

UNIVERSIDADE PAULISTA – UNIP

RENATA FIGUEIREDO FREITAS

**AVALIAÇÃO DO EMPREGO DE ÍNDICES INFLAMATÓRIOS SANGUÍNEOS NO
PROGNÓSTICO DE CÃES COM MASTOCITOMA CUTÂNEO**

**SÃO PAULO
2025**

RENATA FIGUEIREDO FREITAS

**AVALIAÇÃO DO EMPREGO DE ÍNDICES INFLAMATÓRIOS SANGUÍNEOS NO
PROGNÓSTICO DE CÃES COM MASTOCITOMA CUTÂNEO**

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.

Orientador: Prof. Dr. José Guilherme Xavier.

**SÃO PAULO
2025**

Freitas, Renata Figueiredo.

Avaliação do emprego de índices inflamatórios sanguíneos no prognóstico de cães com mastocitoma cutâneo / Renata Figueiredo Freitas. - 2025.

60 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: Oncologia e Patologia Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. José Guilherme Xavier.

1. Mastocitoma cutâneo canino.
 2. Índices hematológicos inflamatórios.
 3. Marcadores prognósticos.
 4. Metástase linfonodal.
 5. *Elastic Net*.
- I. Xavier, José Guilherme (orientador). II. Título.

RENATA FIGUEIREDO FREITAS

**AVALIAÇÃO DO EMPREGO DE ÍNDICES INFLAMATÓRIOS SANGUÍNEOS NO
PROGNÓSTICO DE CÃES COM MASTOCITOMA CUTÂNEO**

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

____ / ____ / ____
Prof^a. Dr^a.
Universidade Paulista – UNIP

____ / ____ / ____
Prof^a. Dr^a.
Universidade Paulista – UNIP

____ / ____ / ____
Prof^a. Dr^a.
Universidade Anhembi Morumbi – UAM

AGRADECIMENTOS

A Deus, fonte de força e sabedoria, expresso minha mais profunda gratidão. Ele conhece cada um dos meus caminhos e, com Seu tempo perfeito, sustentou-me nos momentos de incerteza, tornando possível a realização deste sonho.

À minha mãe, agradeço pelo amor incondicional, pela dedicação e pelos valores e princípios que me transmitiu.

Ao meu orientador, Professor Dr. José Guilherme Xavier, registro minha admiração e sincero agradecimento. Sua dedicação à ciência, seu rigor acadêmico e sua sensibilidade como educador foram fundamentais para a concretização deste trabalho. Seu exemplo como pesquisador e como ser humano permanecerá como inspiração permanente em minha trajetória profissional.

Aos amigos que construí ao longo da pós-graduação, agradeço pela ajuda, parceria e presença constante, elementos indispensáveis para tornar esta jornada mais leve e significativa.

Finalizo com uma frase que sintetiza este percurso: “Nenhum caminho é longo demais quando se tem com quem compartilhá-lo.”

A todos que, de alguma forma, contribuíram para esta conquista, deixo meu mais sincero e profundo agradecimento.

"O sucesso é ir de fracasso em fracasso sem perder o entusiasmo."

-- Winston Churchill

RESUMO

O mastocitoma cutâneo canino apresenta comportamento biológico altamente variável, tornando desafiadora a previsão de sua agressividade e risco de metástase. Este estudo teve como objetivo avaliar a relação entre cinco índices hematológicos inflamatórios razão neutrófilo/linfócito (NLR), monócito/linfócito (MLR), plaquetas/linfócito (PLR), eosinófilo/linfócito (ELR) e o índice imune-inflamatório sistêmico (SII), e graduação histopatológica tumoral e disseminação nodal, investigando seu potencial como marcadores prognósticos acessíveis na prática veterinária. Foram analisadas 29 amostras sanguíneas de cães distribuídos em grupos controle, mastocitoma cutâneo de baixo grau, mastocitoma cutâneo alto grau, com e sem a presença de metástase nodal. Modelos de regressão multinomial e binária penalizados (Elastic Net) foram aplicados para identificar os índices mais relevantes, considerando a forte colinearidade encontrada entre algumas variáveis. Os resultados demonstraram que MLR e ELR foram os marcadores mais associados aos tumores de alto grau, enquanto o NLR apresentou maior capacidade preditiva para metástase linfonodal. PLR e SII não exibiram impacto significativo em nenhum dos modelos. A acurácia do modelo para metástase atingiu 95%, sugerindo potencial clínico relevante. Contudo, limitações como o tamanho amostral reduzido, a distribuição desigual entre os grupos e a ausência de controle de fatores de confusão exigem cautela na interpretação. Em síntese, este estudo evidencia que alguns índices hematológicos inflamatórios podem auxiliar na avaliação da agressividade e do risco de disseminação do mastocitoma canino. Apesar do potencial identificado, a aplicação clínica isolada desses marcadores deve ser cuidadosa, reforçando a necessidade de estudos futuros com amostras maiores e integração de marcadores moleculares e histopatológicos.

Palavras-chave: Mastocitoma cutâneo canino. Índices hematológicos inflamatórios. Marcadores prognósticos. Metástase linfonodal. Elastic Net

:

ABSTRACT

Canine cutaneous mast cell tumor exhibits highly variable biological behavior, making it challenging to predict its aggressiveness and risk of metastasis. This study aimed to evaluate the relationship between five inflammatory hematological indices — NLR, MLR, PLR, ELR, and SII — and tumor histopathological grade and nodal dissemination, investigating their potential as accessible prognostic markers in veterinary practice. A total of 29 blood samples from dogs were analyzed and distributed into control, low-grade cutaneous mast cell tumor, high-grade cutaneous mast cell tumor, and groups with or without nodal metastasis. Penalized multinomial and binary regression models (Elastic Net) were applied to identify the most relevant indices, considering the strong collinearity observed among some variables. The results showed that MLR and ELR were the markers most strongly associated with high-grade tumors, whereas NLR demonstrated greater predictive capacity for lymph node metastasis. PLR and SII did not exhibit significant impact in any of the models. The model accuracy for metastasis prediction reached 95%, suggesting relevant clinical potential. However, limitations such as the small sample size, unequal group distribution, and the absence of control for confounding factors warrant caution in interpretation. In summary, this study highlights that some inflammatory hematological indices may assist in assessing aggressiveness and risk of dissemination in canine mast cell tumors. Despite the identified potential, the isolated clinical use of these markers should be approached prudently, reinforcing the need for future studies with larger samples and integration of molecular and histopathological markers.

Key-words: Canine cutaneous mast cell tumor. Inflammatory hematological indices. Prognostic biomarkers. Lymph node metastasis. Elastic Net

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLO

NLR	<i>Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio</i> (Razão eutrófilo/Linfócito)
MLR	<i>Monocyte-to-Lymphocyte Ratio</i> (Razão Monócito/Linfócito)
PLR	<i>Platelet-to-Lymphocyte Ratio</i> (Razão Plaqueta/Linfócito)
ELR	<i>Eosinophil-to-Lymphocyte Ratio</i> (Razão Eosinófilo/Linfócito)
SII	<i>Systemic Immune-Inflammation Index</i> (Índice Sistêmico de Inflamação e Imunidade)
MCT	<i>Mast Cell Tumor</i> (Mastocitoma)
KIT	<i>Proto-oncogene c-KIT</i> (Receptor tirosina-quinase envolvido na proliferação de mastócitos)
IHC	<i>Immunohistochemistry</i> (Imuno-histoquímica)
OR	<i>Odds Ratio</i>
CI	<i>Confidence Interval</i> (Intervalo de Confiança)
AIC	Akaike Information Criterion
CV	<i>Cross-Validation</i> (Validação Cruzada)
λ (lambda)	Parâmetro de penalização dos modelos penalizados
EN	<i>Elastic Net</i>
MNL	<i>Multinomial Logistic Regression</i> (Regressão Logística Multinomial)
BLR	<i>Binary Logistic Regression</i> (Regressão Logística Binária)
LN	<i>Lymph Node</i> (Linfonodo)
HN0	Ausência de metástase linfonodal
H&E	<i>Hematoxylin and Eosin</i> (Hematoxilina e Eosina)
MCT-LG	<i>Mastocitoma Low Grade</i> (BaixoGrau)
MCT-HG	<i>Mastocitoma High Grade</i> (Alto Grau)
Ki-67	Índice de proliferação celular Ki-67
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
p53	<i>Gene supressor tumoral p53</i>
Mdm2	<i>Murine Double Minute 2 Oncogene</i>
COX-2	<i>Cyclooxygenase-2</i>

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição das raças caninas acometidas pelo mastocitoma cutâneo provenientes de Hospitais Veterinários localizados na cidade de São Paulo no período de 2023 a 2025.	29
Figura 2 - Distribuição da população canina com mastocitoma cutâneo segundo o sexo biológico provenientes de Hospitais Veterinários localizados na cidade de São Paulo no período de 2023 a 2025.	29
Figura 3 - Estratificação etária dos cães acometidos pelo mastocitoma cutâneo provenientes de Hospitais Veterinários localizados na cidade de São Paulo no período de 2023 a 2025.	30
Figura 4 - Distribuição topográfica dos mastocitomas cutâneos provenientes de Hospitais Veterinários localizados na cidade de São Paulo no período de 2023 a 2025.	31
Figura 5 - Frequência dos mastocitomas cutâneos graduados em baixo e alto grau segundo classificação de Kiupel <i>et al.</i> (2010) provenientes de Hospitais Veterinários localizados na cidade de São Paulo no período de 2023 a 2025.....	32
Figura 6 - Classificação nodal dos mastocitomas cutâneos com base na classificação de Weishaar <i>et al.</i> (2014) provenientes de Hospitais Veterinários localizados na cidade de São Paulo no período de 2023 a 2025.....	33
Figura 7 - Comportamento dos Índices Hematológicos Inflamatórios (NLR, MLR, PLR, ELR e SII) em Cães com Mastocitoma: Comparação entre Grupo Controle e Grupo Tumoral	34
Figura 8 - Mastocitoma cutâneo de baixo grau (HN0) em corte histológico corado por hematoxilina eosina.....	36
Figura 9 - Mastocitoma cutâneo de alto grau (HN3) evidenciando intensa atipia citológica e elevada densidade celular.....	36
Figura 10 - Linfonodo com infiltração metastática por mastócitos neoplásicos (mastocitoma).....	37
Figura 11 - Distribuição dos índices hematológicos (NLR, MLR, PLR, ELR e SII) de acordo com o grau histológico do mastocitoma cutâneo.....	39
Figura 12 - Distribuição dos índices hematológicos (NLR, MLR, PLR, ELR e SII) segundo o status de metástase nodal (HN0 e HN1-3)	40
Figura 13 - Análise de Colinearidade dos Marcadores Inflamatórios Hematológicos.	

.....	41
Figura 14 - Seleção do Parâmetro λ no Modelo Elastic Net para Classificação do Mastocitoma	42
Figura 15 - Razões de Chances dos Índices Hematológicos na Discriminação dos Graus Histológicos do Mastocitoma Canino (Modelo Multinomial Penalizado)	43
Figura 16 - Efeito dos Índices Hematológicos nas Probabilidades de Classificação Tumoral pelo Modelo Multinomial Penalizado	44
Figura 17 - Razões de Chances dos Índices Hematológicos na Predição de Metástase Linfonodal em Cães com Mastocitoma	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Estatísticas descritivas dos índices hematológicos inflamatórios segundo o grau histológico do mastocitoma cutâneo em cães.....	37
Tabela 2 - Distribuição dos índices inflamatórios sistêmicos (NLR, MLR, PLR, ELR e SII) conforme classificação linfonodal em cães com mastocitoma cutâneo	38

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 Comportamento tumoral e leucocitária.....	14
1.2 Aspectos clínico-patológicos e sistemas de graduação do mastocitoma cutâneo canino	15
1.3 Marcadores imuno-histoquímicos e moleculares de valor prognóstico	15
1.4 Heterogeneidade biológica, localização tumoral e implicações prognósticas	18
1.5 Lacuna entre biomarcadores teciduais e índices hematológicos inflamatórios	19
2 OBJETIVO	20
3 MATERIAIS E MÉTODOS	21
3.1 Comitê de Ética	21
3.2 Delineamento do estudo.....	21
3.3 População, critérios de inclusão e grupos de estudo.....	21
3.4 Coleta e processamento das amostras	22
3.4.1 Amostras sanguíneas e hemograma.....	22
3.4.2 Amostras teciduais e análise histopatológica	23
3.5 Cálculo dos índices hematológicos inflamatórios	24
3.6 Análise estatística descritiva e avaliação de colinearidade	24
3.7 Modelagem estatística avançada	25
3.7.1 Modelo 1 – Associação entre índices hematológicos e grau do mastocitoma..	25
3.7.2 Modelo 2 – Associação entre índices hematológicos e metástase linfonodal ..	25
4 RESULTADOS.....	27
4.1 Análise descritiva.....	27
5 DISCUSSÃO	46
6 CONCLUSÃO	57
REFERÊNCIAS.....	58

1 INTRODUÇÃO

O mastocitoma é um tumor de origem mastocitária que se desenvolve predominantemente na pele dos cães, sendo considerado uma das neoplasias cutâneas mais frequentes na espécie, atingindo incidência entre 20,9% e 22,4% em estudos brasileiros. Embora apresentem comportamento biológico extremamente variável, a taxa de recidiva depende principalmente do grau histopatológico, sendo maior nos tumores de alto grau (De Nardi et al., 2002; De Nardi et al., 2022a; Meirelles et al., 2010).

Seu potencial metastático varia conforme a classificação histopatológica, que continua sendo a ferramenta padrão utilizada por patologistas na avaliação do comportamento biológico, no estabelecimento do prognóstico e na definição de condutas terapêuticas (De Nardi et al., 2022a). As regiões do tronco, membros, períneo, cabeça e pescoço estão entre as áreas de ocorrência mais comuns, sendo que a localização anatômica da lesão pode influenciar o prognóstico, especialmente quando envolve áreas de difícil ressecção ou regiões mucocutâneas (Natividade et al., 2014; Cavalcante et al., 2020).

Macroscopicamente, o mastocitoma se manifesta como nódulos elevados, alopecicos e eritematosos na derme canina, podendo apresentar-se como lesões únicas ou múltiplas (Garrett, 2014). O diagnóstico é mais comum em cães adultos, geralmente com mais de 8 anos, sem evidência de predisposição sexual (Withrow, 2006). Algumas raças expressam predisposição genética, incluindo Boxer, Boston Terrier, Labrador Retriever, Golden Retriever e Pugs (Garrett, 2014). A prevalência e a diversidade clínica desta neoplasia refletem sua importância na rotina oncológica veterinária, tornando essencial a busca por métodos de avaliação prognóstica mais confiáveis e complementares à análise histopatológica (Cavalcante et al., 2020).

Esse tipo de tumor possui relação intrínseca com processos inflamatórios, dada a função primária das células mastocitárias nas respostas imunes. Entender essa interrelação é crucial para compreender o comportamento do tumor e suas possíveis respostas terapêuticas. Nesse sentido, o microambiente tumoral composto por células tumorais, imunocompetentes e fatores solúveis tem sido considerado um importante regulador da progressão neoplásica (Hanahan; Weinberg, 2011; Natividade et al., 2014; Stephen J. Withrow, 2006).

A literatura recente destaca que a resposta inflamatória sistêmica, resultante da

interação dinâmica entre o sistema imunológico do hospedeiro e o microambiente tumoral, pode refletir aspectos fundamentais e multifatoriais do comportamento biológico das neoplasias, incluindo sua agressividade, capacidade metastática, resposta ao tratamento e prognóstico clínico (Hanahan; Weinberg, 2011; Cavalcante et al., 2020).

Parâmetros hematológicos simples, como a razão neutrófilo/linfócito (NLR), monócito/linfócito (MLR), plaquetas/linfócito (PLR), eosinófilo/linfócito (ELR) e o índice imune-inflamatório sistêmico (SII), vêm sendo investigados na medicina humana por sua capacidade de predizer desfechos clínicos em neoplasias como câncer cervical, mamário, gastrointestinal e pulmonar (Uribe-Querol et al., 2023).

Esses índices refletem o equilíbrio entre células pró-inflamatórias e anti-inflamatórias no sangue periférico e, por consequência, o grau de ativação imunológica sistêmica frente ao tumor. A presença de inflamação crônica, evidenciada por esses biomarcadores, tem sido associada a pior prognóstico, maior taxa de metástase, menor tempo livre de doença e sobrevida reduzida (Uribe-Querol et al., 2023).

Embora os estudos que avaliam índices hematológicos inflamatórios na oncologia veterinária ainda sejam relativamente limitados, pesquisas recentes têm indicado que esses marcadores podem oferecer informações úteis sobre o comportamento biológico de algumas neoplasias caninas.

No caso dos mastocitomas, trabalhos exploratórios observaram associações entre índices como NLR, PLR e SII e variáveis prognósticas relevantes, sugerindo um possível papel complementar desses parâmetros na avaliação clínica (Horta et al., 2018; Oliveira et al., 2022). Apesar desses achados, tais índices devem ser interpretados com cautela e não substituem métodos diagnósticos e prognósticos tradicionais, sendo necessárias investigações adicionais para definir sua real aplicabilidade na prática veterinária.

Os biomarcadores inflamatórios, por serem de baixo custo e facilmente acessíveis por exames laboratoriais de rotina, podem representar ferramentas auxiliares valiosas no contexto oncológico veterinário, especialmente quando integrados a dados clínicos, histológicos e comportamentais do tumor (Cavalcante et al., 2020; Natividade et al., 2014).

1.1 Comportamento tumoral e leucocitária

Considerando o papel central da inflamação no desenvolvimento e progressão do mastocitoma canino, conforme discutido anteriormente, torna-se essencial aprofundar a compreensão da relação entre o comportamento tumoral e a atuação das células inflamatórias do sistema imune (De Nardi et al., 2022a). A presença e o perfil das populações leucocitárias no microambiente tumoral exercem influência direta sobre a biologia da neoplasia, podendo modular desde o crescimento local até o potencial metastático (De Nardi et al., 2022a; Horta et al., 2018). Nesse contexto, investigar a participação de diferentes subtipos de leucócitos e seus efeitos sobre o tumor permite avançar na caracterização de marcadores imunológicos que refletem a agressividade tumoral, além de auxiliar na definição de abordagens terapêuticas mais específicas e individualizadas.

Nos anos 2000, já havia indícios consistentes de que a inflamação associada ao tumor podia não apenas acompanhar o processo neoplásico, mas também potencializar sua progressão e conferir às células tumorais habilidades essenciais à sua sobrevivência, evasão e disseminação (Hanahan; Weinberg, 2011). Múltiplas linhas de evidência demonstram que as células do sistema imune são capazes de promover a angiogênese, a invasividade tecidual e a proliferação celular desregulada, componentes chave da tumorigênese (Maltby; Khazaie; McNagny, 2009). Além disso, foi observado que essas células inflamatórias, ao infiltrarem o tecido neoplásico, podem produzir enzimas degradadoras de matriz extracelular, como metaloproteinases, facilitando a expansão tumoral ao permitir que as células malignas migrem e invadam tecidos adjacentes, sem depender da síntese dessas enzimas pela própria célula tumoral (Chen et al., 2017).

As células leucocitárias, portanto, exercem um papel ambíguo na tumorigênese. Neutrófilos, por exemplo, podem tanto apresentar função tumoricida quanto atuar na promoção do crescimento tumoral, a depender do estímulo recebido e do contexto do microambiente (Rizzi et al., 2025a). A expressão de mediadores inflamatórios, citocinas, quimiocinas e moduladores imunológicos pode ditar a polarização funcional dessas células, inclinando-as à promoção de resposta imune antitumoral ou à sustentação de um estado inflamatório crônico e permissivo à progressão da doença (De Nardi et al., 2022a; Rizzi et al., 2025a). Essa ambiguidade funcional evidencia a importância da análise qualitativa e quantitativa dos leucócitos

periféricos e infiltrativos no contexto do mastocitoma canino (Cavalcante et al., 2020; De Nardi et al., 2022b; Natividade et al., 2014).

A interação contínua entre as células tumorais e as populações leucocitárias constitui um dos pilares da dinâmica evolutiva do tumor, interferindo diretamente no equilíbrio entre eliminação tumoral e escape imunológico. A presença, proporção e tipo de leucócitos infiltrantes como linfócitos, neutrófilos, monócitos e eosinófilos, influenciam tanto na resposta inflamatória quanto na eficácia dos mecanismos imunes de controle tumoral (Araújo et al., 2023a; Macfarlane et al., 2016; Rizzi et al., 2025b). Em muitos casos, o comportamento agressivo do mastocitoma está relacionado com o grau de infiltração por células inflamatórias, tornando essas populações alvos promissores para investigação prognóstica e, futuramente, terapêutica (Araújo et al., 2023b; Costa et al., 2022; Macfarlane et al., 2016; Natividade et al., 2014).

1.2 Aspectos clínico-patológicos e sistemas de graduação do mastocitoma cutâneo canino

O mastocitoma cutâneo canino (MCC) é uma das neoplasias mais frequentes em cães, respondendo por cerca de 16–21% dos tumores cutâneos nessa espécie, o que reforça sua relevância em oncologia veterinária de pequenos animais (Freytag et al., 2021a).

Tradicionalmente, a avaliação prognóstica baseia-se em características clínicas, como localização anatômica, presença de múltiplos nódulos, envolvimento de linfonodos regionais e metástases sistêmicas, além de parâmetros histopatológicos como grau, índice mitótico e padrão de infiltração tecidual. Estudos recentes (Halsey et al., 2017a; Kiupel; Camus, 2019) têm demonstrado que tumores cutâneos localizados em extremidades distais tendem a apresentar comportamento menos agressivo, ao passo que massas em mucosas, junções mucocutâneas ou tronco podem estar associadas a maior risco de recorrência local e disseminação, dependendo da combinação de fatores clínicos e histológicos.

Diversos estudos ao longo dos anos propuseram diferentes sistemas de classificação histopatológica para os mastocitomas caninos, refletindo a ampla variabilidade morfológica e de comportamento biológico desses tumores. Historicamente, o sistema de graduação de Patnaik, que classifica os MCC em graus I, II e III, representou um marco na estratificação prognóstica, ao demonstrar

associação entre morfologia tumoral e tempo de sobrevida (Freytag et al., 2021a). No entanto, cerca de 40% dos tumores são classificados como grau II, categoria heterogênea em termos de comportamento biológico, dificultando a tomada de decisão clínica. Diante dessa heterogeneidade e com o intuito de melhorar a reproduzibilidade entre observadores e reduzir a subjetividade diagnóstica, (Kiupel; Camus, 2019) desenvolveram um sistema de graduação simplificado, dividido apenas em baixo e alto grau, o que aprimorou a correlação entre graduação histológica, risco de metástase e mortalidade específica por MCC.

Essa classificação demonstrou maior consistência entre patologistas e melhor correlação com os desfechos clínicos. De acordo com seus critérios, um mastocitoma é considerado de alto grau quando apresenta pelo menos um dos seguintes achados: sete ou mais figuras mitóticas em 10 campos de grande aumento (CGA); três ou mais células multinucleadas contendo três ou mais núcleos em 10 CGA; três ou mais núcleos bizarramente pleomórficos em 10 CGA; ou evidência de cariomegalia. Evidências recentes reforçam que tumores classificados como de baixo grau apresentam prognóstico amplamente favorável, com sobrevida superior a dois anos e baixa taxa metastática, ao passo que aqueles de alto grau cursam com evolução agressiva, maior disseminação metastática e média de sobrevida inferior a quatro meses (De Nardi et al., 2022a; Kiupel; Camus, 2019).

Ainda assim, mesmo com a adoção sistemática da graduação de Kiupel et al, 2011 estudos recentes enfatizam que tumores de mesmo grau podem exibir respostas distintas ao tratamento e desfechos divergentes, sugerindo que a graduação isolada não captura toda a complexidade biológica da doença. (Kiupel; Camus, 2019).

Além do grau histológico, outros parâmetros histopatológicos, como o índice mitótico, a profundidade de invasão, a presença de necrose e o comprometimento de margens cirúrgicas, também se mostraram importantes para estimar prognóstico (De Nardi et al., 2022a; Horta et al., 2018). Estudos cirúrgicos retrospectivos apontam que a combinação de margens histologicamente livres com tumores de baixo grau está associada a maiores taxas de controle local e sobrevida prolongada, enquanto a excisão incompleta de massas de alto grau ou com alto índice mitótico aumenta significativamente a probabilidade de recidiva e necessidade de terapias adjuvantes (Halsey et al., 2017a; Kiupel; Camus, 2019).

Esses achados reforçam que o MCC exige abordagem multidimensional, integrando dados clínicos, cirúrgicos e histológicos para orientar condutas.

1.3 Marcadores imuno-histoquímicos e moleculares de valor prognóstico

Com o intuito de refinar a estratificação de risco além da graduação histológica, diversos marcadores imuno-histoquímicos foram propostos como potenciais indicadores prognósticos no MCC. A revisão sistemática e meta-análise do autor (Freytag et al., 2021) demonstrou que, entre mais de 50 biomarcadores avaliados, a expressão elevada de Ki-67 e BAX, bem como a expressão aberrante de KIT, apresentaram associação consistente com aumento da chance de morte relacionada ao tumor. Nessa publicação, tumores com maior índice de Ki-67 ou hipo expressão de BAX, assim como aqueles com padrão aberrante de imunomarcação de KIT, apresentaram maior probabilidade de evolução desfavorável, o que indica o potencial desses marcadores para complementar a graduação histológica na prática clínica (Freytag et al., 2021)

A mesma revisão destaca que, apesar da grande variedade de proteínas já estudadas, incluindo p53, PCNA, VEGF, CD31, proteínas pró- e antiapoptóticas e moléculas inflamatórias como COX-2 e PGE₂, poucos marcadores dispõem de evidências robustas o suficiente para serem incorporados rotineiramente na rotina diagnóstica (Freytag et al., 2021a). Entre as limitações apontadas, os autores enfatizam o pequeno tamanho amostral de muitos estudos, a heterogeneidade de raças, a ausência de padronização das técnicas imuno-histoquímicas e a falta de dados clínicos e de seguimento em longo prazo, fatores que dificultam a validação definitiva desses biomarcadores (Freytag et al., 2021a).

Dentro desse contexto, alguns estudos aprofundam a compreensão sobre a via do receptor tirosina-quinase KIT como eixo central da oncogênese dos MCC (Halsey et al., 2017a). Nesse estudo, os autores desenvolveram um ensaio imuno histoquímico específico para quantificar a forma fosforilada de KIT (pKIT) e investigaram sua associação com dois sistemas de graduação (Patnaik e Kiupel), com o índice mitótico, Ki-67, padrão de localização de KIT, mutações em c-kit e resposta ao inibidor de tirosina-quinase toceranib. A expressão de pKIT mostrou correlação significativa com o sistema de dois níveis de Kiupel e com mutações em c-kit, além de tendência de associação com índice mitótico e Ki-67, sugerindo que a ativação constitutiva dessa via está relacionada a fenótipos mais agressivos (Halsey et al., 2017a). De forma interessante, o potencial de pKIT como marcador farmacodinâmico, demonstra

redução da expressão de pKIT em biópsias obtidas poucas horas após a administração de toceranib em cães respondedores, em comparação a não responsivos. Esses achados reforçam o papel de marcadores imuno-histoquímicos não apenas na predição de prognóstico, mas também no monitoramento de resposta terapêutica e na seleção de pacientes candidatos a terapias alvo. Ainda assim, grande parte dos estudos envolvendo esta temática ressaltam a necessidade de estudos adicionais, com delineamentos mais padronizados e amostras maiores, para consolidar o uso rotineiro desses biomarcadores.

1.4 Heterogeneidade biológica, localização tumoral e implicações prognósticas

Além das variações moleculares, a localização anatômica do MCC contribui de forma significativa para a heterogeneidade de comportamento clínico. Os mastocitomas primários intranasais, por exemplo, correspondem a aproximadamente 1% de todas as neoplasias intranasais caninas e exibem comportamento clinicamente agressivo, com altas taxas de metástases em linfonodos regionais e tempo de sobrevida inferior a um ano na maioria dos casos (Larsen; Watson; Muñoz Gutiérrez, 2022).

Além disso, a baixa frequência de duplicações internas em c-KIT nessa série de casos indica que o comportamento agressivo de mastocitomas mucosos pode decorrer de outros mecanismos celulares e microambientais, o que reforça a noção de que o MCC é uma entidade biologicamente heterogênea, em que o microambiente inflamatório local, a vascularização, a interação com a mucosa e a resposta imune do hospedeiro desempenham papéis complementares na determinação do prognóstico (Larsen; Watson; Muñoz Gutiérrez, 2022). Essa heterogeneidade também é evidenciada em outros estudos (Halsey et al., 2017a; Kiupel; Camus, 2019) ressaltando que, mesmo dentro de um mesmo grau histológico e com marcadores imuno-histoquímicos semelhantes, cães podem apresentar respostas terapêuticas e tempos de sobrevida muito distintos.

Esse cenário leva à busca por abordagens integrativas que combinem informações clínicas, histopatológicas, moleculares e de resposta inflamatória sistêmica, com o objetivo de construir modelos prognósticos mais acurados e aplicáveis à rotina clínica.

1.5 Lacuna entre biomarcadores teciduais e índices hematológicos inflamatórios

Apesar do avanço no conhecimento sobre biomarcadores teciduais, como Ki 67, KIT/pKIT, BAX e outros, a maior parte dos estudos concentra-se em análises de amostras tumorais fixadas em formol e incluídas em parafina, que exigem infraestrutura laboratorial especializada, anticorpos específicos e métodos padronizados de quantificação (Freytag et al., 2021a). Embora alguns estudos mostraram marcadores com forte associação com desfechos, a variabilidade metodológica e a escassez de dados clínicos e estatísticos limitam sua incorporação ampla na rotina, especialmente em serviços com recursos limitados. Entre os biomarcadores mais estudados incluem-se Ki-67 (índice proliferativo), KIT e pKIT (padrões de expressão e ativação), BAX e Bcl-2 (marcadores de apoptose), AgNORs (proliferação nuclear), PCNA (antígeno nuclear de proliferação celular) e p53 (disfunção de ciclo celular), todos com potencial prognóstico, mas ainda dependentes de maior validação clínica (Freytag et al., 2021a).

Por outro lado, índices hematológicos inflamatórios derivados do hemograma completo, como as razões neutrófilo-linfócito, monócito-linfócito, plaqueta-linfócito, eosinófilo-linfócito e o índice inflamatório sistêmico, têm sido amplamente estudados em medicina humana e, mais recentemente, em medicina veterinária, como marcadores indiretos da interação entre inflamação sistêmica, imunidade e progressão tumoral. Estudos em cães com neoplasias sólidas sugerem que valores elevados desses índices se associam a maior carga tumoral, progressão mais rápida da doença e pior sobrevida global, justamente por espelharem um estado de inflamação crônica e imunossupressão relativa (Cavalcante et al., 2020; Freytag et al., 2021).

Contudo, há escassez de trabalhos que correlacionem, de forma sistemática, esses índices com as características clínicas, histológicas e moleculares do mastocitoma cutâneo canino. Este estudo propõe-se a investigar se índices inflamatórios obtidos do hemograma podem refletir o comportamento biológico dos MCC , utilizando-se como parâmetros a graduação histopatológica de malignidade e a disseminação nodal em consonância com as características clínicas e histológicas, representa, portanto, uma oportunidade promissora para o desenvolver ferramentas prognósticas de baixo custo e fácil aplicação na prática clínica veterinária — ponto que será aprofundado na justificativa e nos objetivos deste estudo.

2 OBJETIVO

Avaliar a relação entre marcadores hematológicos inflamatórios e;

- a presença de mastocitoma cutâneo,
- diferentes graus de mastocitomas cutâneos;
- a presença ou ausência de disseminação tumoral para linfonodos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Comitê de Ética

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Paulista (UNIP), sob o protocolo nº3141101224. Todos os tutores dos cães incluídos assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), autorizando o uso dos dados clínicos, laboratoriais e histopatológicos para fins de pesquisa, de acordo com as normas de bem-estar animal e a legislação vigente.

3.2 Delineamento do estudo

Foi conduzido um estudo observacional, analítico, transversal e retrospectivo, com abordagem quantitativa, visando avaliar a relação entre índices hematológicos inflamatórios e o comportamento biológico do mastocitoma cutâneo em cães.

Foram analisados, de forma integrada:

- dados hematológicos obtidos a partir do hemograma completo, obtido previamente à exerese tumoral;
- classificação histológica dos mastocitomas;
- classificação do linfonodo em relação à disseminação tumoral.

A partir dessas informações, foram avaliadas associações entre os índices inflamatórios:

1. grau histológico do mastocitoma;
2. presença de metástase linfonodal.

3.3 População, critérios de inclusão e grupos de estudo

Foram incluídos 29 cães, atendidos em serviços de clínica e patologia veterinária do Hovet-UNIP e do Hospital Veterinário Vet Popular, localizados na cidade de São Paulo, distribuídos em três grupos:

- G1 – Grupo Controle (n = 10): cães hígidos, sem histórico ou sinais clínicos de neoplasia e doenças inflamatórias.
- G2 – Mastocitoma de baixo grau (n = 22): cães com mastocitoma cutâneo

classificado como baixo grau de malignidade, segundo o sistema de Kiupel.

- G3 – Mastocitoma de alto grau ($n = 7$): cães com mastocitoma cutâneo classificado como alto grau.

Além da estratificação por grau histológico, os cães com mastocitoma foram categorizados conforme:

Metástase linfonodal:

- HN0: ausência de metástase nodal ($n = 11$);
- HN1-3: presença de metástase nodal ($n = 9$);
- I: status nodal indeterminado ($n = 9$);

Critérios de inclusão:

- cães de qualquer raça, idade ou sexo;
- diagnóstico histopatológico confirmado de mastocitoma cutâneo (para G2 e G3);
- disponibilidade de hemograma completo realizado no período prévio à cirurgia;
- ficha clínica contendo informações sobre idade e sexo
- e avaliação histopatológica do linfonodo sentinel e/ou regional

Critérios de exclusão:

- ausência de hemograma completo compatível com o momento do diagnóstico;
- dados histopatológicos incompletos ou sem classificação segundo Kiupel;
- presença de doenças inflamatórias graves não neoplásicas, potencialmente capazes de interferir de forma importante nos índices hematológicos inflamatórios (a critério do pesquisador e do orientador).

3.4 Coleta e processamento das amostras

3.4.1 Amostras sanguíneas e hemograma

Foram obtidos 2 mL de sangue periférico de cada cão, por punção venosa, em tubos contendo anticoagulante EDTA. As amostras foram analisadas em laboratório de diagnóstico veterinário para realização de hemograma completo, incluindo:

- contagem total de leucócitos;
- contagens absolutas de neutrófilos, linfócitos, monócitos e eosinófilos;
- contagem de plaquetas;
- avaliação morfológica em esfregaço sanguíneo, quando indicada.

Esses dados constituíram a base para o cálculo dos índices hematológicos inflamatórios.

3.4.2 Amostras teciduais e análise histopatológica

Fragmentos de lesões cutâneas compatíveis com mastocitoma, bem como linfonodos regionais suspeitos de metástase, foram colhidos durante biópsias incisivas ou procedimentos cirúrgicos de excisão. Todas as amostras foram avaliadas por um único patologista ao longo do estudo, o que garante padronização dos critérios diagnósticos, mas também representa uma limitação metodológica, uma vez que o padrão-ouro em estudos de mastocitoma envolve a avaliação independente por dois ou mais patologistas para redução do viés de interpretação. Assim, embora os diagnósticos tenham seguido critérios consolidados na literatura, a ausência de leitura dupla ou revisão interobservador deve ser considerada como potencial fonte de variabilidade.

As amostras foram:

- fixadas em formol tamponado a 10%;
- processadas em rotina histotécnica;
- seccionadas em cortes de aproximadamente 4 µm;
- coradas em hematoxilina-eosina (HE) e azul de toluidina (linfonodo).

A análise histopatológica e a graduação dos mastocitomas foram realizadas por patologistas veterinários, de forma cega em relação aos índices hematológicos, utilizando o sistema de graduação em dois níveis proposto por Kiupel *et al.* (2011):

Quando disponível, o linfonodo regional foi classificado histopatologicamente seguindo o protocolo de Weishaar *et al.*, 2014, referindo-se a presença ou ausência de metástase, compondo as categorias HN0 (ausência de metástase), HN1-3 (presença de metástase) ou indeterminado (I).

3.5 Cálculo dos índices hematológicos inflamatórios

A partir das contagens celulares obtidas no hemograma, foram calculados os seguintes índices inflamatórios sistêmicos:

- NLR=neutrófilos absolutos/linfócitos absolutos
- MLR=monócitos absolutos/linfócitos absolutos
- PLR=plaquetas/linfócitos absolutos
- ELR=eosinófilos absolutos/linfócitos absolutos
- SII (índice inflamatório-imune sistêmico)

$SII = \text{plaquetas} \times \text{neutrófilos absolutos} / \text{linfócitos absolutos}$

Esses índices foram comparados:

- entre G1, G2 e G3 (controle, baixo e alto grau);
- entre HN0 (sem metástase) e HN1-3 (com metástase) – sendo o grupo I descrito, mas não incluído nas análises binárias de metástase.

3.6 Análise estatística descritiva e avaliação de colinearidade

Os dados foram organizados em planilhas eletrônicas e analisados em software estatístico, incluindo GraphPad Prism®e R (pacote glmnet) (GraphPad Software, 2024).

Inicialmente, foi realizada análise descritiva das variáveis:

- cálculo de médias, desvios-padrão, medianas e intervalos interquartis; estratificação por grau histológico, presença de metástase e neoplasia concomitante (Tabelas 1, 2 e 3 dos resultados).

Em seguida, foi construída uma matriz de correlação entre os cinco índices (NLR, MLR, PLR, ELR e SII), a fim de verificar a colinearidade. Foi observada correlação elevada ($r \geq 0,7$) entre:

- NLR e PLR;
- NLR e SII;
- PLR e SII.

Essa colinearidade justificou o uso de modelos de regressão penalizados (Elastic Net) em vez de regressões logísticas convencionais, com o objetivo de:

- reduzir o impacto de variáveis redundantes;

- evitar sobreajuste (*overfitting*);
- preservar a interpretabilidade clínica dos índices.

3.7 Modelagem estatística avançada

3.7.1 Modelo 1 – Associação entre índices hematológicos e grau do mastocitoma

Para avaliar a associação entre os índices hematológicos inflamatórios e o grau do mastocitoma, foi ajustado um modelo de regressão logística multinomial penalizada, considerando:

- Desfecho multinomial:
 - G1: cães sem mastocitoma (controle);
 - G2: mastocitoma de baixo grau;
 - G3: mastocitoma de alto grau.
- Variáveis preditoras contínuas:
 - NLR, MLR, PLR, ELR, SII.

Foi utilizado o método Elastic Net ($\alpha = 0,5$), que combina as penalizações LASSO e Ridge, permitindo simultaneamente:

- controle da colinearidade;
- seleção das variáveis mais influentes.

A função *cv.glmnet*, com validação cruzada em 5 *folds*, foi utilizada para escolher o valor de λ que minimizou o erro de classificação;

- definir o conjunto final de variáveis com coeficientes diferentes de zero. Os coeficientes obtidos na escala de log-odds foram posteriormente convertidos em odds ratios (OR), facilitando a interpretação clínica do efeito de cada índice sobre a probabilidade de o cão pertencer a cada categoria de grau tumoral.

3.7.2 Modelo 2 – Associação entre índices hematológicos e metástase linfonodal

Para investigar a relação entre os índices inflamatórios e a presença de metástase linfonodal, foi ajustado um modelo de regressão logística binária penalizada, considerando:

- Desfecho binário:
 - HN0: ausência de metástase linfonodal;
 - HN1-3: presença de metástase linfonodal.

Cães com status linfonodal indeterminado (grupo I) foram excluídos desta análise específica.

- Variáveis preditoras: NLR, MLR, PLR, ELR e SII.

Novamente, foi utilizado o método Elastic Net ($\alpha = 0,5$), com validação cruzada (cv.glmnet, 5 folds), selecionando o λ que resultou em:

- erro de classificação mínimo (~5%);
- acurácia aproximada de 95%, conforme descrito na seção de resultados. Os coeficientes foram convertidos em odds ratios, permitindo a avaliação do aumento ou redução das chances de metástase linfonodal a cada incremento unitário nos índices hematológicos.

4 RESULTADOS

4.1 Análise descritiva

Quadro 1 - Caracterização dos casos avaliados quanto a raça, sexo, idade, localização tumoral e status nodal.

Nº DA AMOSTRA	RAÇA	SEXO	IDADE (ANOS)	LOCAL DO TUMOR	GRAU HISTOLÓGICO	CLASSIFICAÇÃO NODAL
01	SRD	F	10	Membro pélvico	A	'
02	SRD	M	14	Membro pélvico	B	HN0
03	Dogo Argentino	F	7	Membro pélvico	B	HN2
04	SRD	F	12	Membro pélvico	A	HN0
05	SRD	F	9	Membro torácico	B	HN3
06	Pit Bull	F	10	Região de mama	A	HN0
07	SRD	M	13	Membro pélvico	B	HN0
08	SRD	F	6	_____	B	HN0
09	SRD	F	5	Membro torácico	A	HN2
10	Pincher	F	3	_____	B	_____
11	SRD	M	10	_____	A	HN3
12	SRD	M	5	_____	B	_____
13	Bull Terrier	F	4	_____	B	_____
14	Maltês	F	7	_____	B	HN0
15	Shih-Tzu	F	15	Região de mama	B	_____
16	Yourshire	M	4	Plano nasal	B	HN0
17	SRD	F	9	Perivulvar	B	HN1

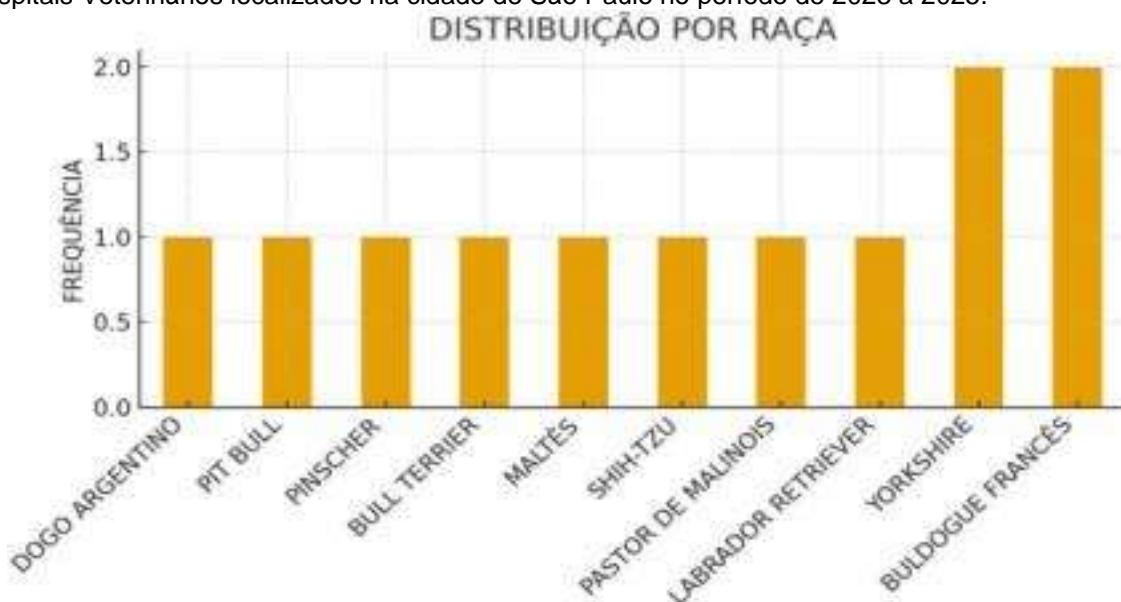
18	Pastor de Millinois	F	13	—	B	—
19	SRD	F	5	—	B	—
20	SRD	F	10	—	B	HN1
21	SRD	F	11	—	B	—
22	Labrador	F	11	—	B	—
23	SRD	F	10	—	B	HN0
24	SRD	F	2	Mama	B	HN3
25	Yorkshire	F	11		A	HN0
26	SRD	F	8		B	HN0
27	Buldogue Francês	M	7	Inguinal	B	HN0
28	SRD	M	9	—	A	—
29	Buldogue Francês	F	8	Membro pélvico	B	HN3

Legenda: F: fêmea; M: macho; A: alto grau; B: baixo grau.

Fonte: Dados da pesquisa, 2025

Observou-se (Quadro 1) a caracterização dos 29 casos incluídos no estudo, descrevendo as variáveis demográficas e clínicas relevantes para a análise dos mastocitomas caninos. Foram avaliadas raça, sexo, idade, localização anatômica e grau histológico do tumor, bem como classificação nodal segundo os critérios histopatológicos. Essa síntese permite visualizar o perfil geral da população estudada e identificar padrões epidemiológicos importantes, que serão explorados nas análises subsequentes de distribuição etária, predomínio por sexo, topografia tumoral e disseminação nodal.

Figura 1 - Distribuição das raças caninas acometidas pelo mastocitoma cutâneo provenientes de Hospitais Veterinários localizados na cidade de São Paulo no período de 2023 a 2025.



Fonte: Dados da pesquisa, 2025.

Visualiza-se na Figura 1 a diversidade racial entre os cães avaliados, com maior frequência observada na raça Buldogue Francês e Yorkshire. Observa-se também um contingente expressivo de animais sem raça definida (SRD), o que é compatível com o perfil populacional atendido em muitos serviços veterinários. Essa heterogeneidade, incluindo a elevada proporção de SRD, confirma que o mastocitoma pode acometer múltiplas raças, sem padrão fenotípico exclusivo claramente estabelecido.

Figura 2 - Distribuição da população canina com mastocitoma cutâneo segundo o sexo biológico provenientes de Hospitais Veterinários localizados na cidade de São Paulo no período de 2023 a 2025.



Fonte: Dados da pesquisa, 2025.

Observa-se (Figura 2) predomínio marcante de fêmeas ($\approx 76\%$), indicando que, nesta casuística, o sexo feminino foi mais frequentemente acometido. A proporção de machos foi menor, porém ainda representativa. Essa distribuição contribui para caracterizar o perfil demográfico básico da população analisada.

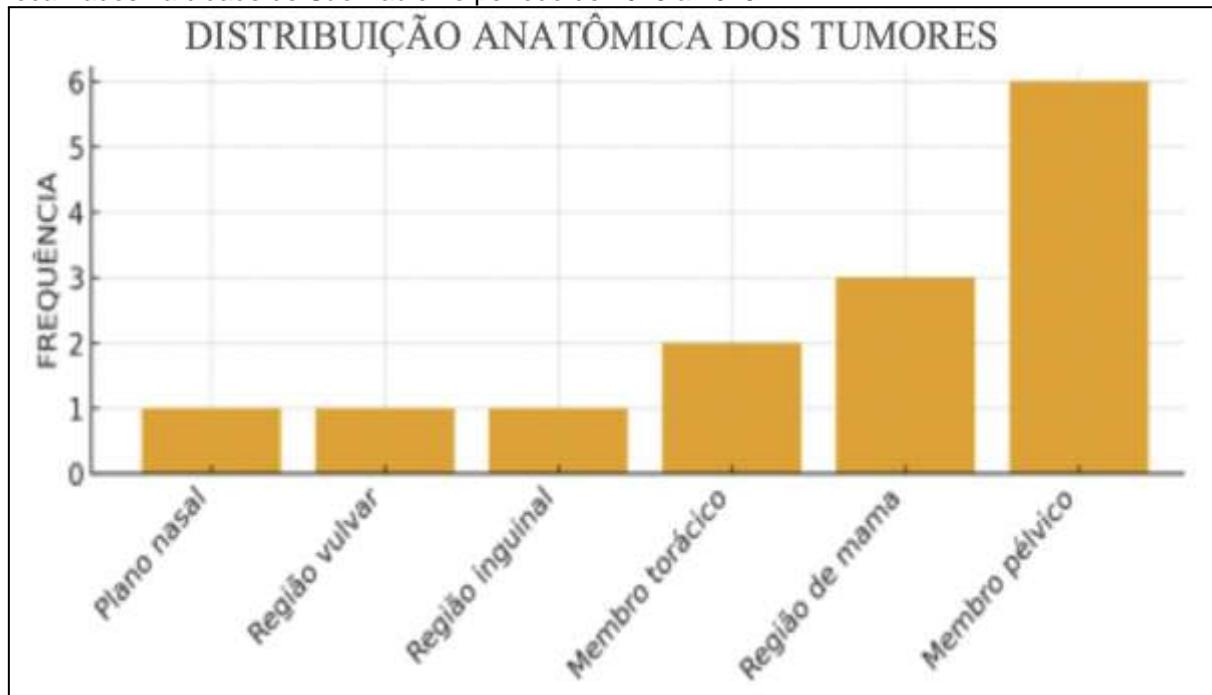
Figura 3 - Estratificação etária dos cães acometidos pelo mastocitoma cutâneo provenientes de Hospitais Veterinários localizados na cidade de São Paulo no período de 2023 a 2025.



Fonte: Dados da pesquisa, 2025.

Observa-se (Figura 3) que a maioria dos cães diagnosticados encontra-se na faixa etária adulta e idosa, com concentração de casos entre 7 e 10 anos, compatível com o comportamento epidemiológico conhecido do mastocitoma canino. Esses dados reforçam o predomínio da neoplasia em animais mais velhos.

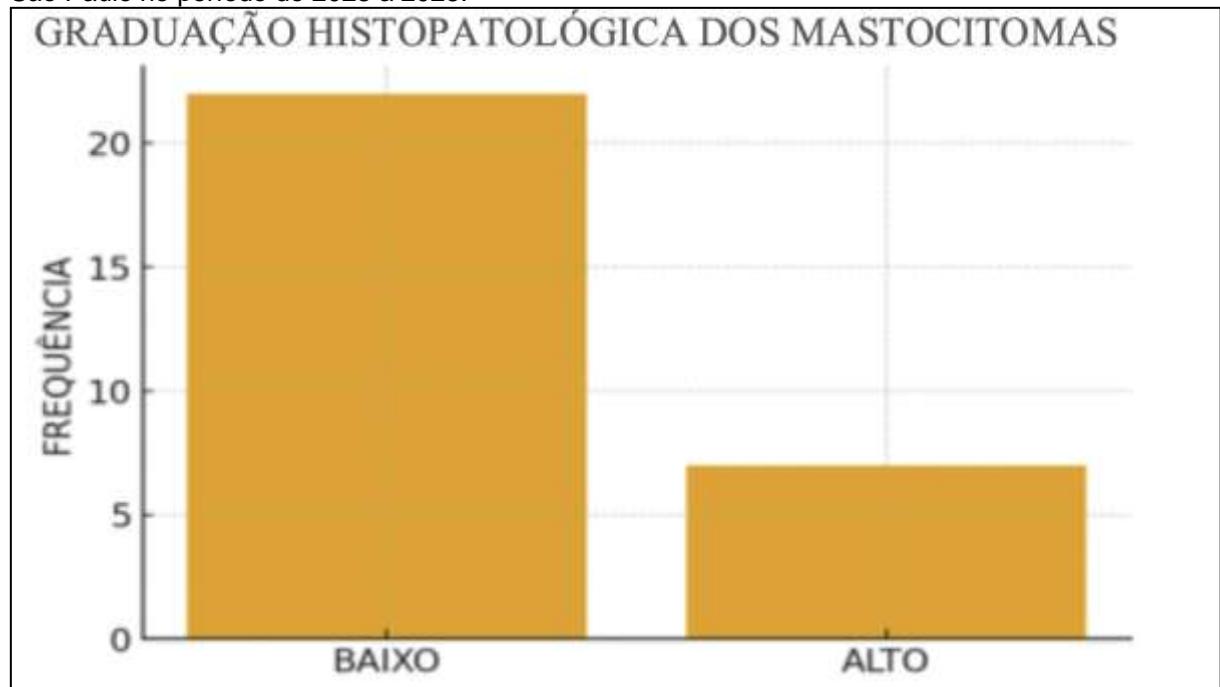
Figura 4 - Distribuição topográfica dos mastocitomas cutâneos provenientes de Hospitais Veterinários localizados na cidade de São Paulo no período de 2023 a 2025.



Fonte: Dados da pesquisa, 2025.

Podemos observar (Figura 4) que a maioria das lesões ocorreu em membros pélvicos, seguidas por regiões de mama e membro torácico. Essa variabilidade anatômica reforça o caráter heterogêneo da apresentação clínica do mastocitoma. Destaca-se que esse padrão difere do descrito em grande parte da literatura, na qual as localizações mais comuns incluem tronco, membros torácicos, cabeça e pescoço. Essa divergência pode refletir características específicas da população avaliada, possíveis vieses amostrais ou particularidades regionais do serviço atendido.

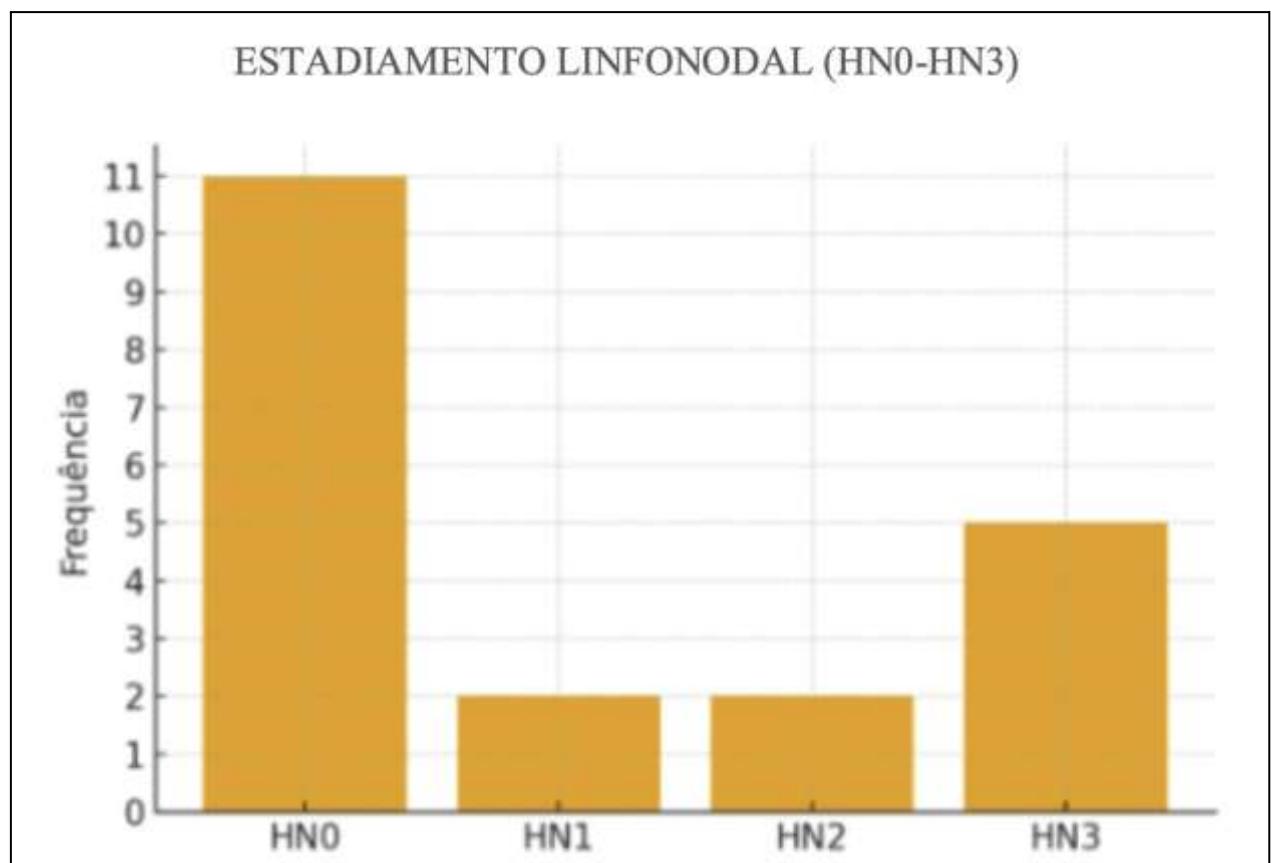
Figura 5 - Frequência dos mastocitomas cutâneos graduados em baixo e alto grau segundo classificação de Kiupel et al. (2010) provenientes de Hospitais Veterinários localizados na cidade de São Paulo no período de 2023 a 2025.



Fonte: Dados da pesquisa, 2025.

Observa-se (Figura 5) clara predominância de mastocitomas de baixo grau ($\approx 76\%$) em relação aos de alto grau ($\approx 24\%$). Esse padrão reflete a maior frequência clínica de tumores com comportamento biológico menos agressivo. No entanto, a presença de casos de alto grau reforça a relevância da estratificação prognóstica.

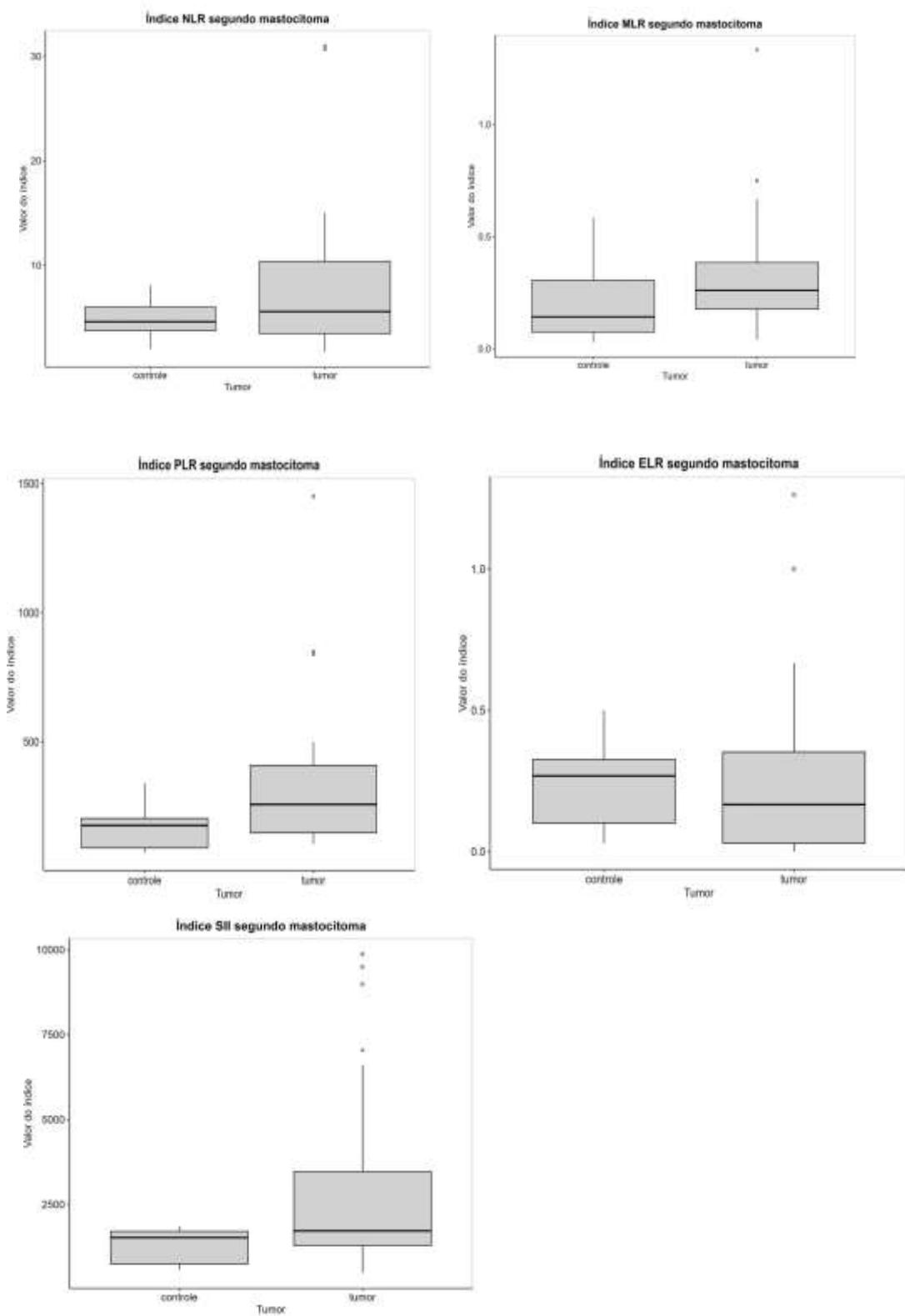
Figura 6 - Classificação nodal dos mastocitomas cutâneos com base na classificação de Weishaar et al. (2014) provenientes de Hospitais Veterinários localizados na cidade de São Paulo no período de 2023 a 2025.



Fonte: Dados da pesquisa, 2025.

A análise (Figura 6) evidencia maior número de cães classificados como HN0, indicando ausência de metástase linfonodal. Entretanto, os grupos HN1, HN2 e HN3 também aparecem representados, refletindo presença de disseminação tumoral em parcela dos animais. Essa distribuição é essencial para as análises prognósticas subsequentes

Figura 7 - Comportamento dos Índices Hematológicos Inflamatórios (NLR, MLR, PLR, ELR e SII) em Cães com Mastocitoma: Comparação entre Grupo Controle e Grupo Tumoral



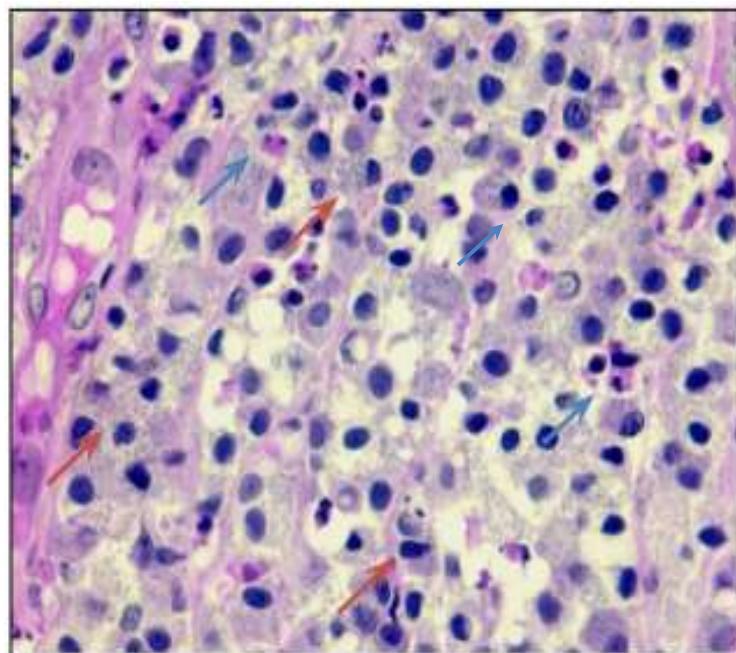
Fonte: Dados da pesquisa, 2025.

Os cinco gráficos demonstram de forma consistente que todos os índices hematológicos inflamatórios avaliados (NLR, MLR, PLR, ELR e SII) apresentam valores aumentados no grupo tumoral em comparação ao grupo controle, refletindo o estado inflamatório sistêmico característico do mastocitoma. Entre eles, o SII se destaca como o marcador mais impactante, evidenciado por sua mediana elevada e ampla dispersão, sugerindo maior sensibilidade em captar alterações combinadas de neutrófilos, plaquetas e linfócitos. O NLR e o PLR também exibem elevações marcantes no grupo tumoral, reforçando sua utilidade como biomarcadores de agressividade e inflamação associadas ao tumor. Essa tendência geral de elevação dos índices demonstra que o mastocitoma promove um desequilíbrio inflamatório detectável no hemograma, fortalecendo a relevância desses parâmetros como potenciais marcadores prognósticos e ferramentas auxiliares na avaliação clínica e terapêutica dos pacientes.

Os cortes histológicos corados em HE foram utilizados para a caracterização da histogênese tumoral e para a determinação do seu grau de malignidade, conforme os critérios estabelecidos por Kiupel *et al.* 2011. Nas Figuras 8 e 9, é possível observar o contraste entre as neoplasias de baixo e alto grau. Os mastocitomas de baixo grau apresentam organização tecidual mais preservada, menor densidade celular, células neoplásicas com maior uniformidade morfológica, núcleos regulares, e pleomorfismo discreto. Em oposição, os tumores classificados como de alto grau exibem elevada densidade celular, associada a acentuada perda da arquitetura, anisocariose, incremento mitótico, com atipias e eventual binucleação.

Figura 8 - Mastocitoma cutâneo de baixo grau (HN0) em corte histológico corado por hematoxilina eosina.

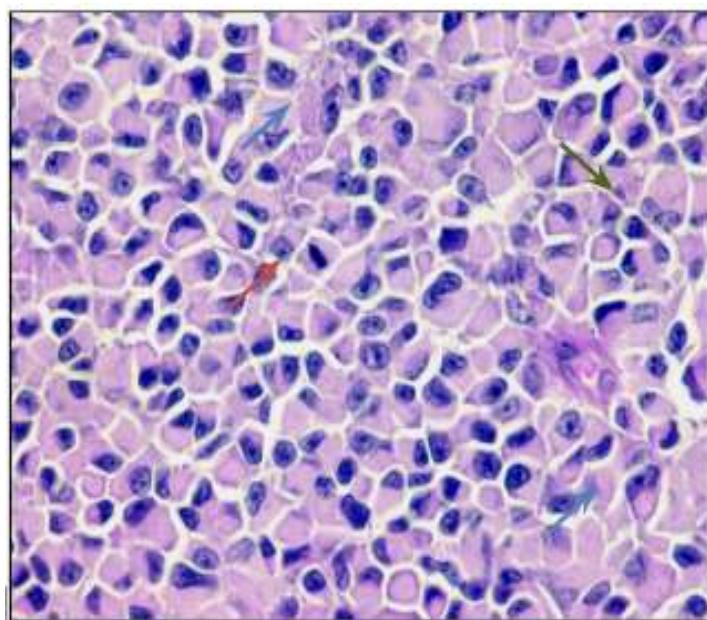
Fotomicrografia de corte histológico de mastocitoma de baixo grau, HN0, evidenciando moderada celularidade e o discreto pleomorfismo citonuclear, com frequente granulação citoplasmática nas células neoplásicas (setas vermelhas). Presença de infiltração eosinofílica (setas azuis) e binucleação (seta verde). Hematoxilina-eosina, objetiva 60x



Fonte: Dados da pesquisa, 2025.

Figura 9 - Mastocitoma cutâneo de alto grau (HN3) evidenciando intensa atipia citológica e elevada densidade celular.

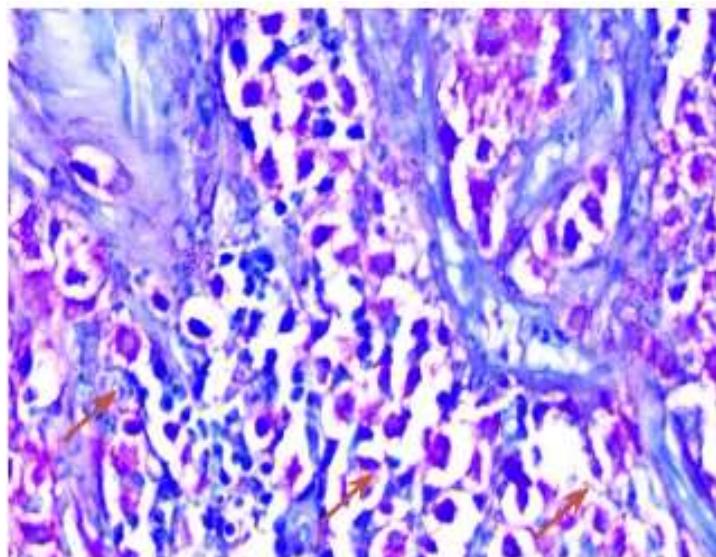
Fotomicrografia de corte histológico de mastocitoma de alto grau, HN3, evidenciando densa população de mastócitos neoplásicos com citoplasma amplo, deslocamento periférico nuclear. Presença de figura de mitose (seta vermelha), anisocariose (setas azuis) e binucleação (seta verde). Hematoxilina-eosina, objetiva 60x



Fonte: Dados da pesquisa, 2025.

Figura 10 - Linfonodo com infiltração metastática por mastócitos neoplásicos (mastocitoma metastático).

Fotomicrografia de corte histológico de linfonodo colonizado por células neoplásicas (HN3) apresentando metacromasia citoplasmática (setas vermelhas) em corte corado pelo azul de toluidina, objetiva 40x.



Fonte: Dados da pesquisa, 2025.

Abaixo seguem duas tabelas com um descritivo geral, considerando todos os índices.

- Grupos de mastocitoma (G1, G2, G3)
- Grupo de metástase nodal (HN0, HN1-3 e Indeterminado)

Tabela 1 - Estatísticas descritivas dos índices hematológicos inflamatórios segundo o grau histológico do mastocitoma cutâneo em cães

Grau do mastocitoma	N	Idade (média ± DP)	NLR (média ± DP)	MLR (média ± DP)	PLR (média ± DP)	ELR (média ± DP)	SII (média ± DP)
G1	10	6.7 ± 4.03	4.8 ± 1.8	0.2 ± 0.18	167.3 ± 86.5	0.24 ± 0.16	1273.9 ± 522.42
G2	22	8.23 ± 3.65	6.79 ± 4.21	0.27 ± 0.19	299.43 ± 68.16	0.19 ± 0.19	2883.94 ± 2383.43
G3	7	9.57 ± 2.23	11.83 ± 13.08	0.52 ± 0.39	440.64 ± 517.28	0.45 ± 0.5	3524.29 ± 4071.07

Legenda: G1: grupo controle; G2: mastocitoma de baixo grau; G3: mastocitoma de alto grau.

Fonte: Dados da pesquisa, 2025.

A Tabela 1, evidencia um padrão de incremento gradativo dos índices hematológicos inflamatórios conforme o grau histológico do mastocitoma. Cães do grupo controle (G1) apresentaram as menores médias de NLR, MLR, PLR, ELR e SII,

enquanto os animais com tumores de alto grau (G3) exibiram elevações marcantes, especialmente no NLR (11.83 ± 13.08) e no SII (3524.29 ± 4071.07). O grupo intermediário (G2) mostrou valores transitórios entre G1 e G3, configurando um gradiente compatível com a progressão histopatológica. Esses resultados indicam que a intensificação da resposta inflamatória sistêmica acompanha o aumento da agressividade tumoral.

Tabela 2 - Distribuição dos índices inflamatórios sistêmicos (NLR, MLR, PLR, ELR e SII) conforme classificação linfonodal em cães com mastocitoma cutâneo

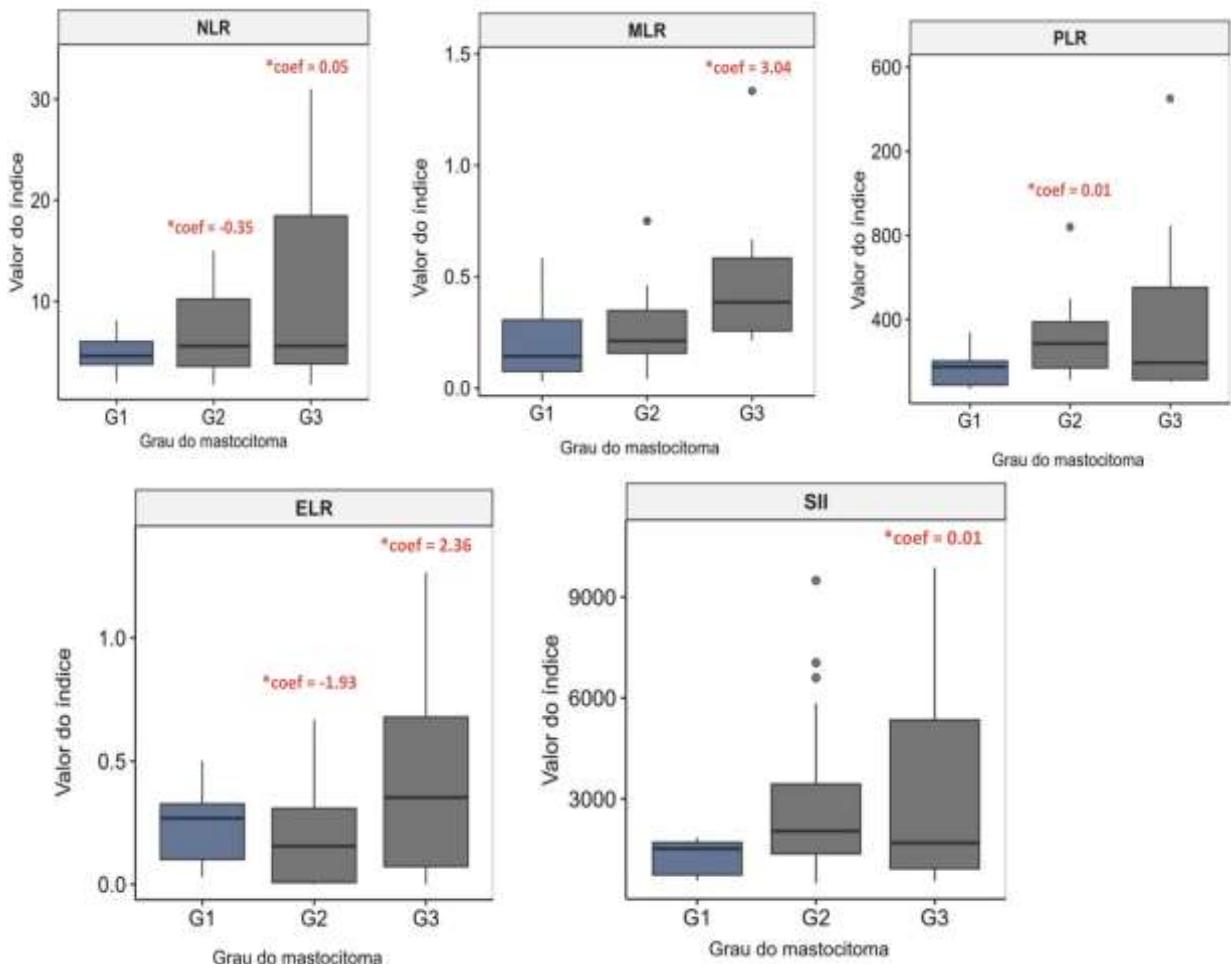
Metástase nodal	N	NLR (média ± DP)	MLR (média ± DP)	PLR (média ± DP)	ELR (média ± DP)	SII (média ± DP)
HN0	11	9.49 ± 8.27	0.35 ± 0.23	441.18 ± 397.37	0.24 ± 0.32	3913.73 ± 3512.82
HN1-3	9	10.23 ± 8.74	0.41 ± 0.39	322.08 ± 219.54	0.24 ± 0.32	3913.73 ± 3512.82

Legenda: HN0: grupo sem metástase nodal; HN1-3: grupo com metástase nodal

Fonte: Dados da pesquisa, 2025.

Na Tabela 2, observa-se uma análise descritiva estratificada pelo status metastático, verificou-se que cães com metástase linfonodal (HN1-3) apresentaram médias mais elevadas de NLR (10.75 ± 9.29) e ELR (0.31 ± 0.38) quando comparados aos animais sem metástase (HN0), cujos valores foram 7.65 ± 5.21 e 0.22 ± 0.26 , respectivamente. Esses resultados sugerem maior ativação inflamatória sistêmica nos casos com disseminação linfonodal. O SII manteve-se elevado tanto em HN0 quanto em HN1-3, indicando associação com a carga tumoral global. Esses padrões são consistentes com os achados dos modelos estatísticos penalizados, que identificaram o NLR como o marcador mais associado à presença de metástase linfonodal.

Figura 11 - Distribuição dos índices hematológicos (NLR, MLR, PLR, ELR e SII) de acordo com o grau histológico do mastocitoma cutâneo

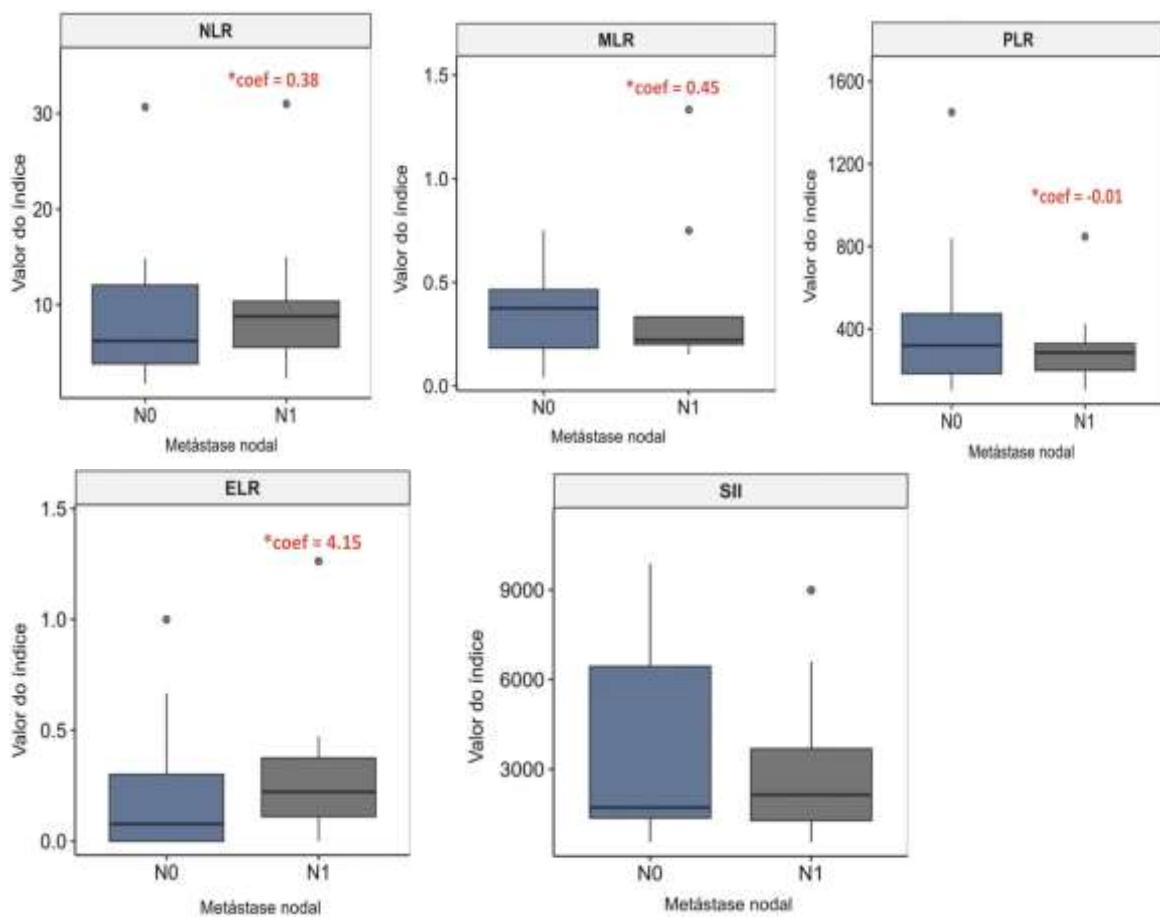


Fonte: Dados da pesquisa, 2025.

Os índices hematológicos NLR, MLR, PLR, ELR e SII demonstram um aumento gradativo e consistente conforme o avanço do grau histológico do mastocitoma cutâneo, com elevações marcantes principalmente no grupo G3. Esse padrão evidencia que mastocitomas de maior agressividade induzem um estado inflamatório sistêmico mais intenso, caracterizado por neutrofilia relativa, linfopenia e trombocitose — alterações típicas de microambientes tumorais mais desregulados. Entre os marcadores, o SII e o PLR apresentam as maiores amplitudes e dispersões no G3, destacando-se como potenciais indicadores de maior carga inflamatória e possível pior prognóstico. Os coeficientes positivos do modelo Elastic Net corroboram esses achados ao identificar esses índices como variáveis relevantes na diferenciação entre os graus histológicos. Esses resultados reforçam a utilidade clínica dos biomarcadores derivados do hemograma como ferramentas acessíveis, de baixo custo e potencialmente aplicáveis no refinamento prognóstico e estratificação de risco em

cães com mastocitoma

Figura 12 - Distribuição dos índices hematológicos (NLR, MLR, PLR, ELR e SII) segundo o status de metástase nodal (HN0 e HN1-3)

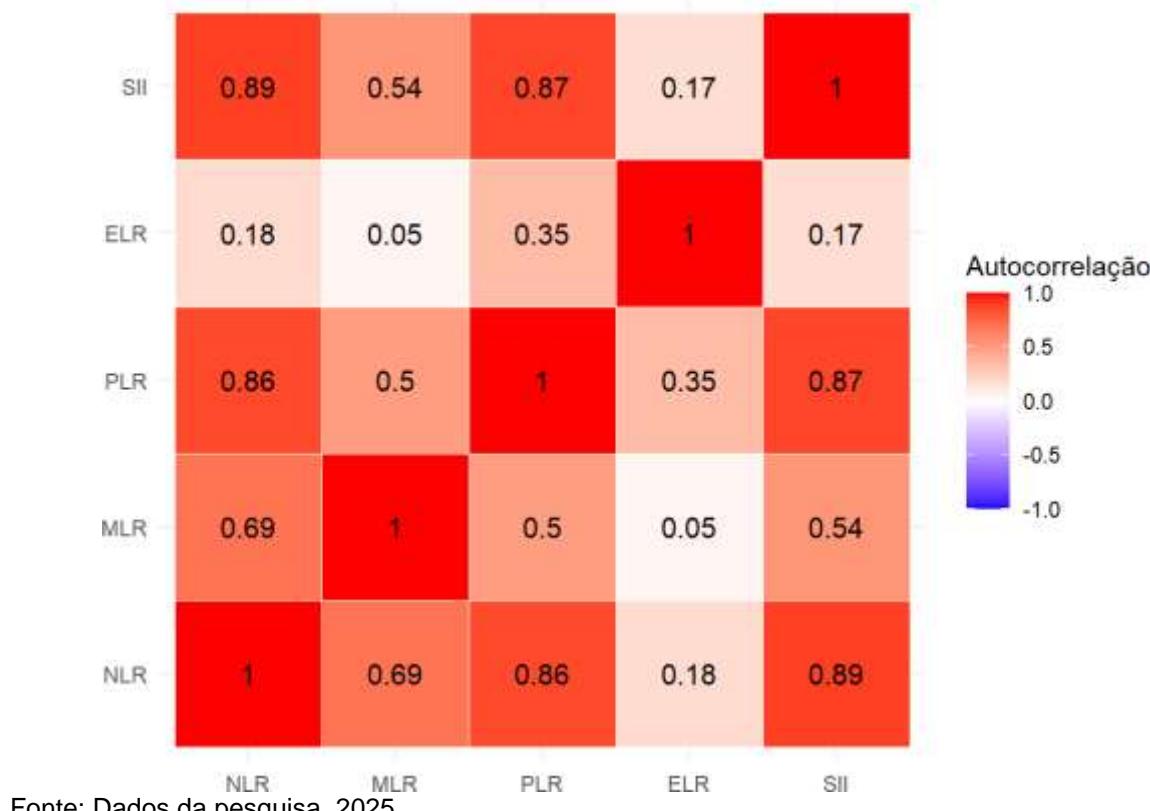


Fonte: Dados da pesquisa, 2025.

Os índices hematológicos avaliados (NLR, MLR, PLR, ELR e SII) exibem apenas variações discretas entre os grupos HN0 e HN1-3, sem diferenças claramente definidas que indiquem uma resposta inflamatória sistêmica distinta associada à presença de metástase nodal. Embora alguns índices, como PLR e SII, apresentam medianas numericamente maiores no grupo HN0, esse comportamento sugere ausência de padrão consistente e reforça que a inflamação sistêmica derivada do hemograma não se altera de maneira previsível diante da disseminação linfonodal. A baixa magnitude dos coeficientes estimados pelo modelo Elastic Net confirma essa limitação, indicando que esses marcadores possuem reduzido poder discriminatório para detectar metástase nodal isoladamente. Esses achados sugerem que, ao contrário do observado na diferenciação dos graus histológicos do mastocitoma, os

índices inflamatórios não são sensíveis para capturar o impacto biológico da progressão linfonodal, evidenciando que outros parâmetros clínicos, citológicos ou moleculares podem ser mais apropriados para essa finalidade

Figura 13 - Análise de Colinearidade dos Marcadores Inflamatórios Hematológicos.
Autocorrelação entre os índices hematológicos sistêmicos

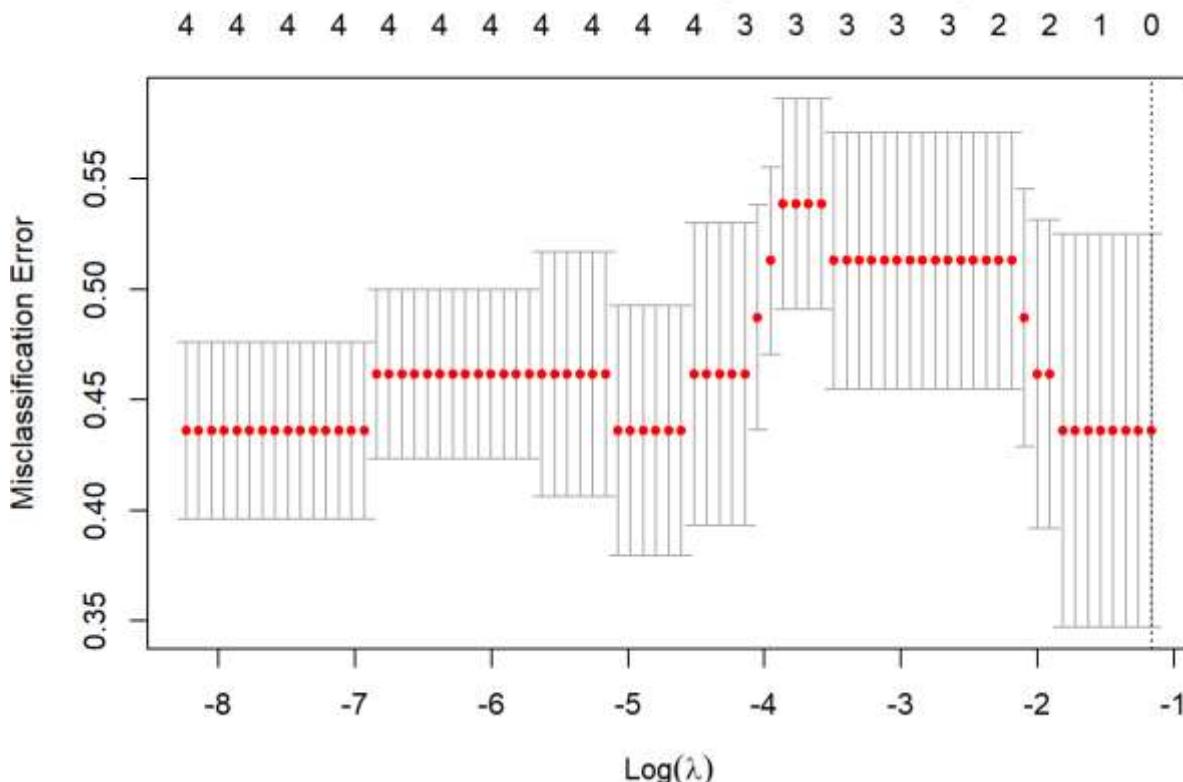


Fonte: Dados da pesquisa, 2025.

Observa-se na Figura 12, que a matriz de correlação entre os índices hematológicos inflamatórios. Verificou-se alta colinearidade ($r \geq 0,7$) nos pares NLR–PLR, NLR–SII e PLR–SII, indicando forte redundância entre esses marcadores. Em contraste, MLR e ELR mostraram correlações baixas com os demais índices. Diante desse padrão, optou-se pelo uso de regressão penalizada (Elastic Net), a fim de evitar instabilidade dos coeficientes e garantir seleção adequada das variáveis.

Figura 14 - Seleção do Parâmetro λ no Modelo Elastic Net para Classificação do Mastocitoma

Modelo Multinomial (Mastocitoma)

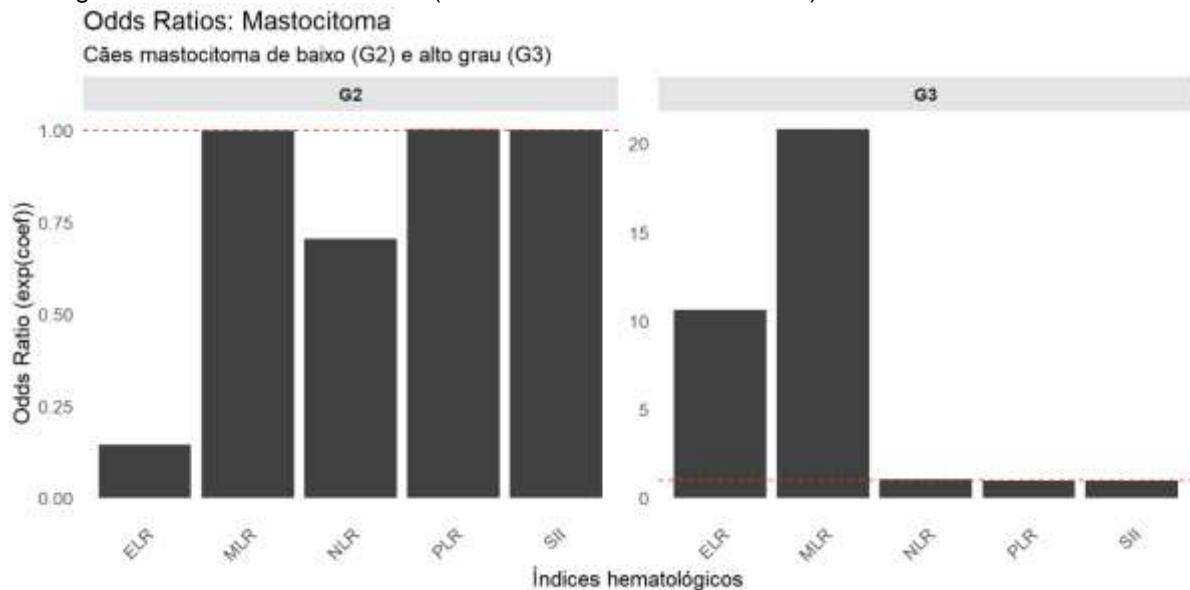


Fonte: Dados da pesquisa, 2025.

Possível identificar como o erro de classificação do modelo varia conforme a força da penalização ($\log \lambda$) no ajuste Elastic Net. Observa-se que o modelo apresenta melhor desempenho com penalização fraca, quando mais variáveis permanecem ativas, resultando em erro próximo de 0,44. À medida que a penalização aumenta, algumas variáveis são excluídas e o erro tende a subir.

Esse comportamento reforça o achado da figura anterior: devido à alta colinearidade entre NLR, PLR e SII, o uso de regressão penalizada é necessário para estabilizar o modelo, permitindo selecionar apenas os preditores realmente informativos, fornecendo o melhor equilíbrio entre desempenho e controle da colinearidade.

Figura 15 - Razões de Chances dos Índices Hematológicos na Discriminação dos Graus Histológicos do Mastocitoma Canino (Modelo Multinomial Penalizado)

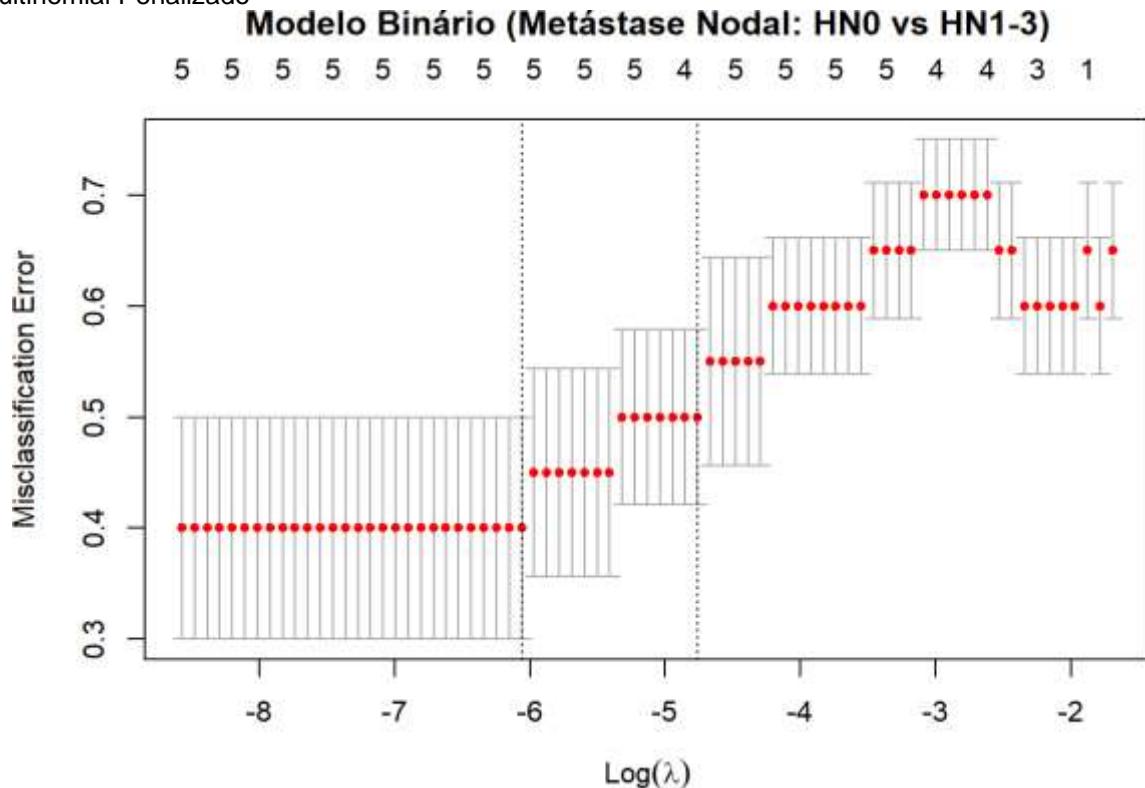


Fonte: Dados da pesquisa, 2025.

Os valores de “odds ratio” (OR) para cada índice hematológico, obtidos por meio do modelo multinomial penalizado, permitem visualizar o quanto cada índice está associado à probabilidade de classificação do tumor como de baixo grau (G2) ou alto grau (G3). Observa-se que os índices MLR e ELR apresentam os maiores valores de OR para tumores de alto grau, indicando um aumento expressivo na probabilidade de a neoplasia ser considerada mais agressiva quando esses índices estão elevados. Em contraste, os índices NLR, PLR e SII, após a penalização, mostram efeito discreto ou tendem a valores próximos de zero, sugerindo que seu poder discriminativo é limitado nesse conjunto de dados (Figura 15).

Esses achados reforçam que MLR e ELR destacam-se como os marcadores hematológicos mais promissores para a identificação de mastocitomas cutâneos caninos com maior grau histológico (G3), contribuindo para o prognóstico tumoral.

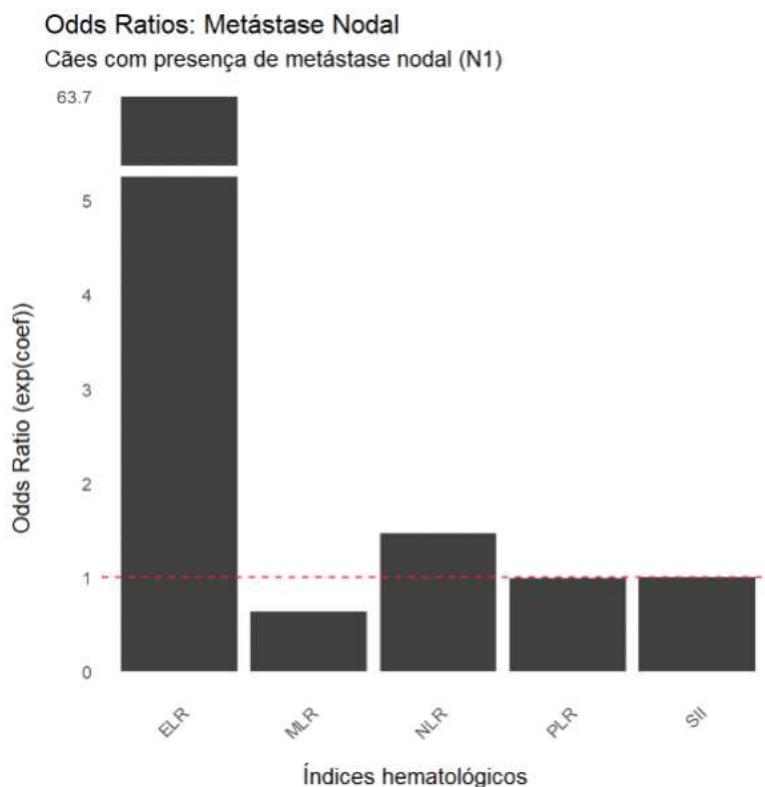
Figura 16 - Efeito dos Índices Hematológicos nas Probabilidades de Classificação Tumoral pelo Modelo Multinomial Penalizado



Fonte: Dados da pesquisa, 2025.

O Gráfico, apresentado na Figura 16, referente ao Modelo Binário, demonstra que o menor erro de classificação ocorre quando a penalização é pequena ($\log \lambda < -6$), condição em que todas as variáveis permanecem no modelo. À medida que a penalização aumenta e os coeficientes são reduzidos a zero, o erro cresce de forma consistente, indicando pior desempenho. Assim, o modelo binário discrimina melhor entre cães HN0 e HN1-3 quando utiliza todos os índices hematológicos, destacando a importância conjunta desses marcadores na predição de metástase nodal.

Figura 17 - Razões de Chances dos Índices Hematológicos na Predição de Metástase Linfonodal em Cães com Mastocitoma



Fonte: Dados da pesquisa, 2025.

Os valores de “odds ratio” (OR) para cada índice hematológico, obtidos por meio do modelo multinomial penalizado, permitem visualizar o quanto cada índice está associado à probabilidade de apresentar metástase nodal. Observa-se que o índice NLR apresenta efeito mais robusto, com aumento das chances de haver metástase nodal quando esse índice está elevado.

O índice ELR, (Figura 17) embora tenha apresentado algum aumento nas chances para presença de metástase em linfonodo, revela baixa consistência ou instabilidade após a penalização — o que reduz sua confiabilidade como marcador discriminativo neste conjunto de dados. Em contraste, o MLR apresentou efeito protetor, com o seu aumento associado a uma redução de chances de metástase. O PLR mostrou efeito mínimo, praticamente neutro, enquanto o SII não apresentou associação com o risco.

5 DISCUSSÃO

Os índices hematológicos inflamatórios — como NLR, MLR, PLR, ELR e SII, têm ganhado destaque na literatura biomédica por refletirem, de maneira prática e acessível, a interação entre inflamação sistêmica, microambiente tumoral e resposta imune do hospedeiro. Em oncologia humana, esses índices já foram amplamente associados à progressão tumoral, estadiamento clínico, risco de metástase e sobrevida global, sendo utilizados como marcadores prognósticos complementares em diversas neoplasias, incluindo carcinomas mamários, ovarianos, pulmonares e gastrointestinais. Na medicina veterinária, entretanto, o uso desses marcadores ainda é incipiente e pouco padronizado, com estudos concentrados principalmente em tumores mamários, linfomas e mastocitomas. Ainda assim, trabalhos recentes demonstram que alterações em neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos e plaquetas podem refletir aspectos relevantes da biologia tumoral, como ativação inflamatória, imunossupressão, angiogênese e disseminação metastática (Cavalcante *et al.*, 2020; De Nardi *et al.*, 2022; Halsey *et al.*, 2017; Kiupel e Camus, 2019; Zmorzynski *et al.*, 2024). Dessa forma, compreender o comportamento desses índices no contexto do mastocitoma canino torna-se essencial para discutir adequadamente seu potencial prognóstico e interpretar os achados deste estudo.

A presente pesquisa investigou o valor prognóstico de cinco índices hematológicos inflamatórios: NLR, MLR, PLR, ELR e SII, em cães com mastocitoma cutâneo, avaliando sua associação com a presença de mastocitoma cutâneo, com o grau histológico do tumor e com a presença de metástase linfonodal. A utilização desses marcadores, apesar de amplamente aplicada em oncologia humana, ainda é incipiente na medicina veterinária, o que confere ao presente estudo relevância clínica e patológica. Os achados obtidos foram confrontados com o corpo de literatura disponível, incluindo estudos focados em marcadores moleculares, características histopatológicas, comportamento biológico, proliferação celular, expressão de KIT e outras proteínas relacionadas à progressão tumoral, como alguns estudos têm demonstrado (Cruz *et al.*, 2020; Garrett, 2014b; Scase *et al.*, 2006; Stefanello *et al.*, 2024; Webster *et al.*, 2008).

Os resultados iniciais da análise descritiva demonstraram diferenças claras entre os grupos tumorais e o grupo controle. Cães com mastocitoma, sobretudo os de alto grau, exibiram maiores valores de NLR, ELR e SII, além de variações ampliadas

em PLR e MLR. Essas observações sugerem que a agressividade tumoral está associada ao aumento da inflamação sistêmica. O comportamento observado é coerente com os mecanismos fisiopatológicos descritos nos estudos (Halsey *et al.*, 2017b; Scase *et al.*, 2006), que descreveram como mastócitos neoplásicos promovem cascadas inflamatórias e angiogênicas, capazes de alterar o perfil hematológico periférico. Esses estudos ressaltam que mediadores como histamina, TNF- α , IL-6 e VEGF modulam respostas imunes sistêmicas, potencialmente influenciando índices como NLR e SII (Da Silva; Jamur; Oliver, 2014; De Nardi *et al.*, 2022a; Zmorzynski *et al.*, 2024).

A matriz de correlação apresentou um padrão marcante de colinearidade entre NLR, PLR e SII (correlações $\geq 0,7$), evidenciando que esses marcadores compartilham informação hematológica redundante devido à forte participação de neutrófilos, plaquetas e linfócitos em seus cálculos. Essa característica justifica a adoção do Elastic Net, uma vez que regressões logísticas convencionais apresentaram instabilidade dos coeficientes e risco real de sobreajuste. Assim, a escolha metodológica do modelo penalizado não apenas se alinha ao padrão observado nos dados, como também assegura interpretação mais robusta, restringindo o impacto da colinearidade na inferência estatística.

O desempenho do modelo multinomial ajustado pelo Elastic Net apresentou erro de classificação próximo de 0,44, indicando uma acurácia moderada dentro do cenário avaliado. Embora esse valor não represente uma capacidade preditiva excelente, ele está de acordo com o que se observa em estudos com amostras pequenas e distribuição desbalanceada entre as classes, como frequentemente ocorre em pesquisas com mastocitoma. Dessa forma, os índices hematológicos, mesmo com limitações inerentes, demonstraram potencial para contribuir com modelos prognósticos iniciais e hipóteses clínicas relevantes, sobretudo quando integrados a marcadores histológicos e moleculares.

Tomados em conjunto, os resultados evidenciam que diferentes índices inflamatórios capturam dimensões distintas da interação entre tumor e sistema imunológico. A permanência de MLR e ELR nos modelos penalizados sugere que esses marcadores podem representar vias inflamatórias mais específicas relacionadas ao comportamento tumoral e à disseminação nodal.

Ao mesmo tempo, a colinearidade entre NLR, PLR e SII indica que tais marcadores refletem um eixo comum de inflamação sistêmica, o que não reduz sua

importância biológica, mas demanda cautela no uso isolado. Esses achados reforçam a necessidade de integrar abordagens hematológicas, histológicas e moleculares para construir modelos prognósticos mais robustos e clinicamente aplicáveis.

A avaliação da colinearidade entre as variáveis revelou correlações elevadas entre NLR, PLR e SII, justificando plenamente a escolha de modelos penalizados. Os modelos penalizados constituem uma abordagem estatística que incorpora termos de penalização aos coeficientes de regressão, com o objetivo de lidar com colinearidade elevada e evitar o sobreajuste dos dados.

Entre esses métodos, o Elastic Net destaca-se por combinar simultaneamente as penalizações L1 (Lasso) e L2 (Ridge), permitindo tanto reduzir coeficientes inflacionados pela correlação quanto realizar seleção de variáveis ao ajustar automaticamente a contribuição de cada índice no modelo. Essa estratégia é particularmente útil quando múltiplos marcadores apresentam forte interdependência, como observado entre NLR, PLR e SII na presente casuística, situação que inviabilizaria regressões tradicionais. Assim, o uso de modelos penalizados assegurou estimativas mais estáveis, maior capacidade preditiva e seleção dos índices realmente associados aos desfechos de interesse.

Essa decisão metodológica encontra respaldo em estudos de avaliação prognóstica em oncologia comparada, como (Garrett, 2014b; Scase *et al.*, 2006), que destacaram a importância de abordar variáveis correlacionadas para evitar estimativas instáveis. A adoção do modelo Elastic Net também reduz o risco de super penalização, problema amplamente discutido em pesquisas sobre previsão tumoral, onde a inconsistência entre observadores é citada como alvo de métodos analíticos mais refinados.

O comportamento dos índices em relação ao grau histológico do mastocitoma, segundo os critérios de (Kiupel; Camus, 2019) que destacou o papel do MLR e do ELR como potenciais marcadores discriminativos. Tumores de alto grau apresentaram maiores valores de MLR e ELR, indicando a participação relevante de monócitos e eosinófilos no contexto sistêmico.

Segundo Garrett (2014b) e Scase *et al.* (2006), a interação entre mastócitos e células inflamatórias periféricas pode refletir o dinamismo tumoral, enquanto a classificação histológica e expressão de marcadores de tumores de mastócitos caninos descrevem como infiltrados eosinofílicos se associam a tumores mais invasivos. A maior contribuição do ELR no presente estudo reforça a hipótese de que

eosinófilos desempenham papel mais marcante em tumores de alto grau, possivelmente por influência de secreções mastocitárias que modulam a proliferação e o recrutamento de células inflamatórias.

A modesta participação do NLR no modelo multinomial, embora relevante, contrasta com estudos que demonstram forte envolvimento desse marcador na progressão tumoral em outras neoplasias. Contudo, a literatura específica sobre mastocitoma é heterogênea. Enquanto artigos como Cruz *et al.*, 2020; Garrett, 2014b; Halsey *et al.*, 2017b mostram a importância geral de neutrófilos como mediadores inflamatórios pró tumorais, ressaltam que alterações sistêmicas podem variar amplamente conforme localização anatômica, mutações de KIT e microambiente tumoral. Tais variabilidades reforçam a necessidade de interpretar o NLR no contexto próprio do mastocitoma, reconhecendo que sua relevância pode estar mais associada à disseminação linfonodal do que ao grau tumoral.

O modelo binário para metástase linfonodal revelou desempenho superior, com acurácia de 95%, e apontou o NLR como preditor significativo. Esse achado é particularmente importante, pois a avaliação do linfonodo regional é uma das etapas mais críticas no estadiamento do mastocitoma, conforme referido por Freytag *et al.*, 2021. A relevância do NLR pode ser explicada por mecanismos já discutidos em estudos sobre disseminação tumoral, como demonstrado por (Kiupel *et al.*, 2011) que descreveu o papel dos neutrófilos na facilitação da invasão e migração tumoral. Nesse sentido, o NLR elevado pode refletir tanto a supressão linfocitária quanto a ativação neutrofílica, dois processos fortemente associados à metástase (Da Silva; Jamur; Oliver, 2014; Liu *et al.*, 2024).

O comportamento elevado do ELR na predição da metástase nodal, embora estatisticamente instável, sugere possível papel dos eosinófilos no contexto metastático. Estudos envolvendo fatores de crescimento endotelial vascular (VEGF) e densidade microvascular em mastócitos caninos, foi observado que os eosinófilos são fontes importantes de mediadores pró-angiogênicos, podendo contribuir para maior vascularização do microambiente tumoral e, consequentemente, facilitar a disseminação (Freytag *et al.*, 2021b; Halsey *et al.*, 2017b).

No entanto, a literatura também reconhece que valores inflacionados de OR podem indicar instabilidade numérica, especialmente em amostras pequenas, como destacado nesses estudos (Bostock, 1973; Cavalcante *et al.*, 2020; Natividade *et al.*, 2014), que recomendam cautela na extrapolação de marcadores isolados.

Em relação ao PLR e ao SII, sua ausência de relevância nos modelos evidenciado neste estudo, contrasta com estudos de outras neoplasias, mas encontra eco em artigos que demonstram variabilidade no mastocitoma. Trabalhos como nesta revisão (Freytag *et al.*, 2021) ressaltam que a biologia do mastocitoma é multivariada, envolvendo marcadores de proliferação, vias de sinalização e fenótipos moleculares que nem sempre se refletem em parâmetros hematológicos periféricos. Isso reforça a necessidade de integrar diferentes dimensões de avaliação tumoral para construir modelos prognósticos mais sólidos.

Ao comparar os resultados deste estudo com a literatura focada em expressão de KIT — especialmente o que foi observado nestes estudos escrito por Halsey *et al.*, 2017; Scase *et al.*, 2006, ambos perceberam uma convergência importante: tumores biologicamente mais ativos e agressivos apresentam padrões sistêmicos mais intensos, seja em sinalização molecular (KIT ativado), seja em alterações hematológicas (aumento de NLR, MLR e ELR). Essa integração de achados abre perspectivas para modelos prognósticos híbridos que combinem análises histológicas, moleculares e hematológicas.

O número reduzido de cães e a distribuição desigual entre os grupos de mastocitoma limitam a generalização dos resultados. A literatura enfatiza repetidamente que estudos com mastocitoma exigem grandes amostras e controle rigoroso de variáveis externas, como demonstrado por De Nardi *et al.*, 2022; Kiupel; Camus, 2019, que mostraram que inconsistências na classificação histológica podem influenciar os resultados de pesquisas. Além disso, a dependência de índices hematológicos simples pode ser afetada por condições inflamatórias não relacionadas ao tumor, pelo estresse do animal ou por uso de medicamentos, conforme descrito em estudos que abordam resposta inflamatória sistêmica em cães.

Em termos de perspectivas futuras, estudos prospectivos e multicêntricos são essenciais para validar a utilidade dos índices hematológicos. A incorporação de marcadores moleculares, como mutações c-KIT, expressão de Ki-67, BCL-2, p53 e COX-2 — discutidas nos artigos escritos por Cruz *et al.*, 2020; Garrett, 2014b; Scase *et al.*, 2006 — permitiram compreender melhor se existe sinergia entre marcadores sistêmicos e intratumorais. Outra linha promissora envolve integrar parâmetros de neovascularização, já sugeridos em outros estudos, com índices inflamatórios, avaliando se a angiogênese contribui para alterações hematológicas detectáveis (Freytag *et al.*, 2021b; Larsen; Watson; Muñoz Gutiérrez, 2022).

Por fim, estudos experimentais também podem explorar se intervenções terapêuticas, como uso de anti-histamínicos, corticoides ou inibidores de tirosina-quinase, modificam índices inflamatórios e se essas alterações se correlacionam com respostas clínicas. Essa abordagem translacional, pode transformar os índices hematológicos em ferramentas dinâmicas de monitoramento terapêutico, ampliando sua aplicação prática (Freytag *et al.*, 2021b).

Portanto, compreender a interação entre células hematológicas e o microambiente tumoral torna-se essencial para elucidar a complexidade biológica dos mastocitomas caninos, sobretudo diante da grande variabilidade clínica e prognóstica desta neoplasia. A participação de linfócitos, neutrófilos e plaquetas transcende seu papel tradicional na resposta inflamatória sistêmica e assume função decisiva na modulação da progressão tumoral, influenciando mecanismos de invasão, angiogênese, imunossupressão e disseminação metastática (Liu *et al.*, 2024; Melo *et al.*, 2013).

A literatura demonstra que a dinâmica celular periférica reflete, de forma indireta, processos centrais que ocorrem no interior do tumor, justificando a relevância crescente dos índices hematológicos inflamatórios, especialmente em mastocitomas de alto grau ou com envolvimento linfonodal, nos quais métodos tradicionais de estadiamento apresentam limitações importantes (Melo *et al.*, 2013).

Os linfócitos representam o principal eixo da vigilância imunológica contra células malignas, influenciando diretamente a capacidade do organismo de controlar e retardar a proliferação tumoral. Em mastocitomas, a presença de linfopenia periférica é frequentemente interpretada como sinal de exaustão imune e incapacidade de sustentar uma resposta citotóxica eficaz contra o tumor. A diminuição dos linfócitos, refletida em índices elevados como NLR e MLR, associa-se a maior agressividade tumoral, maior risco de metástase e sobrevida reduzida (Costa *et al.*, 2022).

Isso ocorre porque os linfócitos T e células NK desempenham papéis fundamentais na destruição de células malignas e na modulação da resposta inflamatória (Da Silva; Jamur; Oliver, 2014; Zmorzynski *et al.*, 2024). A queda dessas populações facilita um ambiente de escape tumoral, permitindo que o mastocitoma recrute outras populações celulares pró-tumorais e avance rapidamente, especialmente nos tumores classificados como de alto grau pela graduação de Kiupel (Kiupel; Camus, 2019; Melo *et al.*, 2013).

Os neutrófilos, por sua vez, ocupam papel paradoxal na biologia tumoral. Embora tradicionalmente associados à defesa contra patógenos, no microambiente neoplásico eles podem adquirir um fenótipo pró-tumoral, contribuindo para progressão e metástase. Tumores sólidos, incluindo mastocitomas agressivos, liberam mediadores que estimulam o recrutamento e a reprogramação funcional dessas células, favorecendo um perfil conhecido como N2, que secreta metaloproteinases, espécies reativas de oxigênio, IL-8 e TNF- α , todas substâncias que facilitam angiogênese, degradação da matriz extracelular e disseminação tumoral.

A formação de NETs (neutrophil extracellular traps), já descrita em vários modelos tumorais, pode também potencializar a adesão e migração de células malignas (Araújo *et al.*, 2023b; Da Silva; Jamur; Oliver, 2014). Esses mecanismos explicam por que o NLR foi o índice com maior poder preditivo para metástase nodal em sua tese, uma vez que elevadas contagens de neutrófilos associadas à linfopenia sugerem um microambiente sistêmico permissivo ao avanço tumoral. O conceito é reforçado por literatura que aponta neutrófilos como moduladores críticos da invasão linfonodal (De Nardi *et al.*, 2002; De Nardi *et al.*, 2022b).

As plaquetas são outro componente chave na interface entre inflamação e neoplasia. Atualmente reconhecidas como participantes ativas da biologia tumoral, elas liberam fatores de crescimento como TGF- β , PDGF e VEGF, que estimulam angiogênese, remodelação tecidual e proteção das células tumorais contra o sistema imune (Da Silva; Jamur; Oliver, 2014; Liu *et al.*, 2024).

Em mastocitomas, há evidências de que as plaquetas possam atuar como “escudos biológicos” que revestem células tumorais circulantes, auxiliando sua sobrevivência e extravasão para órgãos-alvo, mecanismo fundamental na formação de metástases. Alterações no PLR, mesmo quando não significativas em seu modelo final, refletem processos biológicos reais e já descritos na literatura, especialmente em tumores de comportamento infiltrativo ou com propensão à disseminação hematogênica. A elevação do SII, que combina neutrófilos + plaquetas sobre linfócitos, é considerada um marcador robusto de ativação inflamatória sistêmica, embora em seu conjunto de dados não tenha se destacado, possivelmente devido ao tamanho amostral e distribuição heterogênea dos casos avaliados (Melo *et al.*, 2013; Zmorzynski *et al.*, 2024).

A relevância dos monócitos, refletida diretamente no índice MLR, complementa esse cenário. Os monócitos são precursores dos macrófagos associados ao tumor

(TAMs), células reconhecidas por sua influência na promoção de angiogênese, imunossupressão e proliferação tumoral. Em mastocitomas, TAMs com fenótipo M2 são particularmente associados a tumores de alto grau e metástases regionais, pois liberam IL-10, TGF-β e fatores anti-inflamatórios, como prostaglandina E2 (PGE2), arginase-1 (ARG1) e citocinas moduladoras IL-4 e IL-13, que enfraquecem respostas celulares antitumorais enquanto estimulam a progressão neoplásica (Maltby; Khazaie; McNagy, 2009).

Este estudo identificou o MLR como um dos preditores mais fortemente associados ao alto grau tumoral, reforçando a importância da atividade monocítica na evolução clínica. Estudos recentes sugerem que o microambiente rico em TAMs pode inclusive estar associado a padrões específicos de ativação via KIT e mutações relacionadas ao comportamento mais agressivo, achados compatíveis com a literatura contemporânea (Maltby; Khazaie; McNagy, 2009).

Os eosinófilos, incorporados ao índice ELR, também desempenham papel relevante na fisiopatologia dos mastocitomas. Eles são recrutados pelo mastócito por meio de eotaxinas e IL-5 e participam de um ciclo de retroalimentação inflamatória, potencializando a liberação de histamina, proteases e mediadores bioativos.

A infiltração eosinofílica é frequentemente observada em mastocitomas de comportamento agressivo e pode refletir não apenas a atividade tumoral local, mas também distúrbios sistêmicos como hipereosinofilia induzida por degranulação mastocitária. O ELR mostrou-se associado ao alto grau, reforçando que a combinação entre eosinofilia e linfopenia é um fenômeno compatível com tumores proliferativos, mais desorganizados e com maior capacidade de remodelação tecidual, como já descrito em análises histopatológicas tradicionais (Melo *et al.*, 2013).

Ao integrar esses elementos, seus achados demonstram que a resposta inflamatória sistêmica é capaz de refletir, com boa acurácia, aspectos centrais da biologia tumoral, especialmente quando observada por meio de modelos analíticos avançados como o Elastic Net. A seleção de MLR e ELR como marcadores para alto grau e de NLR para metástase nodal indica que os componentes hematológicos não são apenas indicadores inespecíficos de inflamação, mas refletem mecanismos celulares centrais, coerentes com a literatura contemporânea em oncologia veterinária. Esse padrão, presente também em tumores mamários e linfomas estudados em alguns dos artigos anexados, reforça que a hematologia periférica pode contribuir significativamente para estratificação prognóstica quando métodos

moleculares e imuno-histoquímicos avançados não estão acessíveis (De Nardi *et al.*, 2022b).

Por fim, ao considerar a complexidade dos mastocitomas caninos — cuja apresentação clínica e comportamento são amplamente variáveis — o conjunto de evidências aponta que a combinação entre parâmetros inflamatórios sistêmicos, achados histopatológicos e marcadores teciduais representa caminho promissor para futuras pesquisas (Maltby; Khazaie; McNagny, 2009).

A tese contribui de forma relevante para esse avanço ao demonstrar que índices hematológicos podem ser incorporados como ferramentas complementares para avaliação prognóstica, especialmente em cenários de recursos limitados. Estudos futuros devem explorar a integração desses índices com dados moleculares, expressão de KIT/pKIT, Ki-67 e padrões mutacionais, ampliando a capacidade de estratificação e personalização terapêutica em cães com mastocitoma (De Nardi *et al.*, 2022b; Melo *et al.*, 2013).

Um dos principais vieses desta pesquisa diz respeito ao tamanho amostral relativamente reduzido e à distribuição desigual entre os grupos analisados, especialmente no caso dos cães com metástase linfonodal, que representaram uma parcela pequena da amostra total. É importante destacar que se trata de uma amostra de conveniência, obtida a partir dos casos disponíveis durante o período estudado, o que, embora comum em pesquisas retrospectivas de mastocitoma, limita o controle sobre variáveis clínicas e patológicas relevantes. Amostras pequenas e não probabilísticas tendem a gerar estimativas instáveis, aumentar a variabilidade interna dos modelos e comprometer a capacidade de generalização dos achados.

Nesse contexto, este trabalho deve ser compreendido como um estudo piloto, cuja função principal é estabelecer fundamentos analíticos e identificar padrões preliminares capazes de orientar investigações futuras com amostras maiores e desenho prospectivo. Essa abordagem exploratória é pertinente porque os índices hematológicos inflamatórios podem sofrer influência significativa de condições clínicas não tumorais, como inflamação sistêmica, estresse fisiológico, uso prévio de corticosteroides ou comorbidades e, portanto, estudos subsequentes com maior poder estatístico são necessários para validar e ampliar os resultados aqui apresentados. Assim, embora o presente estudo oferece contribuições importantes ao revelar tendências iniciais, ele também reforça a necessidade de pesquisas multicêntricas e com casuísticas ampliadas para confirmar o real valor prognóstico desses índices no

mastocitoma canino.

Além disso, a sub-representação de certos grupos (como tumores de alto grau) pode ter limitado a capacidade do modelo penalizado de capturar padrões reais de associação. Modelos multinomiais e binários, embora adequados para esse tipo de análise, são sensíveis à heterogeneidade amostral, e mesmo com o uso de Elastic Net, que reduz overfitting, esse risco não é totalmente eliminado em conjuntos de dados pequenos. Dessa forma, os achados desta pesquisa devem ser interpretados levando em conta que diferenças observadas entre graus tumorais e estados metastáticos podem refletir peculiaridades da amostra analisada, e não características universais dos mastocitomas caninos.

Outro viés relevante decorre da ausência de controle formal de potenciais variáveis de confusão que possam afetar os índices hematológicos inflamatórios analisados. Parâmetros como NLR, MLR, PLR, ELR e SII são altamente sensíveis a múltiplos fatores além do tumor, incluindo infecções concomitantes, alergias, inflamações crônicas, parasitos, estresse fisiológico, administração prévia de corticoides, anti-inflamatórios ou quimioterápicos, além de efeitos relacionados à idade, estado reprodutivo e comorbidades individuais.

Durante a coleta de dados, nem todas essas variáveis puderam ser controladas ou padronizadas, e a ausência desse controle reduz a capacidade de isolar o efeito tumoral sobre os índices estudados, introduzindo possível viés de confusão. Embora os estudos enfatizaram a importância de análises integradas e controle de fatores externos, a natureza retrospectiva e a impossibilidade de intervenção direta limitaram tais controles neste estudo. Assim, parte dos padrões observados pode refletir influência mista entre atividade tumoral e fatores sistêmicos não relacionados, comprometendo parcialmente a interpretação causal dos resultados.

Um terceiro viés decorre de limitações metodológicas intrínsecas ao uso de índices hematológicos como marcadores prognósticos, bem como da forte colinearidade observada entre NLR, PLR e SII. Apesar do uso de modelos penalizados como Elastic Net, técnica reconhecida por mitigar efeitos de colinearidade, ainda existe risco de distorção das estimativas, sobretudo quando preditores altamente correlacionados competem entre si no mesmo modelo.

A interpretação de Odds Ratios extremamente elevados, como observado para o ELR no modelo de metástase, pode representar tanto um sinal biológico verdadeiro quanto uma artefato estatístico relacionado ao pequeno número de eventos positivos.

Adicionalmente, índices hematológicos são marcadores indiretos, derivados de frações celulares periféricas que não necessariamente refletem de forma direta os mecanismos tumorais intrínsecos.

Estudos recentes encontrados na literatura destacaram que a agressividade do mastocitoma está profundamente ligada a vias moleculares, como mutações de KIT, padrões de proliferação, angiogênese e microambiente tumoral, que não são capturadas integralmente por índices hematológicos sistêmicos.

Portanto, embora os modelos utilizados tenham sido estatisticamente apropriados, existe risco de viés metodológico tanto na seleção dos preditores quanto na generalização dos achados, exigindo validação futura em amostras maiores, homogêneas e com integração de variáveis clínicas, histológicas e moleculares.

6 CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo demonstram que os índices hematológicos inflamatórios apresentam potencial para auxiliar na caracterização do comportamento biológico do mastocitoma canino. Em especial, a elevação do MLR e o ELR se destacaram como marcadores mais fortemente associados aos tumores de alto grau, sugerindo que alterações nas proporções de monócitos e eosinófilos podem refletir maior agressividade tumoral. A elevação do NLR, embora de menor impacto na diferenciação dos graus histológicos, mostrou relevância significativa na predição da metástase linfonodal, indicando sua utilidade como marcador de disseminação.

Em conjunto, esses achados reforçam que parâmetros hematológicos simples, amplamente disponíveis na rotina clínica, podem fornecer informações complementares às avaliações histológicas tradicionais, contribuindo para um estadiamento mais refinado e potencialmente auxiliando no planejamento terapêutico.

REFERÊNCIAS

- Araújo CD, Sanches GS, Borek F, Rocha DC, Giustina GD, Engracia Filho JR, et al. Comparison of KIT patterns and infiltration of eosinophils in canine mast cell tumor. Arq Bras Med Vet Zootec [Internet]. 2023;75(6):1047–54. Disponível em: from: <https://doi.org/10.1590/1678-4162-12963>
- Bostock DE. The prognosis following surgical removal of mastocytomas in dogs. J Small Anim Pract. 1973;14(1):27-41. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.1973.tb06891.x>.
- Catarino, J., Pinello, K. Ribeiro JN, Santos, J, Carreira, RP, Reis, J, et al. Exploring canine mast cell tumors: An investigation into demographic characteristics, and grading system analysis from a pathology lab data (2019–2021). Preventive Veterinary Medicine, v. 236, p. 106416, mar. 2025. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39798168/>.
- Caçalante IMS, Bernardes FCL, Freire BS, Cuconati R, Munhoz J, Rapôso C. A retrospective study of canine cutaneous mast cell tumor: correlation between clinical, histological and molecular characteristics/ Um estudo retrospectivo de mastócitos cutâneos caninos: correlação entre características clínicas, histológicas e moleculares. Braz. J. Develop. [Internet]. 2020 Dec. 20 [citado 2025 Dec. 1];6(12):100281-99. Disponível em: <https://ojs.brazilianjournals.com.br/ojs/index.php/brjd/article/view/21912>.
- Chen JH, Zhai ET, Yuan YJ, Wu KM, Xu JB, Peng JJ, et al. Systemic immune-inflammation index for predicting prognosis of colorectal cancer. World Journal of Gastroenterology, v. 23, n. 34, p. 6261, 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28974892>.
- Costa VR, Soileau AM, Liu CC, Moeller CE, Carossino M, Langohr I met al. Costa VR, Soileau AM, Liu CC, Moeller CE, Carossino M, Langohr I met 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, out. 2022. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35490489/>.
- Cruz VS, Borges JCA, Nepomuceno LL, Gonçalves PAM, Prado YCL, Bianchi C, et al. Histological classification and expression of markers of canine mast cell tumors. Vet World. 2020 Aug;13(8):1627-1634. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33061237/>.
- Da Silva EZ, Jamur MC, Oliver C. Mast cell function: a new vision of an old cell. J Histochem Cytochem. 2014 Oct;62(10):698-738. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25062998/>.
- De Nardi, AB, Rodaski, S, Sousa, R.S, Costa, TA, Macedo TR, Rodigueri et al. Prevalência de neoplasias e modalidades de tratamentos em cães, atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal do Paraná. Archives of Veterinary Science, v. 7, n. 2, 31 dez. 2002. Disponível em: <https://pdf.semanticscholar.org/905b/63099067569b27a718c563a8fe18bf4e0603.pdf>.

De Nardi, AB, Horta RS, Alves CEF, De Paiva FN, Linhares LCM, Firmo BF, Sueiro FAR, *et al.* Diagnosis, prognosis and treatment of canine cutaneous and subcutaneous mast cell tumors. *Cells*, v. 11, n. 4, p. 618, 10 fev. 2022. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35203268/>.

Freytag JO, Queiroz MR, Govoni VM, Pereira IVA, Pulz LH, Strefezzi RF, *et al.* Prognostic value of immunohistochemical markers in canine cutaneous mast cell tumours: A systematic review and meta-analysis. *Vet Comp Oncol*. 2021 Sep;19(3):529-540. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33724647/>.

Garrett LD. Canine mast cell tumors: diagnosis, treatment, and prognosis. *Vet Med (Auckl)*. 2014 Aug 12;5:49-58. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32670846/>.

Halsey CHC, Thamm DH, Weishaar KM, Burton JH, Charles JB, Gustafson DL, *et al.* Expression of Phosphorylated KIT in Canine Mast Cell Tumor. *Vet Pathol*. 2017 May;54(3):387-394. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28129097/>.

Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-674. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>

Horta RS, Lavalle GE, Monteiro LN, Souza MCC, Cassali GD, Araújo RB. Assessment of Canine Mast Cell Tumor Mortality Risk Based on Clinical, Histologic, Immunohistochemical, and Molecular Features. *Vet Pathol*. 2018 Mar;55(2):212-223. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/0300985817747325>.

Kiupel M, Webster JD, Bailey KL, Best S, DeLay J, Detrisac CJ, *et al.* Proposal of a 2-tier histologic grading system for canine cutaneous mast cell tumors to more accurately predict biological behavior. *Vet Pathol*. 2011 Jan;48(1):147-55. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/0300985810386469>.

Larsen E, Watson AM, Muñoz Gutiérrez JF. Intranasal mast cell tumors: Clinical, immunohistochemical, and molecular features in 20 dogs. *Vet Pathol*. 2022 Nov;59(6):915-921. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/03009858221109100>.

Liu K, Tang S, Liu C, Ma J, Cao X, Yang X, *et al.* Systemic immune-inflammatory biomarkers (SII, NLR, PLR and LMR) linked to non-alcoholic fatty liver disease risk. *Front Immunol*. 2024 Feb 28;15:1337241. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1337241>.

Macfarlane MJ, Macfarlane LL, Scase T, Parkin T, Morris JS. Use of neutrophil to lymphocyte ratio for predicting histopathological grade of canine mast cell tumours. *Vet Rec*. 2016 Nov 12;179(19):491. Disponível em: <https://doi.org/10.1136/vr.103650>.

Maltby S, Khazaie K, McNagny KM. Mast cells in tumor growth: angiogenesis, tissue remodelling and immune-modulation. *Biochim Biophys Acta*. 2009 Aug;1796(1):19-26. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2009.02.001>

Meirelles AEWB, Oliveira EC, Rodrigues BA, Costa GR, Sonne L, Tesser ES, *et al.* Prevalência de neoplasmas cutâneos em cães da região metropolitana de Porto

Alegre, RS: 1.017 casos (2002-2007). *Pesq Vet Bras [Internet]*. 2010 Nov;30(11):968–73. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2010001100011>.

Melo IHS, Magalhães GM, Alves CEF, Calazans SG. Mastocitoma cutâneo em cães: uma breve revisão. *Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP*. 2013;11(1):38–43. Disponível em: <https://www.revistamvez-crmvsp.com.br/index.php/recmvz/article/view/5373>.

Natividade FS, Castro MB, Silva AS, Oliveira LB, De McManus CM, Galera PD. Análise de sobrevida e fatores prognósticos de cães com mastocitoma cutâneo. *Pesq Vet Bras [Internet]*. 2014 Sep;34(9):874–84. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2014000900012>.

Oliveira MR, Carneiro RA, Nunes FC, Teixeira SV, Vieira TC, Lavalle GE, et al. Hematological and biochemical alterations in female dogs with mammary cancer and inflammatory carcinoma. *Arq Bras Med Vet Zootec [Internet]*. 2022 May;74(3):428–36. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1678-4162-12471>

Rizzi M, D'Annunzio G, Tognoli C, Sarli G, Muscatello LV. The immune microenvironment in tumors: focus on canine and feline spontaneous neoplasms. *Frontiers Vet Sci*. 2025;12:1674694. Disponível em: <https://10.3389/fvets.2025.1674694>.

Scase TJ, Edwards D, Miller J, Henley W, Smith K, Blunden A, et al. Canine mast cell tumors: correlation of apoptosis and proliferation markers with prognosis. *J Vet Intern Med*. 2006 Jan-Feb;20(1):151–8. Disponível em: [https://10.1892/0891-6640\(2006\)20\[151:cmctco\]2.0.co;2](https://10.1892/0891-6640(2006)20[151:cmctco]2.0.co;2)

Stefanello D, Gariboldi EM, Boracchi P, Ferrari R, Ubiali A, De Zani et al. Weishaar's classification system for nodal metastasis in sentinel lymph nodes: Clinical outcome in 94 dogs with mast cell tumor. *J Vet Intern Med*. 2024 May-Jun;38(3):1675–1685. Disponível em: <https://10.1111/jvim.16997>.

Withrow SJ, Vail DM. *Withrow & MacEwen's Small Animal Clinical Oncology*. 4th ed. St. Louis (MO): Elsevier; 2006.

Uribe-Querol E, Romero-Romero L, Govezensky T, Rosales C. Neutrophil to lymphocyte ratio and principal component analysis offer prognostic advantage for dogs with mammary tumors. *Front Vet Sci*. 2023 Jun 16;10:1187271. Disponível em: <https://10.3389/fvets.2023.1187271>.

Webster JD, Yuzbasiyan-Gurkan V, Thamm DH, Hamilton E, Kiupel M. Evaluation of prognostic markers for canine mast cell tumors treated with vinblastine and prednisone. *BMC Vet Res*. 2008 Aug 13;4:32. Disponível em: <https://10.1186/1746-6148-4-32>.

Zmorzynski S, Kimicka-Szajwaj A, Szajwaj A, Czerwak-Marcinkowska J, Wojcierowski J. Genetic Changes in Mastocytes and Their Significance in Mast Cell Tumor Prognosis and Treatment. *Genes (Basel)*. 2024 Jan 22;15(1):137. Disponível em: <https://10.3390/genes15010137>