–76, maio 2011.

MADSEN, D. H. *et al.* Tumor-Associated Macrophages Derived from Circulating Inflammatory Monocytes Degrade Collagen through Cellular Uptake. **Cell Reports**, v. 21, n. 13, p. 3662–3671, 26 dez. 2017.

MANTOVANI, A. *et al.* Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. **Trends in Immunology**, v. 23, n. 11, p. 549–555, 1 nov. 2002.

MANTOVANI, A. *et al.* Macrophages as tools and targets in cancer therapy. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 21, n. 11, p. 799–820, 1 nov. 2022.

MANTOVANI, A. *et al.* Tumour-associated macrophages as treatment targets in oncology. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 14, n. 7, p. 399–416, 24 jan. 2017.

MARTINEZ, F. O. Macrophage activation and polarization. **Frontiers in Bioscience**, v. 13, n. 13, p. 453, 2008.

MARUSYK, A.; ALMENDRO, V.; POLYAK, K. Intra-tumour heterogeneity: a looking glass for cancer? **Nature Reviews Cancer**, v. 12, n. 5, p. 323–334, 19 abr. 2012.

MCWHORTER, F. Y. *et al.* Modulation of macrophage phenotype by cell shape. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 43, p. 17253–17258, 7 out. 2013.

MEIRELLES, A. E. W. B. *et al.* Prevalência de neoplasmas cutâneos em cães da região metropolitana de Porto Alegre, RS: 1.017 casos (2002-2007). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 11, p. 968–973, nov. 2010.

MICALIZZI, D. S.; MAHESWARAN, S.; HABER, D. A. A conduit to metastasis: circulating tumor cell biology. **Genes & Development**, v. 31, n. 18, p. 1827–1840, 15 set. 2017.

MINNOYE, S. *et al.* Histopathological features of subcutaneous and cutaneous mast cell tumors in dogs. **Acta veterinaria Scandinavica**, v. 66, n. 1, p. 53, jan. 2024.

MIR, L. *et al.* Effective treatment of cutaneous and subcutaneous malignant tumours by electrochemotherapy. **British Journal of Cancer**, v. 77, n. 12, p. 2336–2342, jun. 1998.

MISDORP, W. Mast cells and canine mast cell tumours. A review. **Veterinary Quarterly**, v. 26, n. 4, p. 156–169, dez. 2004.

MOCHIZUKI, H. *et al.* Association of breed and histopathological grade in canine mast cell tumours. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 15, n. 3, p. 829–839, 19 maio 2016.

O, L. N. *et al.* Clinical significance and prognostic role of tumor-associated macrophages infiltration according to histologic location in canine mammary carcinomas. **Research in veterinary science**, v. 135, p. 329–334, mar. 2021.

MONTERAN, L.; EREZ, N. The Dark Side of Fibroblasts: Cancer-Associated Fibroblasts as Mediators of Immunosuppression in the Tumor Microenvironment. **Frontiers in Immunology**, v. 10, 2 ago. 2019.

MUELLER, M. M.; FUSENIG, N. E. Friends or foes — bipolar effects of the tumour stroma in cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 4, n. 11, p. 839–849, nov. 2004.

NARDI, A. B. de; DALECK, C. R. Neoplasias de pele. In: NARDI, A. B. de; DALECK, C. R. **Oncologia em cães e gatos**. 2. ed. São Paulo: Roca, 2016. p. 457–484.

NURMIK, M. *et al.* In search of definitions: Cancer-associated fibroblasts and their markers. **International Journal of Cancer**, v. 146, n. 4, p. 895–905, 28 fev. 2019.

NUSSE, R.; VARMUS, H. E. Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome. **Cell**, v. 31, n. 1, p. 99–109, 1982.

O'KEEFE, D. A. Canine mast cell tumors. **The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice**, v. 20, n. 4, p. 1105–1115, 1 jul. 1990.

ÖHLUND, D.; ELYADA, E.; TUVESEN, D. Fibroblast heterogeneity in the cancer wound. **Journal of Experimental Medicine**, v. 211, n. 8, p. 1503–1523, 28 jul. 2014.

OLIVEIRA, M. T. *et al.* Canine and Feline Cutaneous Mast Cell Tumor: A Comprehensive Review of Treatments and Outcomes. **Topics in Companion Animal Medicine**, v. 41, p. 100472, nov. 2020.

OLUMI, A. *et al.* Carcinoma-associated fibroblasts stimulate tumor progression of initiated human epithelium. **Breast Cancer Research**, v. 2, n. S1, mar. 2000.

ORIMO, A. *et al.* Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. **Cell**, v. 121, n. 3, p. 335–48, 2005.

ORIMO, A.; WEINBERG, R. A. Stromal Fibroblasts in Cancer: A Novel Tumor-Promoting Cell Type. **Cell Cycle**, v. 5, n. 15, p. 1597–1601, 21 jul. 2006.

OWEN, L. N.; UNIT, W. **WORLD HEALTH ORGANIZATION**. TNM classification of tumours in domestic animals. Geneva: World Health Organization, 1980.

ÖZDEMİR, BERA C. *et al.* Depletion of Carcinoma-Associated Fibroblasts and Fibrosis Induces Immunosuppression and Accelerates Pancreas Cancer with Reduced Survival. **Cancer Cell**, v. 25, n. 6, p. 719–734, jun. 2014.

PAES, P. R. O. *et al.* Inclusion of fibroblasts and collagen fibrils in the cytologic grading of canine cutaneous mast cell tumors. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 51, n. 3, p. 339–348, 13 abr. 2022.

PALMA, H. E. *et al.* Mastocitoma cutâneo canino: revisão. **MEDVEP. Revista Científica de Medicina Veterinária. Pequenos Animais e Animais de Estimação**, v. 7, n. 23, p. 523–528, 2025.

PAN, Y. *et al.* Tumor-Associated Macrophages in Tumor Immunity. **Frontiers in Immunology**, v. 11, 3 dez. 2020.

PAOLILLO, M; SCHINELLI, S. Extracellular Matrix Alterations in Metastatic Processes. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 19, p. 4947, 7 out. 2019.

PARK, E. J. *et al.* Dietary and Genetic Obesity Promote Liver Inflammation and Tumorigenesis by Enhancing IL-6 and TNF Expression. **Cell**, v. 140, n. 2, p. 197–208, jan. 2010.

PARK, J. *et al.* Obesity and cancer—mechanisms underlying tumour progression and recurrence. **Nature reviews. Endocrinology**, v. 10, n. 8, p. 455–465, 1 ago. 2014.

PATHRIA, P.; LOUIS, T. L.; VARNER, J. A. Targeting Tumor-Associated Macrophages in Cancer. **Trends in Immunology**, v. 40, n. 4, p. 310–327, abr. 2019.

PATNAIK, A. K.; EHLER, W. J.; MACEWEN, E. G. Canine Cutaneous Mast Cell Tumor: Morphologic Grading and Survival Time in 83 Dogs. **Veterinary Pathology**, v. 21, n. 5, p. 469–474, set. 1984.

PAULA REIS RIBEIRO *et al.* Pathological aspects of cutaneous mast cell tumors with metastases in 49 dogs. **Veterinary Pathology**, v. 59, n. 6, p. 922–930, 25 jul. 2022.

PING, Q. *et al.* Cancer-associated fibroblasts: overview, progress, challenges, and directions. **Cancer Gene Therapy**, 12 mar. 2021.

PROVENZANO, P. P. *et al.* Collagen density promotes mammary tumor initiation and progression. **BMC medicine**, v. 6, p. 11, 28 abr. 2008.

PULZ, L. H. Isolation and characterization of Cancer Associated Fibroblasts from canine Mast Cell Tumors and its influence on the malignancy of neoplastic cells: a combined molecular, pathologic and in vitro approach. **Digital Library of Theses and Dissertations (Universidade de São Paulo)**, 2019.

QIAN, B. *et al.* A Distinct Macrophage Population Mediates Metastatic Breast Cancer Cell Extravasation, Establishment and Growth. **PLoS ONE**, v. 4, n. 8, p. e6562, 10 ago. 2009.

QUAIL, D. F.; JOYCE, J. A. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. **Nature medicine**, v. 19, n. 11, p. 1423–37, 2013.

RAIMUNDO ALBERTO TOSTES *et al.* Retrospective Study of Canine Cutaneous Neoplasia. **Archives of Veterinary Science**. v. 22, n. 1, 6 jul. 2017.

RAPOSO, T. P. *et al.* Tumour-associated macrophages are associated with vascular endothelial growth factor expression in canine mammary tumours. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 13, n. 4, p. 464–474, 4 out. 2013.

RASKOV, H. *et al.* Cancer-Associated Fibroblasts and Tumor-Associated Macrophages in Cancer and Cancer Immunotherapy. **Frontiers in Oncology**, v. 11, 20 maio 2021.

ROBBINS, S. L.; COTRAN, R. S.; KUMAR, V. Inflamação e reparo tecidual. In: ROBBINS, S. L.; COTRAN, R. S.; KUMAR, V. **Patologia: bases patológicas das doenças**. 10. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2021. p. 89–93.

ROGERS, T. L.; HOLEN, I. Tumour macrophages as potential targets of bisphosphonates. **Journal of Translational Medicine**, v. 9, n. 1, 17 out. 2011.

ROMANSIK, E. M. *et al.* Mitotic Index Is Predictive for Survival for Canine Cutaneous Mast Cell Tumors. **Veterinary Pathology**, v. 44, n. 3, p. 335–341, maio 2007.

SABATTINI, S. *et al.* Histologic Grading of Canine Mast Cell Tumor. **Veterinary Pathology**, v. 52, n. 1, p. 70–73, 10 fev. 2014.

SABATTINI, S. *et al.* The 2-tier grading system identifies canine cutaneous and/or subcutaneous mast cell tumors with aggressive biological behavior regardless of growth model. **Veterinary pathology**, 5 abr. 2024.

SAHAI, E. *et al.* A framework for advancing our understanding of cancer-associated fibroblasts. **Nature Reviews Cancer**, v. 20, n. 3, p. 174–186, 24 jan. 2020.

SALMON, H. *et al.* Matrix architecture defines the preferential localization and migration of T cells into the stroma of human lung tumors. **Journal of Clinical Investigation**, v. 122, n. 3, p. 899–910, 1 mar. 2012.

SICA, A. *et al.* Macrophage polarization in tumour progression. **Seminars in Cancer Biology**, v. 18, n. 5, p. 349–355, out. 2008.

SICA, A.; ALLAVENA, P.; MANTOVANI, A. Cancer related inflammation: The macrophage connection. **Cancer Letters**, v. 267, n. 2, p. 204–215, ago. 2008.

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

SOUZA, M. T. *et al.* Estudo retrospectivo de 761 tumores cutâneos em cães. Ciência Rural. v. 36, n. 2, p. 555–560, 2006.

SPUGNINI, E. P. *et al.* Adjuvant electrochemotherapy for the treatment of incompletely resected canine mast cell tumors. **Anticancer research**, v. 26, n. 6B, p. 4585–9, 2006.

STEFANELLO, D. *et al.* Comparison of 2- and 3-category histologic grading systems for predicting the presence of metastasis at the time of initial evaluation in dogs with cutaneous mast cell tumors: 386 cases (2009–2014). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 246, n. 7, p. 765–769, abr. 2015.

SUGIMOTO, H. *et al.* Identification of fibroblast heterogeneity in the tumor microenvironment. **Cancer Biology & Therapy**, v. 5, n. 12, p. 1640–1646, 31 dez. 2006.

TAGLIAVINI, V. P. A significância prognóstica de macrófagos associados ao tumor em câncer de cabeça e pescoço: uma revisão sistemática. **Digital Library of Theses and Dissertations (Universidade de São Paulo)**, 2022.

TAKAHASHI, H. *et al.* Tobacco Smoke Promotes Lung Tumorigenesis by Triggering IKK β - and JNK1-Dependent Inflammation. **Cancer Cell**, v. 17, n. 1, p. 89–97, jan. 2010.

TAMLIN, V. S. *et al.* Canine mast cell tumours part I: Clinical and survival outcomes. **Veterinary Medicine and Science**, v. 8, n. 4, p. 1409–1420, 3 maio 2022.

THOMPSON, J. J. *et al.* Canine Subcutaneous Mast Cell Tumor. **Veterinary Pathology**, v. 48, n. 1, p. 156–168, 15 nov. 2010.

TOGO, S. *et al.* Carcinoma-Associated Fibroblasts Are a Promising Therapeutic Target. **Cancers**, v. 5, n. 4, p. 149–169, 31 jan. 2013.

TOMASEK, J. J. *et al.* Myofibroblasts and mechano-regulation of Connective Tissue Remodelling. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 3, n. 5, p. 349–363, maio 2002.

TORÍBIO, J. M. DE M. L. *et al.* Caracterização clínica, diagnóstico histopatológico e distribuição geográfica das neoplasias mamárias em cadelas de Salvador, Bahia. **Revista Ceres**, v. 59, n. 4, p. 427–433, ago. 2012.

TAKAKI, J.; UNIVERSIDADE PAULISTA. **Aspectos da relação entre parênquima e estroma em lesões actínicas neoplásicas de ocorrência natural em gatos.** - **Repositório Digital UNIP.** Disponível em: <https://repositorio.unip.br/patologia-dissertacoes-teses/aspectos-da-relacao-entre-parenquima-e-estroma-em-lesoes-actinicas-neoplasicas-de-ocorrencia-natural-em-gatos/>

SALZEDAS, B, A. UNIVERSIDADE PAULISTA. **Modulação colagênica na progressão metastática nodal em cães portadores de mastocitoma cutâneo.** - **Repositório Digital UNIP.** Disponível em: <https://repositorio.unip.br/patologia-dissertacoes-teses/modulacao-colagenica-na-progressao-metastatica-nodal-em-caes-portadores-de-mastocitoma-cutaneo/>

VANDER HEIDEN, M. G.; CANTLEY, L. C.; THOMPSON, C. B. Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. **Science**, v. 324, n. 5930, p. 1029–1033, 21 maio 2009.

VILLAMIL, J. A. *et al.* Identification of the most common cutaneous neoplasms in dogs and evaluation of breed and age distributions for selected neoplasms. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 239, n. 7, p. 960–965, out. 2011.

VITALE, I. *et al.* Macrophages and Metabolism in the Tumor Microenvironment. **Cell Metabolism**, v. 30, n. 1, p. 36–50, jul. 2019.

WEISHAAR, K. M. *et al.* Correlation of Nodal Mast Cells with Clinical Outcome in Dogs with Mast Cell Tumour and a Proposed Classification System for the Evaluation

of Node Metastasis. **Journal of Comparative Pathology**, v. 151, n. 4, p. 329–338, nov. 2014.

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

WINER, A.; ADAMS, S.; MIGNATTI, P. Matrix Metalloproteinase Inhibitors in Cancer Therapy: Turning Past Failures Into Future Successes. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 17, n. 6, p. 1147–1155, 7 maio 2018.

WITHERS, S. S. *et al.* Association of macrophage and lymphocyte infiltration with outcome in canine osteosarcoma. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 17, n. 1, p. 49–60, 30 ago. 2018.

WU, C. Y. *et al.* Early *Helicobacter pylori* Eradication Decreases Risk of Gastric Cancer in Patients With Peptic Ulcer Disease. v. 137, n. 5, p. 1641-1648.e2, 1 nov. 2009.

XIANG, H. *et al.* Cancer-Associated Fibroblasts Promote Immunosuppression by Inducing ROS-Generating Monocytic MDSCs in Lung Squamous Cell Carcinoma. **Cancer immunology research**, v. 8, n. 4, p. 436–450, 1 abr. 2020.

XU, S. *et al.* The role of collagen in cancer: from bench to bedside. **Journal of Translational Medicine**, v. 17, n. 1, 14 set. 2019.

YAMAGAMI, T. *et al.* Prognosis for Canine Malignant Mammary Tumors Based on TNM and Histologic Classification. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 58, n. 11, p. 1079–1083, 1996.

YOSHIKAWA, K. *et al.* Impact of tumor-associated macrophages on invasive ductal carcinoma of the pancreas head. **Cancer Science**, v. 103, n. 11, p. 2012–2020, 4 out. 2012.

ZEISBERG, E. M.; ZEISBERG, M. The role of promoter hypermethylation in fibroblast activation and fibrogenesis. **The Journal of Pathology**, v. 229, n. 2, p. 264–273, 12 dez. 2012.