

ANA MARTA PEREIRA PAES ROSA MACARA

**ESTIMATIVA ESTEREOLÓGICA DO VOLUME
NUCLEAR MÉDIO PONDERADO COMO UM FATOR
PROGNÓSTICO EM MASTOCITOMAS
SUBCUTÂNEOS CANINOS**

Orientador interno: Professor Doutor Pedro Faísca

**Centro Universitário de Lisboa
Faculdade de Medicina Veterinária**

**Lisboa
2024**

ANA MARTA PEREIRA PAES ROSA MACARA

**ESTIMATIVA ESTEREOLÓGICA DO VOLUME
NUCLEAR MÉDIO PONDERADO COMO UM FATOR
PROGNÓSTICO EM MASTOCITOMAS
SUBCUTÂNEOS CANINOS**

Dissertação defendida em provas públicas na
Universidade Lusófona, Centro Universitário de
Lisboa no dia 18/01/2024, segundo o Despacho
Reitoral N° 565/2023, de dois de janeiro perante a
seguinte composição de Júri:

Presidente: Prof. Doutora Margarida Alves

Arguente: Prof. Doutora Tânia Carvalho

Orientador: Prof. Doutor Pedro Faísca

Centro Universitário de Lisboa

Faculdade de Medicina Veterinária

Lisboa

2024

Se quiseses muito uma coisa, ou ser de uma determinada maneira, a única pessoa que o pode impedir és tu.

Arthur Pendragon

Pela tua companhia todos os dias e noites deste percurso. Por seres sempre o meu ânimo e o meu abrigo. Por me fazeres crescer. Dedico a ti Izidoro o meu trabalho.

Agradecimentos

À Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias e à Professora Doutora Laurentina Pedroso, por possibilitarem a concretização deste curso.

Ao Professor Doutor Pedro Faísca por me ter ajudado e orientado durante todo o meu percurso académico e por ter acreditado em mim. Por toda a disponibilidade, paciência e sinceridade. Agradeço ainda o convite para a integração do projeto de investigação que possibilitou a elaboração desta dissertação. Um agradecimento especial a todos os professores que construíram este projeto.

Ao Professor Doutor Joaquim Henriques e ao Doutor Nuno Canhão pelo acompanhamento no meu estágio curricular.

A todos os professores e docentes que fizeram parte do meu percurso.

À minha avó que me apoiou e motivou nos momentos mais difíceis e que fez com que os desafios fossem mais fáceis de suportar.

Aos meus pais que me deram a oportunidade de concretizar o meu maior objetivo até hoje. A toda a minha família pelo apoio e incentivo.

A todos os meus amigos que me acompanharam e ajudaram a crescer. Em especial à Mariana António por todos os momentos que passámos nestes últimos anos.

Ao meu cão, Izidoro, e aos meus gatos, Pató, Café, Soy e Matisse, por me inspirarem.

Resumo

Os mastocitomas subcutâneos caninos são tumores normalmente considerados menos agressivos; no entanto, a ausência de um consenso é notória, e não há concordância para os seus factores de prognóstico, o que resulta na carência de validação sólida.

O esquema de classificação mais usados para mastocitomas subcutâneos caninos (critérios de Thompson) associa o padrão de crescimento tumoral, uma contagem mitótica superior a 4 em 10 campos de visualização microscópica e a presença de células multinucleadas como fatores preditores da evolução clínica. Porém, estes parâmetros estão sujeitos a viés e variação interobservador.

Este estudo avalia o significado prognóstico do volume nuclear médio ponderado, uma estimativa estereológica que fornece a percepção do tamanho nuclear e da sua variabilidade, em mastocitomas subcutâneos caninos.

Trinta mastocitomas subcutâneos caninos foram selecionados de acordo com a sua evolução clínica e foi estimado o seu volume nuclear médio ponderado com o método *point-sampled intercept*. Para os critérios de Thompson, não se identificou significado estatístico entre os padrões de crescimento, evolução clínica e volume nuclear médio ponderado, mesmo que o padrão infiltrativo tenha mostrado uma tendência para representar o grupo de evolução clínica negativa e maiores valores de volume nuclear médio ponderado. Ao comparar o volume nuclear médio ponderado e a evolução clínica, observou-se significado estatístico. Casos com evolução clínica negativa exibiram valores de volume nuclear médio ponderado superiores (media = 174.4) ao contrário dos casos com evolução clínica favorável (media = 105.1). Adicionalmente, determinou-se dois valores de *cut-off* 143 μm^3 e 165.8 μm^3 . Valores inferiores ao *cut-off* de 143 μm^3 , 94% dos cães estavam vivos dois anos depois do diagnóstico, enquanto valores iguais ou superior a 165.8 μm^3 , 80% dos cães faleceram.

Este estudo indica que o volume nuclear médio ponderado possui elevado reprodutibilidade e pode ser usado como um fator de prognóstico independente para a classificação dos mastocitomas subcutâneos caninos.

Palavras-chave: canino; mastocitoma subcutâneo; estereologia; volume nuclear médio ponderado; prognóstico

Abstract

Canine subcutaneous mast cell tumors are commonly perceived as less aggressive; nevertheless, there is a notable absence of consensus, and agreement on prognostic factors remains elusive, lacking robust validation.

The most widely used classification scheme for canine subcutaneous mast cell tumors (Thompson's criteria) associate pattern of growth, a mitotic count higher than 4 in 10 high power fields and the presence of multinucleated cells as predictors of negative outcome. These parameters are however prone to interobserver variability and bias.

This study assesses the prognostic significance of volume-weighted mean nuclear volume, a stereological estimation offering insights into nuclear size and its variability, in canine subcutaneous mast cell tumors.

Thirty canine subcutaneous mast cell tumors were selected with information regarding outcome and volume-weighted mean nuclear volume was estimated using the "point-sampled intercept" method. Regarding Thompson's criteria, no statistically significant differences were identified between patterns, clinical outcome, and volume-weighted mean nuclear volume, even if the infiltrative pattern showed a tendency to be more represented on the negative outcome group and with higher volume-weighted mean nuclear volume values. When comparing volume-weighted mean nuclear volume and clinical outcome a statistically significant difference emerged. Cases with a negative outcome exhibited higher volume-weighted mean nuclear volume values (average = 174.4) than cases with a favorable outcome (average = 105.1). Additionally, two cutoff values were determined, 143 μm^3 and 165.8 μm^3 . With cutoff values bellow 143 μm^3 , 94% of dogs were alive two years after diagnosis, while with cutoff values equal or higher than 165.8 μm^3 , 80% of dogs were dead.

This study indicates that volume-weighted mean nuclear volume is highly reproducible and can be used as an independent prognostic factor for classifying canine subcutaneous mast cell tumors.

Keywords: canine; subcutaneous mast cell tumour; stereology; volume-weighted mean nuclear volume; prognosis

Abreviaturas

v_v - Volume Nuclear Médio Ponderado

AIC – Critério de informação de Akaike

ANOVA – Análise de Variância

BIC – Critério de informação de Bayesian

CCC - coeficiente de correlação de concordância

ccMCTs - Mastocitomas Cutâneos Caninos

C-index - Concordance index

Cm – Centímetros

FCI - Federação Cinológica internacional

ICC - coeficiente de correlação intraclass

KIT – *Stem Cell factor Receptor*

MCT – Mastocitoma Canino

MuNI - Index de multinucleação

OC0 - Valor de evolução clínica de 0

OC1 – Valor de evolução clínica de 1

PSI – *Point-sampled interceps*

PSI - *point-sampled intercept*

r – Coeficiente de correlação de Pearson

R^2 – R-quadrado/Coeficiente de determinação

RI - raça indefinida

ROI - região de interesse

SCF – *Stem Cell Factor*

scMCTs - Mastocitomas Subcutâneos Caninos

Valor-p – Nível descritivo

WHO - Organização Mundial de Saúde

μm – micrómetro

μm^2 – micrómetro quadrado

μm^3 - micrómetro cúbico

ρ – Coeficiente de correlação de Spearman

Índice Geral

Índice de Tabelas	13
Índice de Figuras	14
A. Estágio	17
1. Instituto Gulbenkian da Ciência.....	17
2. Centro Hospitalar Veterinário Frégis	17
2.1 Atividades.....	18
3. Auchan Retail Portugal	19
B. Revisão da literatura	20
1. Introdução.....	20
2. Mastocitomas subcutâneos caninos	20
2.2. Mastócitos	20
2.3. Mastocitomas subcutâneos caninos	21
2.4. Fatores de risco e de prognóstico	22
2.4.1. Idade e raça.....	22
2.4.2. Sexo	23
2.4.3. Dimensão e localização tumoral	24
2.4.4. Estadío clínico	24
2.4.5. Margens histológicas	25
2.4.6. Critérios de malignidade celular	25
2.4.7. Esquemas de classificação histológica	26
2.4.8. Critérios histológicos de Thompson et al. (2011)	28

2.4.9.	Marcadores Moleculares.....	30
3.	Estereologia em histologia.....	32
3.1.	Conceitos da estereologia	32
3.2.	Aplicação da estereologia no prognóstico tumoral	35
3.2.1.	Seleção uniforme das partículas.....	36
3.2.2.	Medição das partículas selecionadas	36
3.2.3.	Método <i>point-sampled intercept</i>	38
4.	Objetivo	39
C.	Projeto de investigação	40
1.	Materiais e Métodos	40
1.1.	Seleção dos Casos e Evolução Clínica.....	40
1.2.	Histopatologia.....	41
1.3.	Estereologia.....	41
1.4.	Análise estatística.....	43
2.	Resultados.....	44
3.	Discussão.....	53
3.1.	Evolução clínica.....	53
3.2.	Raça.....	54
3.3.	Margens histológicas	54
3.4.	Idade	55
3.5.	Padrão de Crescimento Tumoral	55
3.6.	Número de Mitoses.....	56
3.7.	Células multinucleadas	56

3.8. Volume Nuclear Médio Ponderado	57
4. Conclusão.....	58
Bibliografia.....	59
Apêndices	I
Apêndice A1: 2023: ESVP / ECVP / ESVCP / ECVCP Joint Congress, Lisboa, Portugal.....	I
Anexos	II
Anexo A1: Sistemas de estadiamento clínico para mastocitomas cutâneos caninos.	II

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Frequência de consultas observadas segundo a especialidade médica.....	18
Tabela 2 – Frequência de endoscopias observadas em medicina interna, segundo a região anatômica observada.....	18
Tabela 3 - Classificação de trinta mastocitomas subcutâneos caninos segundo os grupos da evolução clínica, critérios de Thompson et al. (2011).....	45
Tabela 4 - Raças caninas de trinta mastocitomas subcutâneos caninos pelos grupos da evolução clínica e grupos da nomenclatura da Federação Cinológica internacional	46
Tabela 5 - Valores percentuais da sensibilidade e especificidade das classes de padrão de crescimento tumoral descritas por Thompson et al. (2011), na avaliação de trinta mastocitomas subcutâneos caninos.	48
Tabela 6 - Valores do volume nuclear médio ponderado de trinta mastocitomas subcutâneos caninos, segundo os grupos da evolução clínica e pelas idades.....	50
Tabela 7 - Desempenho dos valores de cut-off em trinta mastocitomas subcutâneos caninos.	52
Tabela A1 - Proposta de sistema de estadiamento clínico de mastocitomas cutâneos caninos desenvolvido por Owen et al., 1980	II
Tabela A2 - Proposta de sistema de estadiamento clínico de mastocitomas cutâneos caninos desenvolvido por Horta et al., 2018.....	II

Índice de Figuras

Figura 1 – Representação bidimensional (direita) de partículas pelomórficas contidas numa matriz (esquerda), a partir de uma secção transversal de orientação aleatória. Os contornos geométricos (direita) não conservam a dimensionalidade das partículas	32
Figura 2 – A: Secções transversais seriadas de uma partícula. B: Áreas de superfície representativas da zonas da partícula que foram seccionadas. Os contornos geométricos (B) não conservam a dimensionalidade do objetos tridimensional	33
Figura 3 – Ilustração da interação (evento) entre elementos e parâmetros geométricos. O produto da dimensionalidade dos elementos e dos parâmetros deve ser equivalente a três dimensões	34
Figura 4 – Método point-sampled intercepts (estimador): os elementos geométricos correspondem a linhas paralelas (ponta da seta) e pontos distribuídas nestas linhas (setas); os eventos (círculos vermelhos) são o produto da interceção dos elementos geométricos com a área de superfície das partículas (círculos pretos) num volume de referência (retângulo preto); o comprimento é medido de acordo com a régua de cálculo (escala numérica)	35
Figura 5 – Distribuição de partículas (topo) segundo o seu número ponderado (esquerda) e o seu volume ponderado (direita)	37
Figura 6 – Corte transversal da pele (a), numa orientação (vertical) perpendicular às camadas da pele (horizontal). Secção vertical aleatória e uniforme da pele num plano vertical (b). Secção vertical aleatória e uniforme da pele num plano horizontal (c)	38
Figura 7 – Região de interesse (tracejado verde) de uma secção vertical histológica de um mastocitoma subcutâneos canino (ampliação 400x), corado com hematoxilina-eosina	42

Figura 8 - Campo de amostragem de uma lâmina histológica de um mastocitoma subcutâneo canino (ampliação 800x), para a aplicação do método point-sampled intercept. Os pontos (traços vermelhos) e as linhas paralelas (linhas pretas) determinam os núcleos a medir e o seu comprimento, respetivamente. As marcações verdes (+) nos bordos nucleares (seta branca) marcam a extensão do núcleo interceptado pelas linhas paralelas.....	43
Figura 9 - Distribuição de trinta mastocitomas subcutâneos caninos pelos valores das margens histológicas laterais e dos grupos da evolução clínica. As caixas representam o primeiro quartil, segundo quartil (mediana) e o terceiro quartil. Os bigodes representam a extensão (máxima e mínima) dos resultados. Os valores das margens laterais não são diferentes estatisticamente entre os grupos da evolução clínica.	47
Figura 10 - Distribuição de trinta mastocitomas subcutâneos caninos pelos valores das margens histológicas profundas e dos grupos da evolução clínica. As caixas representam o primeiro quartil, segundo quartil (mediana) e o terceiro quartil. Os bigodes representam a extensão (máxima e mínima) dos resultados. Os valores das margens profundas não são diferentes estatisticamente entre os grupos da evolução clínica.	47
Figura 11 - Curva de sobrevivência para a mortalidade em trinta mastocitomas subcutâneos caninos, classificados segundo as classes de padrões de crescimento tumoral descritas por Thompson et al. (2011).....	48
Figura 12 - Esquerda: Conjunto dos valores do volume nuclear médio ponderado dos grupos C1-C4, em trinta mastocitomas subcutâneos caninos. Direita: Distribuição dos valores do volume nuclear médio ponderado pelos grupos C1-C4, em trinta mastocitomas subcutâneos caninos.	49
Figura 13 - Distribuição de trinta mastocitomas subcutâneos caninos pelos valores do volume nuclear médio ponderado e pela idade. Os pontos laranjas e azuis representam os animais do grupo OC0 e OC1, respetivamente.	50

Figura 14 - Distribuição de trinta mastocitomas subcutâneos caninos pelos valores do volume nuclear médio ponderado e dos grupos da evolução clínica. As caixas representam o primeiro quartil, segundo quartil (mediana) e o terceiro quartil. Os bigodes representam a extensão (máxima e mínima) dos resultados. Os valores do volume nuclear médio ponderado são diferentes estatisticamente entre os grupos da evolução clínica (teste de dos postos sinalizados de Wilcoxon) 51

Figura 15 - Curva característica de operação do recetor para o volume nuclear médio ponderado, segundo a evolução clínica de trinta mastocitomas subcutâneos caninos. Valores de $vv \geq 143 \mu\text{m}^3$ estão associados com a mortalidade, com 90% de sensibilidade e 80% de especificidade. Valores de $vv \geq 166 \mu\text{m}^3$ estão associados com a mortalidade, com 80% de sensibilidade e 90% de especificidade..... 52

Figura 16 - Curva de sobrevivência para a mortalidade em trinta mastocitomas subcutâneos caninos, classificados segundo o cut-off de $143 \mu\text{m}^3$ do volume nuclear médio ponderado. Abreviaturas: ctf2= ≤ 143 , cut-off igual ou inferior a $143 \mu\text{m}^3$; ctf2= ≥ 143 , cut-off igual ou superior a $143 \mu\text{m}^3$ 53

Figura 17 - Curva de sobrevivência para a mortalidade em trinta mastocitomas subcutâneos caninos, classificados segundo o cut-off de $165.8 \mu\text{m}^3$ do volume nuclear médio ponderado. Abreviaturas: ctf2= ≤ 165.8 , cut-off igual ou inferior a $165.8 \mu\text{m}^3$; ctf2= ≥ 165.8 , cut-off igual ou superior a $165.8 \mu\text{m}^3$ 53

A. Estágio

O estágio curricular incluiu duas áreas distintas, em clínica de pequenos animais e em controlo de qualidade e segurança alimentar, e durou 4 meses e 2 meses, respetivamente. Para o desenvolvimento do projeto de investigação, a autora realizou um estágio extracurricular no Instituto Gulbenkian da Ciência (IGC), durante 1 mês.

1. Instituto Gulbenkian da Ciência

O estágio extracurricular no IGC ocorreu no mês de Setembro de 2022, na unidade de histopatologia. Sob a orientação do Prof. Dr. Pedro Faísca, a autora realizou medições estereológicas em 30 lâminas histológicas de mastocitomas subcutâneos caninos, previamente processadas. A manipulação do programa de estereologia exigiu um período de aprendizagem, que ocorreu na primeira semana de estágio.

2. Centro Hospitalar Veterinário Frégis

O primeiro estágio curricular realizou-se de 1 de outubro de 2022 até 31 de janeiro de 2023 no *Centre Hospitalier Vétérinaire Fregis* (C.H.V. Fregis) em Paris, na área de clínica de animais de companhia (cães e gatos). O horário foi distribuído em 12 horas diárias, concordantes com a carga horária semanal obrigatória. Nos primeiros 2 meses, a autora acompanhou a área de medicina interna, onde assistiu a consultas (tabela 1) e a procedimentos de diagnóstico minimamente invasivos (tabela 2) e não invasivos (ultrassonografia, colheita de sangue, biópsia, punção aspirativa, cistocentese, etc) e desenvolveu novas metodologias de raciocínio clínico. O hospital está amplamente equipado com radiografia, ressonância magnética e tomografia computadorizada, mas, devido a restrições de biossegurança, houve somente acesso e contacto com os resultados e relatórios dos mesmos. Nos últimos 2 meses do estágio a autora foi transferida para a área de urgências e cuidados intensivos, onde realizou a maioria das suas atividades práticas. Este campo permitiu o contacto com diversos procedimentos característicos deste domínio (colheita de sangue, cateterização venosa, cateterização urinária, entubação nasogástrica, transfusão sanguínea, monitorização pós-cirúrgica, toracocentese, cistocentese, etc.) e o desenvolvimento de novas capacidades. Durante todo o período de estágio, a autora assistiu a várias apresentações teóricas e reuniões sobre tópicos específicos da área de urgências e cuidados intensivos.

2.1 Atividades

Tabela 1 – Frequência de consultas observadas segundo a especialidade médica.

Consultas médicas

<i>Nº</i>	<i>Especialidade</i>
128	Medicina interna
121	Urgências e cuidados Intensivos
15	Cardiologia
12	Ortopedia
7	Oncologia (teleconsulta)
5	Neurologia
2	Oftalmologia

Tabela 2 – Frequência de endoscopias observadas em medicina interna, segundo a região anatômica observada.

Endoscopias

<i>Nº</i>	<i>Tipo</i>
5	Broncoscopia + LBA
4	Rinoscopia
3	Gastrosocopia + biópsia
1	Rinoscopia retrógrada + hidropulsão nasal
1	Laringoscopia
1	Cistosocopia

Abreviaturas: LBA: Lavagem Bronco-Alveolar

3. Auchan Retail Portugal

O segundo período de estágio, na área controlo de qualidade e segurança alimentar a partir da sede da Retail Auchan, teve início a 3 de Abril de 2023 até 31 de maio de 2023. A autora realizou 3 visitas à plataforma de Peniche, para o melhor entendimento das suas atividades. Durante todo o período de estágio, decorreram reuniões semanais na sede ou via *online* para o acompanhamento e esclarecimento de dúvidas referentes aos objetivos do estágio. Todos os objetivos do estágio foram cumpridos, nomeadamente:

- A digitalização das fichas técnicas das atividades da fábrica e da logística do pescado, através do *Google sheets*. Esta tarefa foi a primeira a ter início e teve a duração do primeiro mês do estágio.
- A atualização do documento do plano e análise de perigos e controlo de pontos críticos (HACCP), que começou e terminou em paralelo com a tarefa anterior.
- Elaboração e descrição de fluxogramas correspondentes às atividades da receção, da fábrica e da logística de pescado, associada à tarefa anterior.
- Elaboração de um documento digital dos critérios microbiológicos do pescado e dos teores de sal e humidade do bacalhau, segundo o regulamento (CE) N.º 2073/2005 e o Decreto-Lei N.º 25/2005, respetivamente. Este objetivo foi realizado no 2º mês de estágio.
- Atualização do calendário de pesca. Este objetivo foi realizado em poucas horas, em paralelo com o anterior.

B. Revisão da literatura

1. Introdução

A histologia é considerada o método de diagnóstico de eleição para determinar a natureza de um processo neoplásico (Tseng, Matsuyama, & MacDonald-Dickinson, 2023). Esta permite identificar e classificar as células neoplásicas e em alguns tumores, através de critérios semi-quantitativos, estimar graus histológicos correlacionados com o prognóstico (Boyce, Dorph-Petersen, Lyck, & Gundersen, 2010; Haynes, 1984; Kiupel et al., 2011; Patnaik, Ehler, & MacEwen, 1984; Thompson, Pearl, et al., 2011; Tseng et al., 2023). Contudo, o valor prognóstico da histologia, devido à sua subjetividade inerente, tem limitações que afetam negativamente a precisão dos resultados. Além disso, a observação de estruturas tridimensionais num plano bidimensional não reflete a dimensionalidade das partículas (Boyce et al., 2010; Gundersen & Østerby, 1981; Howard & Reed, 2004). Esta subjetividade e baixa sensibilidade prognóstica reclamam por um método mais objetivo e preciso (Santos et al., 2014).

O estudo das partículas orgânicas em três dimensões é denominado estereologia. O conhecimento das dimensões tridimensionais das microestruturas biológicas confronta um dos maiores desafios da histologia. A estereologia é um método matemático que permite estimar o volume de partículas através de medições em planos bidimensionais (lâminas histológicas) microscópicas (Haynes, 1984; Howard & Reed, 2004). As medições estereológicas são aleatórias, uniformes e sistemáticas porque eliminam viés de seleção e avaliam amostras representativas de uma população. A sua aplicação no estudo da variabilidade morfológica celular permite extrapolar o comportamento biológico tumoral através de um método quantitativo (Boyce et al., 2010).

2. Mastocitomas subcutâneos caninos

2.2. Mastócitos

Os mastócitos são células de origem hematopoiética, descendentes da linhagem mielóide. Após a diferenciação das células progenitoras em mastócitos imaturos, estes migram da medula óssea e agrupam-se em *clusters* adjacentes a vasos sanguíneos, a vasos linfáticos, a terminações nervosas e a células do músculo liso (Abbas, Lichtman, & Pillai, 2016; Banks, 2016; Junqueira & Carneiro, 2017; Noviana, Mamba, Makimura, & Horii, 2004; Pundir & Kulka, 2010; Solimando, Desantis, & Ribatti, 2022). Isto permite o seu rápido recrutamento para as barreiras epiteliais (pele e mucosas) e para as serosas peritoneal e pleural, onde sofrem maturação devido à influência do microambiente tecidular (Abbas et al., 2016;

Junqueira & Carneiro, 2017; Madjene et al., 2014; Pundir & Kulka, 2010; Solimando et al., 2022; Young, O'Dowd, & Woodford, 2013). Fisiologicamente, a região perivascular da derme canina é o local com maior concentração de mastócitos (Gross, 2005). Nos tecidos conjuntivos apresentam-se como células redondas ou ovais, de 7 a 20 µm de diâmetro, com um núcleo oval, central e não segmentado. Possuem grânulos citoplasmáticos, dispersos no citoplasma ou adjacentes à membrana celular, com conteúdo basofílico e um diâmetro entre 0.3 a 2 µm (Gibbs & Falcone, 2014; Junqueira & Carneiro, 2017; Young et al., 2013).

2.3. Mastocitomas subcutâneos caninos

A pele é a região anatômica onde se desenvolvem o maior número de tumores em cães (Murphy, 2006). Os mastocitomas caninos (MCTs) são uma das neoplasias cutâneas mais comuns em cães (Chen, Marconato, Sabattini, & Kiupel, 2022; Rafalko et al., 2023; Thompson, Pearl, et al., 2011; Villamil et al., 2011). Os mastocitomas cutâneos caninos (ccMCTs) ocorrem com maior frequência que os subcutâneos (Tamlin, Bottema, & Peaston, 2020), o que poderá dever-se ao facto de haver consideravelmente um menor número de mastócitos no tecido subcutâneo (Gross, 2005). Estes distinguem-se segundo a camada de pele onde se originam (derme ou hipoderme), mas ambos possuem poder infiltrativo local e à distância, através do sistema linfático (Chen et al., 2022; Rissi & Oliveira, 2022; Tamlin et al., 2022).

Os mastocitomas subcutâneos caninos (scMCTs) são tumores de células redondas, esfoliativos e envolvidos pela hipoderme (Rissi & Oliveira, 2022; Stokol, n.d.). Consistem em lesões nodulares não capsuladas, compostas por células ovóides/redondas dispostas em cordões ou em toalha. Os bordos celulares são bem demarcados, o citoplasma é granular e basófilo e o núcleo é central ou excêntrico com cromatina densa. Os grânulos apresentam coloração roxa e estão dispersos no citoplasma (London & Thamm, 2020; Rissi & Oliveira, 2022; Stokol, n.d.). A matriz extracelular desta massa poderá apresentar degenerescência, hemorragia, necrose (típico dos processos neoplásicos), vasos sanguíneos, eosinófilos, linfócitos e fibroblastos reativos (Ouellette et al., 2021; Rissi & Oliveira, 2022). A progressão do processo tumoral acentua o desvio da morfologia celular em relação ao seu aspeto normal (tumores indiferenciados), por exemplo: pleomorfismo celular e anisocariose, perda da definição dos bordos celulares, ausência de granulação e núcleo de aspeto lobulado ou amebóide com cromatina fina ou impercetível (London & Thamm, 2020; Rissi & Oliveira, 2022).

Os scMCTs nem sempre foram considerados um tipo diferente de mastocitoma, mas a sua distinção com os ccMCTs deveu-se a diferenças de comportamento (Chen et al., 2022;

Gill, Leibman, Monette, Craft, & Bergman, 2020; Newman, Mrkonjich, Walker, & Rohrbach, 2007; Rissi & Oliveira, 2022; Tamlin et al., 2020). Os scMCTs estão associados a um melhor prognóstico, com uma taxa de sobrevivência um, dois e três anos após o diagnóstico de 80-95%, 72-92% e 61-86%, respectivamente (Gill et al., 2020; Marconato et al., 2023; Newman et al., 2007; Tamlin et al., 2020; Thompson, Pearl, et al., 2011; Treggiari, Valenti, Porcellato, Maresca, & Romanelli, 2023). Embora estes resultados suportem e concordem que os scMCTs são potencialmente menos agressivos, vários estudos realçam que se deve considerar a mortalidade e capacidade de recidiva local (desenvolvimento de um MCT secundário, adjacente à cicatriz cirúrgica) e metastização (regional e distante) destes tumores (Chen et al., 2022; Gill et al., 2020; Horta et al., 2018). Segundo Cherzan, Fryer, Burke, & Farrelly (2023), Marconato et al. (2023), Newman et al. (2007), Treggiari et al., (2023) e Gill et al. (2020), foram observadas taxas de recidiva entre os 7-18% e taxas de metastização entre os 2-12%. Em scMCTs com margens cirúrgicas incompletas, estes valores foram superiores, atingindo os 12-21% (Gill et al., 2020; Newman et al., 2007; Thompson, Pearl, et al., 2011). Ferrari et al. (2021), Fournier et al. (2021), Lapsley et al. (2021) e Marconato et al. (2023), observaram uma maior incidência de metastização regional (58-68%) quando realizada linfadenectomia dos linfonodos regionais/sentinela no momento da excisão dos scMCTs. Comparando com as taxas de metastização dos ccMCTs (5-22% e 55-95% em tumores moderadamente e marcadamente indiferenciados, respectivamente) (London & Thamm, 2020), observa-se uma proximidade entre os valores de ambos os tipos de MCT. Ou seja, o comportamento biológico dos mastocitomas subcutâneos é também muito variável. Por isso, devem ser avaliados vários fatores preditivos da progressão tumoral em conjunto, para identificar corretamente o prognóstico e implementar o plano terapêutico mais adequado.

2.4. Fatores de risco e de prognóstico

O comportamento biológico dos MCTs tem sido associado a vários fatores: características individuais (idade, raça, sexo, dimensão e localização neoplásica e estadió clínico), arquitetura e morfologia histopatológica (margens histológicas e critérios de malignidade, pleomorfismo nuclear, esquemas/critérios de classificação histológica) e marcadores moleculares (c-KIT, Ki-76, AgNOR) (Horta et al., 2018; Thompson, Pearl, et al., 2011).

2.4.1. Idade e raça

A idade é um fator de risco para o processo tumoral. Dado que as neoplasias são doenças genéticas, é previsível a tentativa de correlacionar a integridade do genoma com a idade e com o processo de envelhecimento. Segundo Cagan et al. (2022), a esperança de

vida e a taxa de mutações somáticas (por ano) são proporcionalmente inversas. Esta correlação apoia um dos pilares do envelhecimento (também característico das doenças neoplásicas) – a progressão da instabilidade genômica ao longo do tempo (Friedl & Alexander, 2011; Zhang et al., 2021). Em geral, os cães mais velhos são mais predispostos ao desenvolvimento tumoral, devido a uma maior acumulação de mutações (Kiupel, Webster, Miller, & Kaneene, 2005), e a tumores mais agressivos (Tamlin et al., 2022). Os MCTs ocorrem em cães com uma média de idades entre os 7.2 e 9 anos. Porém, podem ser diagnosticados em todas as faixas etárias, em idades inferiores a 1 ano e superiores a 15 anos (Brønden, Nielsen, Toft, & Kristensen, 2010; Kiupel et al., 2005; London & Thamm, 2020; Marconato et al., 2023; Martins, Carvalho, Mesquita, Gärtner, & Amorim, 2021; McNiel, Prink, & O'Brien, 2006; Miller, 1995; Mochizuki, Motsinger-Reif, Bettini, Moroff, & Breen, 2017; Monteiro, Boston, & Monteith, 2011; S. Murphy, Sparkes, Smith, Blunden, & Brearley, 2004; Patnaik et al., 1984; Peters, 1969; Pierini et al., 2019; Rafalko et al., 2023; Shoop et al., 2015; Śmiech, Lsopuszyński, Ślaska, Bulak, & Jasik, 2019; Villamil et al., 2011).

Em cães, a idade no momento do diagnóstico é afetada pela raça. O largo espectro de idades observado em MCTs poderá estar relacionado com a intensificação de certos genes, potencialmente carcinogênicos, através da seleção genética. Śmiech et al. (2019) e Miller (1995), descreveram cães da raça Shar Pei com uma idade igual ou inferior aos 2 anos e Labrador Retriever a partir dos 4 anos.

As raças caninas com maior risco de desenvolvimento de MCTs em diversos países europeus, nos Estados Unidos da América (EUA) e na Austrália, são: Boxer, Labrador Retriever, Golden Retriever, raças do tipo Bulldog, Shar pei, Terriers do tipo Bull, Cocker Spaniel, Weimaraner e Leão da Rodésia (London & Thamm, 2020; Marconato et al., 2023; Martins, Carvalho, Mesquita, Gärtner, & Amorim, 2021; Mochizuki et al., 2017; Monteiro, Boston, & Monteith, 2011; Pierini et al., 2019; Pizzoni et al., 2018; Shoop et al., 2015; Śmiech, Lsopuszyński, Ślaska, Bulak, & Jasik, 2019; Thompson et al., 2011; Treggiari, Valenti, Porcellato, Maresca, & Romanelli, 2023; Villamil et al., 2011; Warland & Dobson, 2013). Porém, na grande maioria destas populações os cães com a maior prevalência de MCT não tinham raça definida.

2.4.2. Sexo

Diversos estudos concluem que o gênero não é um fator de risco para o desenvolvimento de MCT (Bellamy & Berlato, 2021; Brønden et al., 2010; Miller, 1995; Śmiech et al., 2019).

2.4.3. Dimensão e localização tumoral

A progressão neoplásica leva à aquisição de novos mecanismos de malignidade e atribui um fenótipo mais agressivo aos tumores (Brú, Albertos, Subiza, García-Asenjo, & Brú, 2003; Conti, 2010). Segundo Ferrari et al. (2021), Hahn, King, & Carreras (2004), Hume et al. (2011), Moore, Frimberger, Taylor, & Sullivan (2020), Pierini et al. (2019) e Stefanello et al. (2015), o volume tumoral relacionou-se com o seu comportamento biológico e com o prognóstico. Estes estudos observaram que os MCTs com dimensões superiores a 3 cm demonstraram pior prognóstico, menor tempo de sobrevivência e metastização dos linfonodos regionais. Embora a dimensão neoplásica seja o fator que é diretamente avaliado, a taxa de crescimento tumoral determina o comportamento biológico tumoral (Modiano & Kim, 2020).

De igual forma, a localização tumoral está associada à evolução clínica. MCTs nas mucosas, junções mucocutâneas e nas regiões interdigital, inguinal, prepucial, escrotal e perianal apresentam um pior prognóstico (Larsen, Watson, & Muñoz Gutiérrez, 2022; Martins et al., 2021; Modiano & Kim, 2020; Sfiligoi et al., 2005; Şmiech et al., 2018; Welle, Bley, Howard, & Rüfenacht, 2008). Isto pode dever-se a limitações que estas regiões anatómicas impõem à remoção cirúrgica das massas tumorais.

Suspeita-se que a hipoderme esteja relacionada com comportamento menos agressivo dos scMCTs (Thompson, Pearl, et al., 2011). O tecido adiposo secreta adipoquinas (adiponectina e leptina), citocinas e lipoquinas que influenciam o metabolismo, atuam noutros órgãos e têm função anti/pró-inflamatória (Banks, 2016; Baroni et al., 2012; Fantuzzi, n.d.; Frigolet & Gutiérrez-Aguilar, 2020; Jennings & Premanandan, 2017; Komi, Shafaghat, Kovanen, & Meri, 2020; Lecoutre, Lambert, Drygalski, Hautefeuille, & Clément, 2022; Navarro, Villarroya, Cereijo, Giralt, & Villarroya, 2021; Radin, Sharkey, & Holycross, 2009; Ribatti, 2016; Stolarczyk, 2017). Segundo Radin et al. (2009), a diferente secreção de adipoquinas altera o microambiente tecidual. A leptina é proporcional à massa gorda corporal e induz a progressão tumoral através da angiogénese, supressão da apoptose e ação mitogénica. Por outro lado, a adiponectina produz o efeito oposto, inibindo a carcinogénese. De acordo com Thompson et al. (2011), o fenótipo dos scMCTs pode resultar da influência das adipoquinas e citocinas, presentes no tecido, no momento da maturação das células que o compõem.

2.4.4. Estadio clínico

O prognóstico implica a compreensão da progressão neoplásica e a evolução da doença existente. O estadiamento clínico quantifica e documenta a extensão deste desenvolvimento. A organização mundial de saúde (WHO) (Owen, 1980) apresentou um

sistema de classificação para o estadiamento clínico dos MCTs (tabela A1), atualizado posteriormente por Horta et al. (2018) (tabela A2). Esta última versão avalia o número de tumores e a presença de metástases regionais ou distantes, que traduz para um nível de progressão tumoral (estadio I-V). Segundo Horta et al. (2018), o estadiamento clínico e a história de recidiva tumoral em MCTs mostraram uma correlação direta com o prognóstico. Nos estudos de Kiupel et al., (2005) e Tamlin et al. (2022), o desenvolvimento de mais que um MCT foi associado a um pior prognóstico (recidiva tumoral e metastização regional). De acordo com Cherzan et al. (2023), Gill et al. (2020) e Horta et al. (2018), os scMCTs com recidiva local pós-cirúrgica apresentaram um pior prognóstico (metastização e/ou menor sobrevida). Diversos estudos mostraram que presença de metastização local (linfonodos regionais ou sentinela) e/ou distante (linfonodos abdominais, fígado, baço e medula óssea) foi preditiva da mortalidade em mastocitomas cutâneos e subcutâneos (Gill et al., 2020; Horta et al., 2018; Krick, Billings, Shofer, Watanabe, & Sorenmo, 2009; Krick et al., 2017; Marconato et al., 2008; Pizzoni et al., 2018; Tamlin et al., 2022).

2.4.5. Margens histológicas

As margens histológicas representam a região entre os limites do tecido histológico e a massa tumoral, desprovida de células tumorais. A disseminação neoplásica por todo o tecido é indicativa de margens histológicas incompletas. A literatura referente à relação entre as margens histológicas, a recidiva tumoral e o prognóstico em MCTs demonstra resultados discrepantes. Alguns estudos observaram que os MCTs com recorrência tumoral pós-cirúrgica apresentaram margens histológicas incompletas ou inferiores a 0,5 cm (Abrams, Putterman, Rupple, Wavreille, & Selmic, 2021; Garrett, 2014; Gill et al., 2020; Michels et al., 2002). De acordo com Cherzan et al. (2023), Horta et al. (2018), Michels et al. (2002), Murphy et al. (2004) e Thompson et al., (2011), as margens histológicas não apresentaram nenhuma associação com a evolução clínica nestes tumores. Segundo Abrams et al. (2021) e Haine, Pittaway, Berlato, & Demetriou (2022), a ausência de um sistema de classificação das margens histológicas validado para MCTs impede a correta comparação de resultados entre estudos, devido ao uso de diferentes critérios e à exposição de resultados não uniformes.

2.4.6. Critérios de malignidade celular

A conservação da maturação fenotípica celular concede uma boa diferenciação tumoral e está normalmente associada a um melhor prognóstico (Chen et al., 2022; Rissi & Oliveira, 2022). A atipia celular é uma característica de malignidade e resulta da progressão neoplásica e anaplásica (Modiano & Kim, 2020; Sorensen, 1996). Assim, o comportamento tumoral pode ser avaliado através de alterações na morfologia celular, tais como:

pleomorfismo celular/nuclear; anisocitose/anisocariose; variação da razão núcleo:célula; multinucleação; cariomegalia; maior número de figuras de mitose e assimétrica das mesmas. Nos MCTs, estas características são usadas como critérios histológicos de malignidade tumoral (Chen et al., 2022; London & Thamm, 2020; Modiano & Kim, 2020; Rissi & Oliveira, 2022). De acordo com Sorensen (1996), a classificação da malignidade em tumores sólidos orientava-se maioritariamente por parâmetros nucleares (densidade, polaridade, tamanho, forma, padrão da cromatina e características nucleolares). Isto deve-se à relação de proporcionalidade entre a atipia nuclear e o comportamento neoplásico (Fischer, 2020; Sorensen, 1996).

Pleomorfismo nuclear

A instabilidade genética é o resultado de várias alterações: mutações genéticas contínuas; desregulação de vias de transdução de sinal; padrões de expressão genética anormais; aneuploidia; e a inaptidão reparativa de erros no genoma (Bignold, 2003; Fischer, 2020; Nowell, 1976; Ono, 1971). Este processo afeta, em simultâneo, genes com diferentes funções, e está associado ao desenvolvimento de malignidade tumoral (Bignold, 2003; Loeb, Bielas, & Beckman, 2008; Prindle, Fox, & Loeb, 2010). A acumulação heterogénea de mutações numa neoplasia origina células com morfologia e comportamento variável (Bignold, 2002; Bignold, 2003). Assim, a conversão e progressão maligna tumoral pode ser acompanhada pela evolução da atipia celular e nuclear.

O pleomorfismo nuclear é caracterizado pela variabilidade do tamanho e da forma nuclear (Modiano & Kim, 2020). A dimensão do núcleo deriva de muitos fatores: reatividade celular; atividade mitótica, permeabilidade e espessura da membrana nuclear; densidade e distribuição da cromatina; quantidade de DNA, tamanho e forma do nucléolo, etc (Bignold, 2003; Fischer, 2020; Sorensen, 1996). A expressão anormal dos genes que regulam estes aspetos resulta, potencialmente, na alteração do volume e da forma do núcleo (Bignold, 2003; Fischer, 2020). A progressão da variação genética e, conseqüentemente, da heterogeneidade fenotípica intensifica o pleomorfismo nuclear. Assim, correlação entre a instabilidade genética e a atipia morfológica permite confirmar que o comportamento biológico tumoral pode ser avaliado pelo pleomorfismo nuclear (Fischer, 2020; Modiano & Kim, 2020; Sorensen, 1996).

2.4.7. Esquemas de classificação histológica

A morfologia celular expressa o fenótipo maligno tumoral, e por isso, é o foco dos esquemas de classificação histológica mais comuns utilizados para o diagnóstico e prognóstico dos MCTs (Kiupel et al., 2011; Mercan et al., 2022; Modiano & Kim, 2020; Patnaik

et al., 1984; Santos et al., 2014; Strefezzi, Xavier, & Catão-Dias, 2003). Estes sistemas pretendem prever o comportamento biológico dos MCTs e guiar o seu tratamento, mas apenas consideram os ccMCTs (Maiolino, Cataldi, Paciello, Restucci, & De Vico, 2005; Thompson, Pearl, et al., 2011). O esquema de classificação desenvolvido por Patnaik et al. (1984), é constituído três graus, que avalia: a invasão tumoral; a celularidade; a arquitetura celular; a morfologia celular e nuclear (tamanho e forma); a morfologia dos grânulos; o número de figuras de mitose; e o número de células multinucleadas. O sistema de classificação histológico binário (baixo e alto grau), descrito por Kiupel et al. (2011), incluiu: a contagem das figuras de mitose, das células multinucleadas e dos núcleos bizarros; e a presença de cariomegalia. Horta et al. (2018), observaram uma correlação entre estes sistemas e a evolução clínica. Contudo, segundo Horta et al. (2018) e Kiupel et al. (2011), o sistema de Patnaik et al. (1984) sozinho não mostrou uma correlação com a evolução clínica. Berlato et al. (2021), publicaram um consenso para a classificação de ccMCTs que recomenda a aplicação de ambos os sistemas de classificação, incluindo o número de mitoses observadas em 10 campos de visualização microscópica.

Os sistemas de classificação válidos para os ccMCTs têm demonstrado valor prognóstico, mas também alguma imprecisão (Horta et al., 2018; Northrup et al., 2005). Particularmente na classificação ternária de Patnaik et al. (1984), a morfologia celular não é avaliada quantitativamente em todos os parâmetros, sofrendo uma elevada variabilidade inter- e intraobservador (Gill et al., 2020; Kiupel et al., 2011; Mercan et al., 2022; Modiano & Kim, 2020; Northrup et al., 2005; Santos et al., 2014). A subjetividade desta classificação e a heterogeneidade morfológica dos MCTs leva a uma reduzida reprodutibilidade destes sistemas e a resultados discrepantes entre patologistas (Newman et al., 2007; Northrup et al., 2005; Thompson, Pearl, et al., 2011). Comparativamente, o esquema de avaliação de Kiupel et al. (2011) mostrou maior reprodutibilidade e menor subjetividade, e quando associado ao sistema de Patnaik et al. (1984) melhorou o desempenho geral dos esquemas de classificação (Horta et al., 2018; Northrup et al., 2005; Sabbatini, Scarpa, Berlato, & Bettini, 2015). Contudo, a concordância entre observadores não é 100% e ambos os métodos de classificação não consideram o estadió clínico e as características macroscópicas do tumor. Por isso, os esquemas de classificação histológica não devem ser o único fator a avaliar para o prognóstico dos MCTs (Northrup et al., 2005; Stefanello et al., 2015).

Segundo Chen et al. (2022), Gill et al. (2020) e Tamlin et al. (2020), os esquemas de Kiupel et al. (2011) e Patnaik et al. (1984) não apresentam poder prognóstico em scMCTs. No sistema ternário, os ccMCTs com invasão da hipoderme e todos os scMCTs são avaliados como tumores de grau II (intermédio) ou de grau III. Nos estudos de Horta et al. (2018) e

Kiupel et al. (2005) a profundidade tumoral não mostrou poder prognóstico para os MCTs. Além disso, o grau histológico intermédio apresenta maior variabilidade entre avaliadores, o maior número de neoplasias e tumores de comportamento variável (Gill et al., 2020; Horta et al., 2018; Kiupel et al., 2011; Northrup et al., 2005; Patnaik et al., 1984; Preziosi, Sarli, & Paltrinieri, 2007; Thompson, Pearl, et al., 2011), o que demonstra um valor prognóstico limitado (Gill et al., 2020; Kiupel et al., 2011; Maiolino et al., 2005; Moore et al., 2020; Vascellari et al., 2013). O consenso para ao diagnóstico de MCTs realizado por Willmann et al. (2021), determinou que o sistema de Kiupel et al. (2011) pode ser aplicado aos scMCTs, em conjunto com outros fatores prognósticos imunohistoquímicos. Segundo Thompson et al. (2011), alguns parâmetros deste sistema binário têm valor prognóstico para scMCTs (contagem mitótica e número de células multinucleadas).

2.4.8. Critérios histológicos de Thompson et al. (2011)

Thompson et al. (2011) avaliou a evolução clínica de 306 scMCTs segundo três parâmetros histológicos (padrão de crescimento tumoral, contagem mitótica e a presença de células multinucleadas), de forma a determinar o valor prognóstico destes critérios. Neste estudo, a morfologia celular avaliada baseia-se somente em características nucleares, compartilhando algumas variáveis morfológicas com a classificação de Kiupel et al. (2011).

Padrão de crescimento tumoral

O aspeto microscópico dos limites da lesão tumoral traduz o potencial invasivo e o padrão do crescimento neoplásico. As células não neoplásicas têm a capacidade de migrar pelos tecidos, mas estão sujeitas a diversas interações intra- e extracelulares (microambiente) que regulam o seu movimento. A acumulação de mutações atribui vantagens evolutivas às células tumorais, permitindo que estas penetrem nos tecidos descontroladamente. Considera-se que a aptidão de disseminação é proporcional ao comportamento biológico neoplásico. Além disso, a reatividade das células não neoplásicas adjacentes e da matriz extracelular envolvente, na tentativa de regular esta ação, acaba por suportar e estimular este movimento (Friedl & Alexander, 2011; Disanza et al., 2019). Segundo Sorensen, (1996), cada tipo de tumor apresenta um padrão específico de invasão nos tecidos envolventes. Este padrão de invasão tem o potencial de traduzir a agressividade do tumor.

Thompson et al. (2011) caracterizou o padrão de invasão dos scMCTs como o padrão de crescimento tumoral, e descreveu-o em circunscrito, combinado e infiltrativo. Este critério avaliou a capacidade de invasão das células neoplásicas segundo a demarcação e extensão dos limites da massa tumoral. Cherzan et al. (2023) e Thompson et al. (2011),

verificaram que os scMCTs com padrão infiltrativo apresentaram menor tempo de sobrevivência. Contudo no estudo de Thompson et al. (2011), esta associação deveu-se à influência da recidiva e metastização tumoral dos tumores com padrão infiltrativo. Nos estudos de Gill et al. (2020), Marconato et al. (2023) e Newman et al. (2007), o padrão de crescimento infiltrativo não mostrou uma relação com a evolução clínica em scMCTs. Por outro lado, Garrett, (2014), observou que o padrão de crescimento dos scMCTs foi um fator de risco para a progressão tumoral.

Contagem mitótica

A proliferação celular contínua é uma das principais características do desenvolvimento cancerígeno (Modiano & Kim, 2020). Esta pode ser avaliada através do número de figuras de mitose e tem o potencial de traduzir o comportamento tumoral. De acordo com Romansik, Reilly, Kass, Moore, & London (2007), a contagem mitótica mostrou ser um fator prognóstico válido em vários tipos de tumores em humanos e animais. Os estudos de Cherzan et al., 2023; Gill et al., 2020; Horta et al., 2018; Lelyveld et al., 2015; Marconato et al., 2023; Simoes, Schoning, & Butine, 1994; Thompson, Pearl, et al., 2011; Thompson, Yager, et al., 2011) descreveram uma correlação positiva entre presença de figuras de mitose, a evolução clínica e a recidiva em MCTs. Segundo Thompson et al. (2011), os scMCTs com uma contagem mitótica superior a quatro estavam relacionados com uma menor sobrevida. Elston, Sueiro, Cavalcanti & Metze (2009), Horta et al. (2018) e Lelyveld et al. (2015), sugerem que os MCTs com mais de duas figuras de mitoses devem ser associados a um pior prognóstico. De acordo com Hume et al. (2011) e Romansik et al. (2007), a identificação de cinco ou mais figuras de mitoses em tumores de grau III, na classificação de Patnaik et al. (1984), é indicativo de mau prognóstico. No entanto, vários estudos demonstram que a contagem mitótica possui reduzida reprodutibilidade devido a uma elevada variabilidade intra- e interobservador. Esta é causada pelo seu método de avaliação histológico, pela dificuldade inerente à identificação das figuras de mitose, pela heterogeneidade intratumoral e bidimensionalidade da amostra, que resultam numa elevada subjetividade e baixa sensibilidade (Donovan et al., 2021; Ibrahim, Lashen, Toss, Mihai, & Rakha, 2022; Winther, Arnli, Salvesen, & Torp, 2016).

Células multinucleadas

Diversos tecidos e linhas celulares induzem a sua própria fusão celular como um mecanismo fisiológico (Horsley & Pavlath, 2004; Junqueira & Carneiro, 2017; Søre, 2020). Contudo, a multinucleação é considerada uma alteração morfológica celular característica da carcinogénese (Modiano & Kim, 2020). A mesma pode resultar de erros durante as fases que

compõe a etapa final da divisão celular – a citocinese – ou no processo de segmentação do núcleo – cariocinese – e assim promover a instabilidade genômica (tetraploidia) (Lens & Medema, 2019; Normand & King, 2010). Adicionalmente, podem também ocorrer alterações na síntese de DNA durante o ciclo celular com consequente re-replicação do DNA (Lens & Medema, 2019).

A identificação de células multinucleadas é bastante comum em inúmeros tipos de tumores em humanos e animais (Ariizumi et al., 2009; Koyuncu et al., 2021; Nova-Camacho & Sangoi, 2023; Patnaik et al., 1984; Perrin & Ambrosetti, 2022; Perrino et al., 2018; Robveille & Cullen, 2022; Thompson, Pearl, et al., 2011). As células multinucleadas são avaliadas conforme o método descrito por Romansik et al. (2007) para as figuras de mitose (Thompson, Pearl, et al., 2011). De acordo com Thompson et al. (2011), os scMCTs com células multinucleadas estavam associados a uma menor sobrevida e um maior risco de metastização à distância. Contudo, vários estudos em diferentes tipos de neoplasias (incluindo scMCTs), observaram que a maioria dos tumores de alto grau (mais agressivos) não apresentavam células multinucleadas e que a sua presença não tinha valor prognóstico (Calderaro et al., 2017; Cherzan et al., 2023; Hergt, von Bomhard, Kent, & Hirschberger, 2016; Horta et al., 2018; Molony et al., 2020; Pacheco et al., 2023). Estes resultados mostraram uma incoerente correlação entre este parâmetro histológico e a sobrevivência, comprometendo o seu valor prognóstico. Além disso, as limitações associadas à contagem mitótica aplicam-se também a este critério histológico.

2.4.9. Marcadores Moleculares

Mutações c-KIT

O recetor de superfície KIT (*Stem Cell factor Receptor*), codificado pelo proto-oncogene c-KIT, tem sido associado à progressão tumoral dos MCTs (Abbas et al., 2016; Gill et al., 2020; Tamlin et al., 2020; Thompson, Yager, et al., 2011; Welle et al., 2008). Neste gene, foram identificadas mutações na região justamembranar do exão 11 (duplicação interna em tandem, deleção e substituição) e nos exões 2, 5-10, 12, 15, 17 (Chen et al., 2022; Letard et al., 2008; London, Kisseberth, Galli, Geissler, & Helfand, 1996; Ma et al., 1999; Takeuchi et al., 2013; Thamm et al., 2019; Vozdova, Kubickova, Pal, et al., 2020). As mutações ativantes resultam na iniciação do recetor KIT na ausência do seu ligando (SCF, *Stem Cell Factor*), com consequente proliferação descontrolada e sobrevivência celular, mas também na expressão atípica do KIT. O estudo deste marcador inclui a identificação do padrão de expressão do recetor ou das mutações no gene c-KIT (Gill et al., 2020; Tamlin et al., 2022; Thompson et al.,

2016; Thompson, Yager, et al., 2011). No entanto, apenas 15-40% dos animais com MTC apresentam mutações neste gene específico (Welle et al., 2008). Em ccMCTs, as mutações no gene c-KIT e os padrão de expressão KIT estão associados a um pior prognóstico e a outros fatores de prognóstico negativos (reocorrência tumoral, grau III/elevado na classificação histológica, contagem mitótica positiva e Ki67 elevado) (Horta et al., 2018; Kiupel, Webster, Kaneene, Miller, & Yuzbasiyan-Gurkan, 2004; Krick et al., 2017; Tamlin et al., 2022; Thamm et al., 2019; Webster, Yuzbasiyan-Gurkan, Miller, Kaneene, & Kiupel, 2007; Welle et al., 2008). Em scMCTs, as mutações deste gene são igualmente associadas a um comportamento mais agressivo e contagem mitótica positiva (Chen et al., 2022; Thompson et al., 2016; Vozdova, Kubickova, Fictum, et al., 2020). O consenso de Willmann et al. (2021), recomendou a inclusão da pesquisa de mutações (exões 8,9 e 11) no gene c-KIT para o diagnóstico de MCTs.

Ki67

A proliferação neoplásica pode ser avaliada através da marcação de moléculas envolvidas no processo de divisão celular. O Ki-67 é uma proteína expressa no córtex nucleolar, durante a replicação celular (Yang et al., 2018). A marcação imunohistoquímica do Ki-67 traduz a fração das células em crescimento num tecido. Valores elevados deste marcador têm sido prognóstico de comportamento maligno e agressivo, em ccMCTs (Freytag et al., 2021; Horta et al., 2018; Krick et al., 2017; Thompson, Pearl, et al., 2011; Vascellari et al., 2013; Webster et al., 2007) e em scMCTs (Marconato et al., 2023; Thompson, Yager, et al., 2011; Treggiari et al., 2023).

AgNOR

As regiões organizadoras nucleolares argirofílicas (AgNOR) são proteínas presentes no nucléolo durante a proliferação celular. A sua expressão é proporcional à atividade mitótica, e em tumores são usadas como um marcador de proliferação celular (Bukhari et al., 2007). Em ccMCTs e scMCTs, as AgNOR têm mostrado valor prognóstico devido a correlações com o grau histológico e com a recidiva/metastização tumoral, respetivamente (Gill et al., 2020; London & Thamm, 2020; Thompson, Yager, et al., 2011). Contudo, a informação acerca deste marcador em scMCTs é limitada e, por isso, estes resultados devem ser confirmados por outros estudos.

3. Estereologia em histologia

3.1. Conceitos da estereologia

Em 1961, Hans Elias fundou a sociedade internacional de estereologia após publicar o seu primeiro trabalho neste tópico, dez anos antes. Os seus estudos basearam-se na premissa de que as medidas diretas bidimensionais de uma partícula podem, através de métodos matemáticos e estatísticos, estimar as suas dimensões tridimensionais (Boyce et al., 2010; Hildebrandt, 2012).

O corte transversal seriado de uma matriz com partículas/estruturas em dispersão expõe diferentes padrões da sua composição (figura 1). A configuração de cada secção expressa frações destas partículas/estruturas, mas não conserva a sua dimensionalidade ou o seu número. Isto significa que, numa perspetiva bidimensional, os contornos geométricos podem traduzir uma falsa representação das verdadeiras dimensões (tridimensionais) das partículas/estruturas (figura 2) (Boyce et al., 2010; Gundersen & Jensen, 1983; Howard & Reed, 2004).

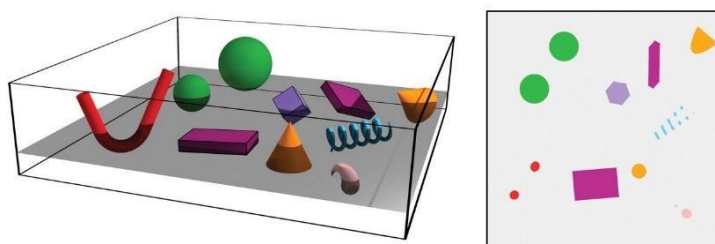


Figura 1 – Representação bidimensional (direita) de partículas pelomórficas contidas numa matriz (esquerda), a partir de uma secção transversal de orientação aleatória. Os contornos geométricos (direita) não conservam a dimensionalidade das partículas (adaptado de Boyce et al., 2010).

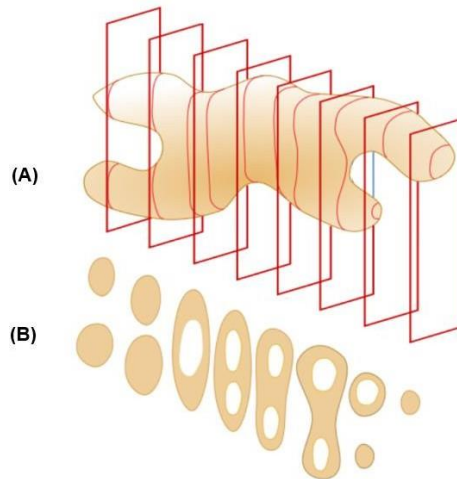


Figura 2 – A: Secções transversais seriadas de uma partícula. B: Áreas de superfície representativas das zonas da partícula que foram seccionadas. Os contornos geométricos (B) não conservam a dimensionalidade dos objetos tridimensionais (adaptado e modificado de Megías, Molist & Pombal, 2019).

A metodologia do estudo estereológico não projeta as possíveis características dos parâmetros geométricos que vai quantificar, por isso, é considerada *design-based* (Gundersen & Østerby, 1981; Howard & Reed, 2004). A estereologia estima parâmetros geométricos (número, comprimento, altura, área de superfície, volume) de objetos tridimensionais (partículas ou regiões de tecidos) através de elementos geométricos (pontos, linhas, planos ou volumes) (figura 3). Estes elementos são aplicados em secções bidimensionais e são específicos de cada parâmetro geométrico, de acordo com a dimensionalidade de ambos (Howard & Reed, 2004).

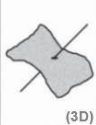
Elementos Geométricos	 (0D)	 (1D)	 (2D)	 (3D)
Parâmetros Geométricos	 (3D)	 (2D)	 (1D)	 (0D)
Eventos Contáveis	 (3D)	 (3D)	 (3D)	 (3D)

Figura 3 – Ilustração da interação (evento) entre elementos e parâmetros geométricos. O produto da dimensionalidade dos elementos e dos parâmetros deve ser equivalente a três dimensões (adaptado e modificado de Howard & Reed, 2004).

A estereologia *design-based* usa regras matemáticas (estimador) para calcular uma estimativa pretendida (parâmetros geométricos) (Howard & Reed, 2004). A sobreposição de elementos geométricos numa área de superfície resulta na interceção dos limites das formas geométricas existentes (figura 4). Cada interceção é definida por evento (figura 3 e figura 4) e determina quais são as partículas que irão ser medidas. Esta interação ocorre num volume de referência, que considera a amplificação microscópica dos tecidos (Gundersen & Jensen, 1983; Gundersen & ØSterby, 1981; Howard & Reed, 2004). A distância entre os eventos permite a reconstrução das dimensões das partículas e a extrapolação das suas medidas. O estimador usa as medições obtidas para estimar as dimensões das partículas/estruturas (Gundersen & Jensen, 1983; Gundersen & ØSterby, 1981; Howard & Reed, 2004; Leze, Maciel-Osorio & Mandarim-de-Lacerda, 2014).

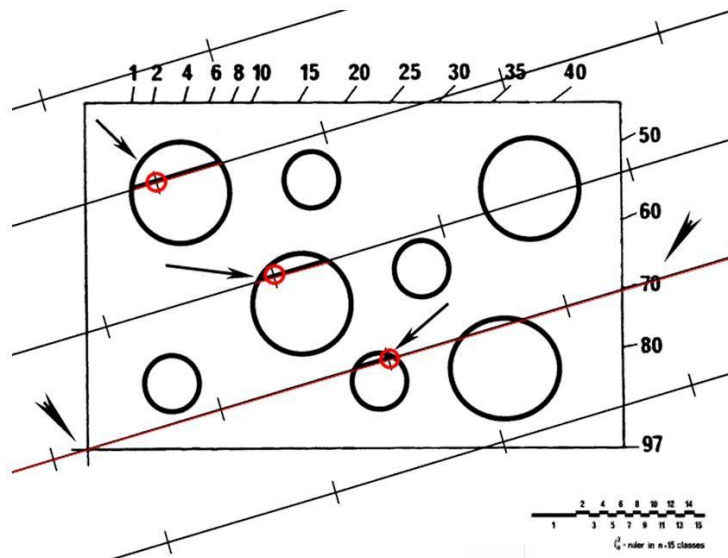


Figura 4 – Método *point-sampled intercept* (estimador): os elementos geométricos correspondem a linhas paralelas (ponta da seta) e pontos distribuídas nestas linhas (setas); os eventos (círculos vermelhos) são o produto da interseção dos elementos geométricos com a área de superfície das partículas (círculos pretos) num volume de referência (retângulo preto); o comprimento é medido de acordo com a régua de cálculo (escala numérica) (adaptado e modificado de Leze et al., 2014).

3.2. Aplicação da estereologia no prognóstico tumoral

As medições estereológicas têm acompanhado o estudo da arquitetura de diversos tecidos (pulmonar, mamário, renal, placentário, etc.) e o diagnóstico e o prognóstico de vários tipos de tumor em humanos e animais (Knudsen, Brandenberger, & Ochs, 2021; Ladekarl, 1998; Lemley, 2021; Veras, Costa, & Mayhew, 2014).

As lâminas histológicas (plano bidimensional) de uma neoplasia integram os contornos geométricos, ou a área de superfície, dos núcleos (partículas) das suas células. O pleomorfismo nuclear pode ser interpretado como a variação do volume nuclear. A medições estereológicas permitem estimar a distribuição do volume destes núcleos e, assim, quantificar objetivamente um fator com poder prognóstico – o pleomorfismo nuclear. Esta técnica é aplicada para a avaliação do volume nuclear tumoral desde 1986, em diversos tipos de neoplasias (carcinoma das células escamosas, carcinoma mamário, carcinoma urotelial, melanoma, carcinoma prostático, carcinoma pulmonar e mastoictoma cutâneo) (Arima, Sugimura, Hioki, Yamashita, & Kawamura, 1997; Aru & Nielsen, 1989; Binder, Dolezal, Wolff, & Pehamberger, 1992; Casanova, Branco, Veiga, Barros, & Faísca, 2021; Gundersen &

ØSterby, 1981; Leze et al., 2014; Santos et al., 2014; Flemming Brandt Sørensen, Bichel, & Jakobsen, 1992; Flemming Brandt Sørensen & Ottosen, 1991).

A validade da inferência quantitativa do volume exige que não haja viés de amostragem. O viés de um resultado numérico é apenas identificado pelo método de seleção da amostra. Por isso, a estereologia compreende dois princípios para estimar o tamanho geométrico das partículas: seleção uniforme e medição das partículas (Boyce et al., 2010; Howard & Reed, 2004). O estimador do volume nuclear combina dois elementos geométricos para respeitar estes princípios (Gundersen et al., 1988; Gundersen & Jensen, 1983; Gundersen & ØSterby, 1981; Howard & Reed, 2004).

3.2.1. Seleção uniforme das partículas

Todas as partículas de uma amostra devem ter igual probabilidade de serem selecionadas – amostragem sistemática e uniforme (Gundersen & Jensen, 1983; Gundersen & ØSterby, 1981; Howard & Reed, 2004). Este critério permite que a escolha das partículas seja uniforme e aleatória, e resulte numa amostra heterogênea e representativa da população. Contudo, é necessário ter em consideração que o tamanho geométrico das partículas não é igual. Como a estereologia tem por base medições diretas, as dimensões das partículas interferem com a probabilidade de seleção. Ou seja, a probabilidade de seleção é proporcional ao tamanho das partículas. Assim, para estimar um parâmetro geométrico é necessário ponderar a variação (distribuição) do tamanho das partículas quantificadas (Gundersen et al., 1988; Gundersen & Jensen, 1983; Gundersen & Jensen, 1985; Howard & Reed, 2004).

3.2.2. Medição das partículas selecionadas

As secções que produzem o perfil bidimensional de uma partícula não expressam a sua forma e o seu tamanho. O contorno geométrico presente numa secção aleatória é somente uma porção da dimensão total da partícula (figura 2). A medição direta da fração de uma partícula é uma estimativa do seu tamanho real. Esta aproximação é definida como uma estimativa média (Allik, Toom, Raidvee, Averin, & Kreegipuu, 2013; Gundersen & Jensen, 1983; Gundersen & Jensen, 1985).

A distribuição do tamanho das partículas pode ser avaliada pela distribuição em número ou pela distribuição em medida (altura, área e volume) (Gundersen, 1986).

Volume nuclear médio ponderado

A estimativa do volume em partículas pode ser avaliada pela distribuição segundo o seu número (número ponderado) ou o seu volume (volume ponderado) (Gundersen, 1986; Gundersen & Jensen, 1983; Howard & Reed, 2004). Segundo a distribuição em número de partículas num volume específico, as partículas de menores dimensões vão ter maior influência nos resultados (figura 5). No mesmo volume, na distribuição em volume, as partículas de maiores dimensões vão ter maior domínio. Uma vez que o pleomorfismo nuclear resulta da variação do volume nuclear, a estimativa do volume nuclear ponderado é a quantificação mais adequada para esta análise (Gundersen & Jensen, 1983; Howard & Reed, 2004).

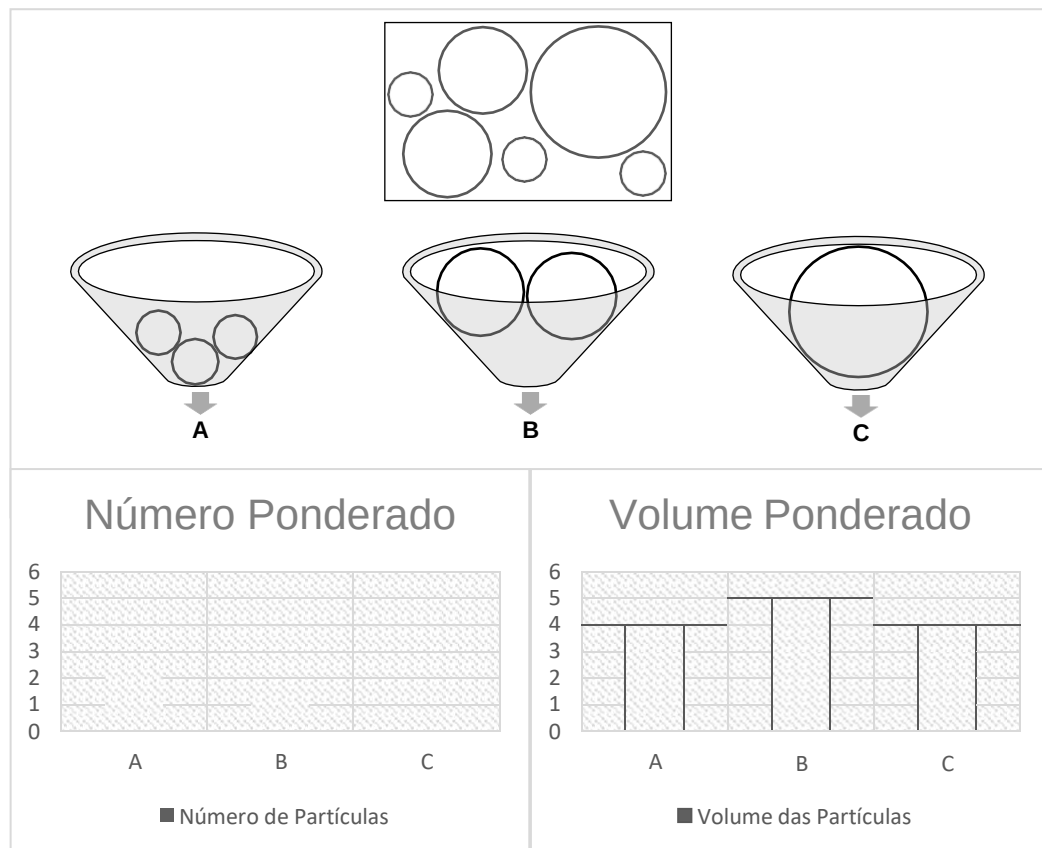


Figura 5 – Distribuição de partículas (topo) segundo o seu número ponderado (esquerda) e o seu volume ponderado (direita) (adaptado e modificado de Howard & Reed, 2004).

A distribuição do volume nuclear numa lâmina histológica concede o volume nuclear ponderado (v_v). As frações nucleares medidas resultam na estimativa do volume nuclear

médio ($\bar{v}$). A associação destes dois princípios nas medições estereológicas equivale à estimativa do volume nuclear médio ponderado ($\bar{v}_v$).

3.2.3. Método *point-sampled intercept*

O método *point-sampled intercept* (PSI) é um estimador do volume nuclear médio ponderado ($\bar{v}_v$) (Gundersen, 1986; Gundersen & Jensen, 1983; Gundersen & Jensen, 1985; Howard & Reed, 2004). Este requer que o processo da estimativa do volume seja uniforme, independentemente da orientação das partículas (isotropia).

As lâminas histológicas dos tumores cutâneos são cortes verticais (VUR, secção vertical aleatória e uniforme), em relação às camadas da pele (horizontais) (figura 6) (Gundersen, 1986; Howard & Reed, 2004). Os elementos geométricos são dispostos paralelamente às secções VUR, mantendo a orientação isotrópica. A rotação dos elementos nesta mesma orientação permite a quantificação aleatória das amostras e a eliminação de viés de seleção (Gundersen & Jensen, 1983; Howard & Reed, 2004).

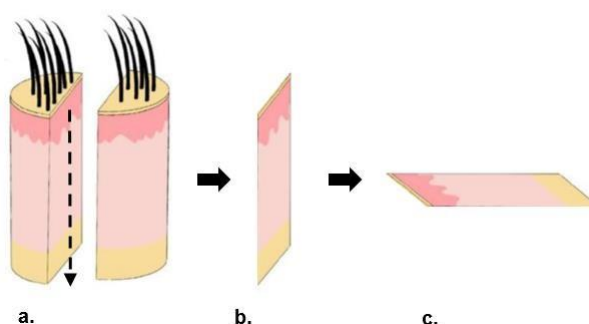


Figura 6 – Corte transversal da pele (a), numa orientação (vertical) perpendicular às camadas da pele (horizontal). Secção vertical aleatória e uniforme da pele num plano vertical (b). Secção vertical aleatória e uniforme da pele num plano horizontal (c) (adaptado e modificado de Moraleda, Martin, & Drad, 2023).

O método PSI conjuga dois elementos geométricos: pontos igualmente distribuídos por linhas paralelas (figura 4) (Gundersen et al., 1988; Gundersen & Jensen, 1983; Howard & Reed, 2004). Os pontos que sobrepõem as partículas de interesse, selecionam as amostras (contorno geométrico de uma partícula) a medir. As linhas que intercetam os contornos geométricos destas amostras, determinam a direção das medições. O segmento da linha intercetado pela amostra é marcado, e o seu comprimento o equivale a uma medição direta numa partícula (Gundersen et al., 1988). O cubo desta medição representa o volume da partícula selecionada.

4. Objetivo

Este estudo teve como objetivo validar a estereologia como uma ferramenta de análise em histologia, através da estimativa do volume nuclear médio ponderado em scMCTs. Adicionalmente, estudou-se a relação entre os critérios de classificação histológica de Thompson e a evolução clínica dos scMCTs. Esta avaliação pretendeu quantificar o pleomorfismo nuclear e desenvolver critérios estereológicos específicos para este tipo de tumor. Além disso, comparou-se o desempenho das medições estereológicas, critérios estereológicos e critérios histológicos para determinar o seu valor prognóstico.

C. Projeto de investigação

1. Materiais e Métodos

1.1. Seleção dos Casos e Evolução Clínica

A base de dados integrou 103 cães com scMCT, diagnosticados por histopatologia a partir de 2019, no laboratório DNATech (Lisboa, Portugal). Entre 2021 e 2022, recolheu-se o historial clínico através de elementos dos dados presentes nos relatórios histopatológicos e através de entrevistas telefónicas efetuadas para as clínicas e hospitais veterinários dos respetivos animais. O questionário incluiu: idade, raça, sexo, data e motivo do acompanhamento clínico mais recente, terapêutica aplicada para além da cirurgia, data e método de diagnóstico de recidiva e/ou metastização, data e método de diagnóstico do desenvolvimento de novos tumores noutras localizações, data e contexto da morte. O estado reprodutivo não foi avaliado.

Os critérios de inclusão compreenderam: um período mínimo de acompanhamento de 2 anos, após o diagnóstico histopatológico, ou a data da morte; a carência de terapêutica oncológica adjuvante à cirurgia em cães sobreviventes; o óbito motivado pelo scMCT. As complicações e sinais clínicos aceites como a causa da morte envolveram: recidiva tumoral, metastização local ou à distância e sinais clínicos gastrointestinais graves (anorexia, náusea, vômito, diarreia e dor abdominal). O intervalo de sobrevivência considerado foi de 2 anos após diagnóstico de scMCT. A data de emissão dos relatórios histopatológicos foi considerada como a data de excisão cirúrgica dos tumores.

No estudo da sobrevivência, os animais selecionados foram agrupados de acordo com a evolução clínica: evolução clínica de 0 (OC0 ou vivo) e de 1 (OC1 ou falecido). Segundo a nomenclatura da Federação Cinológica internacional (FCI), dividiu-se as raças caninas em 10 grupos: 1, Cães pastores e boiadeiros (exceto boiadeiros suíços); 2, Cães do tipo Pinscher e Schnauzer, Molossianos, *Mountain Dogs* e Boiadeiros Suíços; 3, Terriers; 4, Dachshunds; 5, Cães primitivos e do tipo Spitz; 6, Scenthounds, Bloodhounds e raças relacionadas; 7, Cães “ponteiro”; 8, Cães de Caça, Caçadores e Selvagens, e Cães de Água; 9, Cães de lazer e companhia; e 10, Galgos (Fédération Cynologique Internationale, n.d.). Os animais de raça cruzada ou indefinida foram incluídos no grupo raça indefinida (RI).

1.2. Histopatologia

As lâminas histopatológicas dos scMCTs, corados com hematoxilina-eosina e/ou giemsa, foram avaliadas por dois patologistas residentes do DNATech.

Os tumores foram caracterizados segundo os critérios histológicos reunidos por Thompson et al. (2011), que incluem o padrão de crescimento do tumor, o número de mitoses e o número de células multinucleadas. O padrão de crescimento foi descrito como: circunscrito, grupo de células neoplásicas dentro de limites bem definidos; combinado, diversos nódulos focais de células tumorais rodeados por poucas células individuais do mesmo tipo neoplásicas e limites moderadamente demarcados; infiltrativo, distribuição difusa de células neoplásicas no tecido, sem limites definidos. Considerou-se o número de células multinucleadas como positivo (mais do que um núcleo dentro de uma célula) ou negativo (um núcleo por célula). O número de mitoses foi avaliado na área de maior atividade mitótica em 10 campos de microscopia ótica (x400 de ampliação), com o valor de *cut-off* de 4 mitoses (Romansik et al., 2007).

As margens histológicas laterais e profundas foram medidas em centímetros (cm), desde a extremidade do tecido até à célula neoplásica mais próxima.

1.3. Estereologia

As lâminas histológicas foram digitalizadas pelo NanoZoomer-SQ, (Hamamatsu Photonics) e carregadas no módulo newCAST da Visiopharm (40x de resolução e 800x de ampliação). A região de interesse (ROI), representativa da área do tumor, foi limitada manualmente (figura 7). O número de campos de amostragem foi definido consoante a celularidade do tumor e a resolução da imagem, de forma a permitir a medição de cerca de setenta e cinco núcleos (50 a 100 núcleos), para assegurar a validade da estimativa estereológica (Gundersen & Jensen, 1985). Estes foram posteriormente selecionados pelo programa aleatoriamente e com um perímetro de 10300.84 micrómetros quadrados (μm^2). Cada campo de amostragem figurou linhas paralelas entre si, com um comprimento conhecido, e pontos (método PSI). A orientação das linhas paralelas isotrópicas é modificada aleatoriamente pelo programa em cada campo, para randomizar a orientação e direção das medições. Mediram-se apenas os núcleos sobrepostos por pontos dispostos ao longo destas linhas paralelas (figura 8). O comprimento destes núcleos foi medido em micrómetros (μm), segundo a extensão das linhas paralelas (l_0) que os intercetaram. Os limites nucleares, atravessados por estas linhas, foram assinalados com dois pontos de referência (+) (Figura 1). O conjunto das medições nucleares foi introduzido na fórmula

$$\bar{v}_v = \frac{\pi}{3n} + \sum_{i=1}^n l_{0,i}^3$$

Na qual, $\bar{v}_v$ representa o volume nuclear médio ponderado de todos os núcleos medidos. O comprimento de cada interseção (l_0) é elevado à potência 3 (l_0^3), que converte as medições para micrómetros cúbicos (μm^3), e o n é o número de interseções medidas (Howard & Reed, 2004). Este processo foi repetido por 2 observadores diferentes. Realizaram-se quatro medições do $\bar{v}_v$ em cada scMCT e a média dos quatro ensaios representa o valor final do $\bar{v}_v$ de cada tumor.

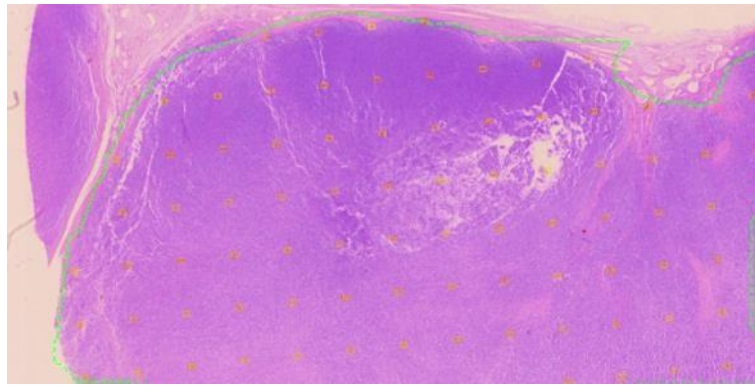


Figura 7 – Região de interesse (tracejado verde) de uma secção vertical histológica de um mastocitoma subcutâneo canino (ampliação 400x), corado com hematoxilina-eosina.

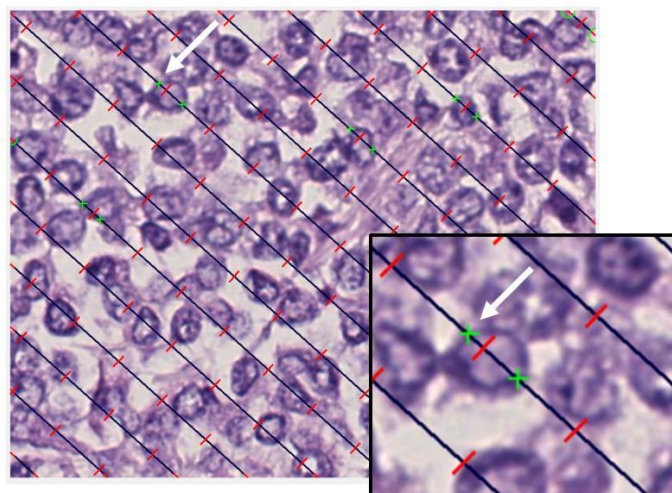


Figura 8 - Campo de amostragem de uma lâmina histológica de um mastocitoma subcutâneo canino (ampliação 800x), para a aplicação do método *point-sampled intercept*. Os pontos (traços vermelhos) e as linhas paralelas (linhas pretas) determinam os núcleos a medir e o seu comprimento, respetivamente. As marcações verdes (+) nos bordos nucleares (seta branca) marcam a extensão do núcleo interceptado pelas linhas paralelas.

1.4. Análise estatística

O tratamento estatístico foi realizado com recurso a Excel e ao programa estatístico R com os pacotes *DescTools* (versão 0.99.37), *irr* (versão 0.81.4), *ggplot2* (versão 3.2.1) e *pROC* (versão 1.14.0).

Avaliou-se a normalidade das variáveis quantitativas ($\bar{v}_v$) com os testes de Shapiro-Wilk, Skewness e Kurtosis e, posteriormente, selecionou-se os testes paramétricos e não paramétricos adequados. Para as variáveis qualitativas (idade, sexo, evolução clínica), consoante o número de categorias, usaram-se o teste qui-quadrado, o teste de Fisher e o teste de Análise de Variância (ANOVA).

Os valores do v_v foram reunidos em grupos (C1-C4) correspondentes às quatro medições de v_v de cada scMCT, respeitando a sua decorrência cronológica. Cada grupo possui trinta valores de $\bar{v}_v$. As medições foram realizadas por dois observadores (C1-C2, C3-4), que calcularam o v_v duas vezes em todos os tumores. A diferença e a concordância entre as medições dos grupos foram avaliadas com: o teste não paramétrico de Friedman, o coeficiente de correlação intraclass (ICC) e o coeficiente de correlação de concordância (CCC). As diferenças na evolução clínica e nos valores de $\bar{v}_v$, entre as variáveis, foram

determinadas através do teste não paramétrico dos postos sinalizados de Wilcoxon e das regressões linear e logística.

A capacidade discriminatória do v_v em diferenciar a evolução clínica foi avaliada com uma curva característica de operação do recetor (ROC) (avaliou a sensibilidade e a especificidade do v_v para orientar corretamente a evolução clínica e determinou um valor de *cut-off*) e uma análise multivariável em regressão logística com o v_v e as variáveis de confundimento idade e sexo (indicou o impacto destas variáveis nas medições). O valor de *cut-off* e os padrões de crescimento tumoral foram usados na análise de sobrevivência, através da regressão de Cox's Proportional Hazard (Cox PH), para comparar a sobrevivência dos grupos. Com recurso aos critérios de informação Akaike (AIC) e Bayesian (BIC), aos coeficientes de determinação (Cox & Snell's R^2 , Nagelkerke's R^2 , Tjur's R^2 , McFadden's R^2 e McFadden's R^2 Ajustado) e ao Concordance index (C-index), conferiu-se aptidão estimativa das regressões.

Para estas técnicas estatísticas, o nível descritivo (valor-p) é estatisticamente significativo quando é menor que 5% (0.05). A medida estatística do coeficiente de determinação (R^2) varia entre 0 e 1 (valores superiores traduzem uma maior proximidade à regressão delineada). O ICC e o CCC variam entre 0 e 1 (valores superiores traduzem uma maior fiabilidade). Os coeficientes de correlação de Pearson (r) e Spearman (ρ) encontram-se entre -1 e 1 (valores superiores traduzem uma maior correlação).

2. Resultados

Trinta cães diagnosticados com scMCT foram avaliados segundo os critérios de Thompson et al. (2011) (tabela 3). Os dados foram recolhidos de 25 clínicas e hospitais veterinários em Portugal.

Tabela 3 - Classificação de trinta mastocitomas subcutâneos caninos segundo os grupos da evolução clínica, critérios de Thompson et al. (2011).

Evolução Clínica	Critérios de Thompson et al. (2011)							
	Padrão de Crescimento Tumoral			Células Multinucleadas		Contagem Mitótica		
	Circunscrito	Combinado	Infiltrativo	Ausente	Presente	0	0>CM<4	>4
OC0	8	6	6	19	1	19	1	0
OC1	1	1	8	8	2	6	1	3

Abreviaturas: OC0, Evolução clínica de 0 ou vivo; OC1, Evolução clínica de 1 ou falecido; CM, Contagem mitótica.

O período do acompanhamento pós-cirúrgico variou entre 60 a 730 dias. O total das fêmeas (n=13) e dos machos (n=17) representaram 11 raças diferentes, incluindo: cães de raça indeterminada (n=11), Labrador Retrievers (n=6), Bulldog Francês (n=2), Boiadeiro de Berna (n=2), Shar Pei (n=2), Boxer (n=1), Bull Terrier (n=1), Chihuahua (n=1), Doberman Pinscher (n=1), Pastor Alemão (n=1), Cão da Serra de Aires (n=1) e Caniche (n=1). O número de machos que sobreviveram (n=11) e morreram (n=6) é proporcional ao número de fêmeas nas mesmas circunstâncias (n=9 e n=4, respetivamente). Observou-se um desequilíbrio na distribuição de scMCTs pelos grupos de raças, uma vez que os grupos de raças G4-G7 e G10 não foram representados pela amostra (tabela 4). A idade dos cães selecionados variou entre os 2 e os 20 anos, sendo a média das idades 8.6+3.5 anos e a mediana 9 anos.

Tabela 4 - Raças caninas de trinta mastocitomas subcutâneos caninos pelos grupos da evolução clínica e grupos da nomenclatura da Federação Cinológica internacional (Fédération Cynologique Internationale, n.d.).

Grupo de Raças	OC0	OC1
G1	Pastor Alemão, Serra de Aires	-
G2	Boiadeiro de Berna, Boxer, Bulldog Francês, Doberman, Shar Pei	-
G3	Bull Terrier	-
G8	Labrador Retriever (2)	Labrador Retriever (4)
G9	Chihuahua	Caniche
-	RI (6)	RI (5)

Abreviaturas: OC0, Evolução clínica de 0 ou vivo; OC1, Evolução clínica de 1 ou falecido.

O grupo OC0 incluiu vinte canídeos, entre os 2 e os 12 anos. Nenhum desenvolveu sinais de recidiva tumoral ou metastização, mas 1 cão desenvolveu melanoma nasal infiltrativo. Não existem dados sobre o estadiamento oncológico em 6 destes animais. O grupo OC1 integrou dez cães (n=6 eutanasiados), entre os 8 e os 20 anos. Neste conjunto, oito animais (27%) apresentaram progressão tumoral: recidiva local (n=4); metastização regional (n=4), após o diagnóstico; metastização regional (n=3), aquando do diagnóstico; e metastização visceral (n=2). A informação médica relacionada com o estadiamento oncológico de oito animais não foi disponibilizada ou o mesmo não foi realizado. Nenhum cão desenvolveu scMCTs a uma distância superior a 10 cm (considerados *de novo*). Aquando da ausência da confirmação citológica ou histológica, a evidência de recidiva local ou metastização (local ou distante) verificou-se pelo crescimento de nódulos cutâneos, aumento dos linfonodos superficiais ou pela presença de alterações ultrassonográficas abdominais (fígado, baço e linfonodos).

A idade foi a única variável que apresentou diferenças significativas entre os grupos OC0 e OC1. As raças caninas, o número de células multinucleadas e o número de mitoses não foram incluídos no estudo estatístico devido à sub-representação dos seus valores. A distribuição das margens histológicas laterais e profundas foi homogénea entre grupos da evolução clínica e não teve diferenças estatísticas (figura 9 e figura 10).

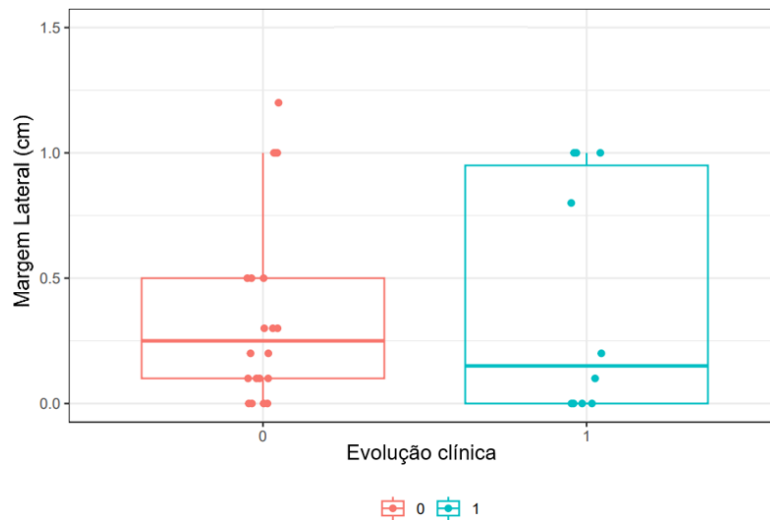


Figura 9 - Distribuição de trinta mastocitomas subcutâneos caninos pelos valores das margens histológicas laterais e dos grupos da evolução clínica. As caixas representam o primeiro quartil, segundo quartil (mediana) e o terceiro quartil. Os bigodes representam a extensão (máxima e mínima) dos resultados. Os valores das margens laterais não são diferentes estatisticamente entre os grupos da evolução clínica.

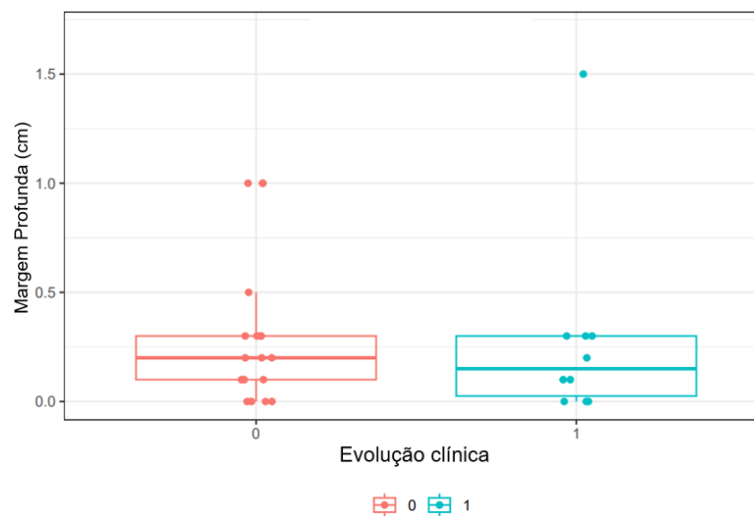


Figura 10 - Distribuição de trinta mastocitomas subcutâneos caninos pelos valores das margens histológicas profundas e dos grupos da evolução clínica. As caixas representam o primeiro quartil, segundo quartil (mediana) e o terceiro quartil. Os bigodes representam a extensão (máxima e mínima) dos resultados. Os valores das margens profundas não são diferentes estatisticamente entre os grupos da evolução clínica.

O padrão de crescimento tumoral ficou próximo do significado estatístico. Particularmente, o padrão infiltrativo apresentou uma sensibilidade consideravelmente superior aos restantes padrões, que demonstra algum potencial de predição da mortalidade. Contudo, os valores de especificidade foram semelhantes entre todos os padrões de crescimento tumoral (tabela 5). Segundo a figura 11, a probabilidade de sobrevivência, 9 meses após o diagnóstico de scMCT, foi de 50% em tumores com padrão infiltrativo e de 100% com padrão circunscrito. Embora a maior diferença estatística fosse nestes padrões, o padrão infiltrativo não foi significativo na análise multivariável.

Tabela 5 - Valores percentuais da sensibilidade e especificidade das classes de padrão de crescimento tumoral descritas por Thompson et al. (2011), na avaliação de trinta mastocitomas subcutâneos caninos.

Padrão de Crescimento Tumoral	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)
<i>Circunscrito</i>	10	60
<i>Combinado</i>	10	70
<i>Infiltrativo</i>	80	70

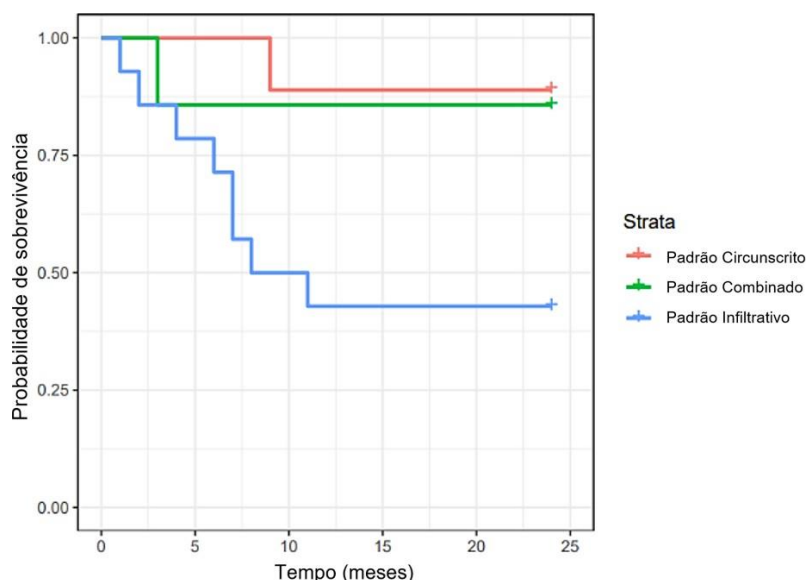


Figura 11 - Curva de sobrevivência para a mortalidade em trinta mastocitomas subcutâneos caninos, classificados segundo as classes de padrões de crescimento tumoral descritas por Thompson et al. (2011).

Os valores do v_v não mostraram uma variância estatisticamente significativa entre os grupos C1-C4 e aproximaram-se de uma relação linear (figura 12). Observou-se uma elevada concordância intraobservador (ICC=0.91), interobservador (ICC=0.9) e entre todos os observadores, na medição dos valores do v_v entre os grupos C1-C4. Este resultado manteve-se na comparação dos valores do v_v final de cada scMCT com os valores do v_v dos mesmos grupos (ICC=0.96). Não foi estudada a concordância entre observadores em relação à avaliação dos critérios histológicos descritos por Thompson et al. (2011).

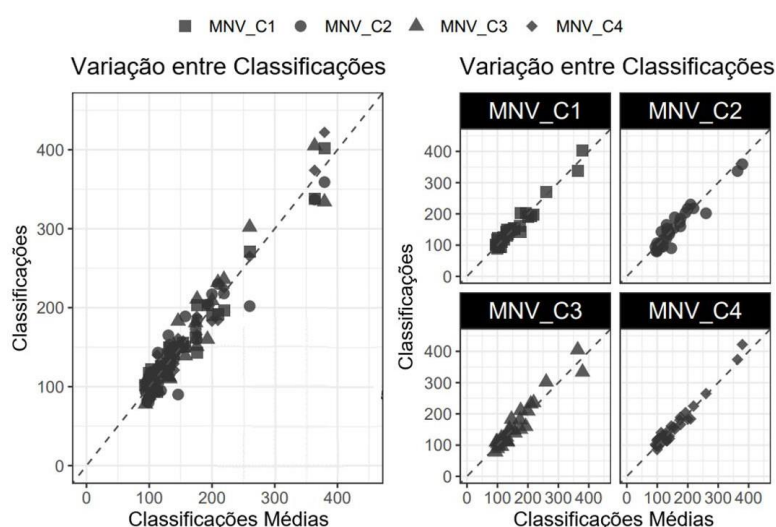


Figura 12 - Esquerda: Conjunto dos valores do volume nuclear médio ponderado dos grupos C1-C4, em trinta mastocitomas subcutâneos caninos. Direita: Distribuição dos valores do volume nuclear médio ponderado pelos grupos C1-C4, em trinta mastocitomas subcutâneos caninos.

A idade e o v_v expressaram uma relação de proporcionalidade ($p < 0.05$; $r = 0.5$; $\rho = 0.5$) uma vez que os animais mais velhos apresentaram medições mais elevadas (figura 13). Os cães do grupo OC0 com valores do v_v superiores a 157 tinham uma idade igual ou superior a 8 anos (tabela 6). Não se observaram diferenças significativas entre os valores do v_v nos padrões de crescimento tumoral e entre machos e fêmeas. Os scMCTs com número de mitoses, ou de células multinucleadas, positivo apresentam medições de v_v mais elevadas.

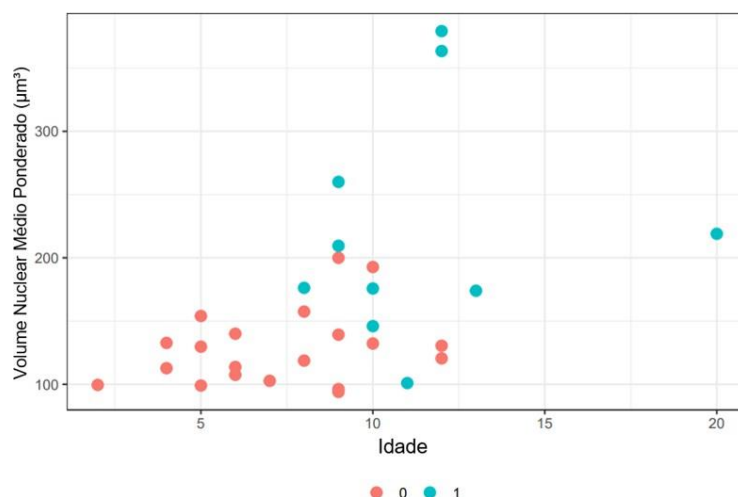


Figura 13 - Distribuição de trinta mastocitomas subcutâneos caninos pelos valores do volume nuclear médio ponderado e pela idade. Os pontos laranjas e azuis representam os animais do grupo OC0 e OC1, respetivamente.

Tabela 6 - Valores do volume nuclear médio ponderado de trinta mastocitomas subcutâneos caninos, segundo os grupos da evolução clínica e pelas idades.

Idade	$\bar{v} (\mu\text{m}^3)$					
	OC0			OC1		
2	100					
4	113		133			
5	99	130		154		
6	108	114		140		
7	103					
8	119		158		176	
9	94	96	139	200	210	260
10	132		193		146	176
11	-					101
12	121		131		364	379
13						174
20					219	

Abreviaturas: $\bar{v}$, Volume Nuclear Médio Ponderado; OC0, Evolução clínica de 0 ou vivo; OC1, Evolução clínica de 1 ou falecido.

O v_v variou de 94 μm^3 a 200 μm^3 no grupo OC0 e de 101 μm^3 a 379.25 μm^3 no grupo OC1. Os scMCTs do grupo OC1 apresentaram valores do v_v mais elevados que os do grupo OC0 (figura 14). A diferença observada entre o v_v dos grupos da evolução clínica, é estatisticamente significativa nas análises univariável e multivariável. Contudo, o v_v não foi estatisticamente significativo na regressão de Cox e, por isso, incapaz de quantificar o risco da mortalidade dos scMCTs ao longo do tempo.

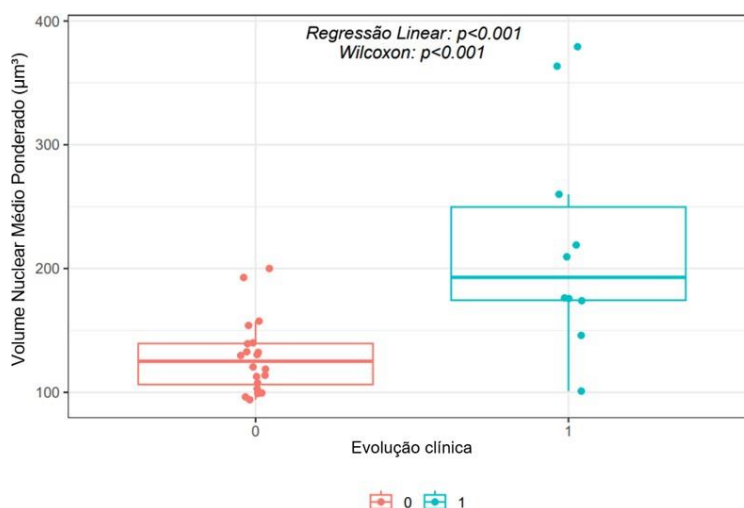


Figura 14 - Distribuição de trinta mastocitomas subcutâneos caninos pelos valores do volume nuclear médio ponderado e dos grupos da evolução clínica. As caixas representam o primeiro quartil, segundo quartil (mediana) e o terceiro quartil. Os bigodes representam a extensão (máxima e mínima) dos resultados. Os valores do volume nuclear médio ponderado são diferentes estatisticamente entre os grupos da evolução clínica (teste dos postos sinalizados de Wilcoxon).

Os scMCT com v_v igual ou superior a 143 μm^3 estavam associados a um pior prognóstico, com 90% de sensibilidade e 80% de especificidade (figura 15). Contudo, 2 anos após o diagnóstico, apenas 69% dos animais com $\bar{v}_v > 143 \mu\text{m}^3$ morreram, mas 94% dos animais com $\bar{v}_v < 143 \mu\text{m}^3$ sobreviveram (tabela 7). A probabilidade de sobrevivência, 11 meses após o diagnóstico de scMCT, foi cerca de 30% em tumores com valores de $\bar{v}_v$ superiores a 143 μm^3 (figura 16 **Error! Reference source not found.**). Este valor de *cut-off* mostrou significado estatístico nas análises multivariável das regressões logística e de Cox.

Os scMCT com v_v igual ou superior a 166 μm^3 estavam associados a um pior prognóstico, com 80% de sensibilidade e 90% de especificidade (figura 15). Dois anos após o diagnóstico, 80% dos animais com $\bar{v}_v > 166 \mu\text{m}^3$ morreram e 90% dos animais com $\bar{v}_v < 166$

μm^3 sobreviveram (tabela 7). A probabilidade de sobrevivência, 11 meses após o diagnóstico de scMCT, foi cerca de 25% em tumores com $\bar{v}_v > 166 \mu\text{m}^3$ (figura 17 **Error! Reference source not found.**). Tal como o anterior, este valor de *cut-off* mostrou significado estatístico nas análises multivariável das regressões logística e de Cox.

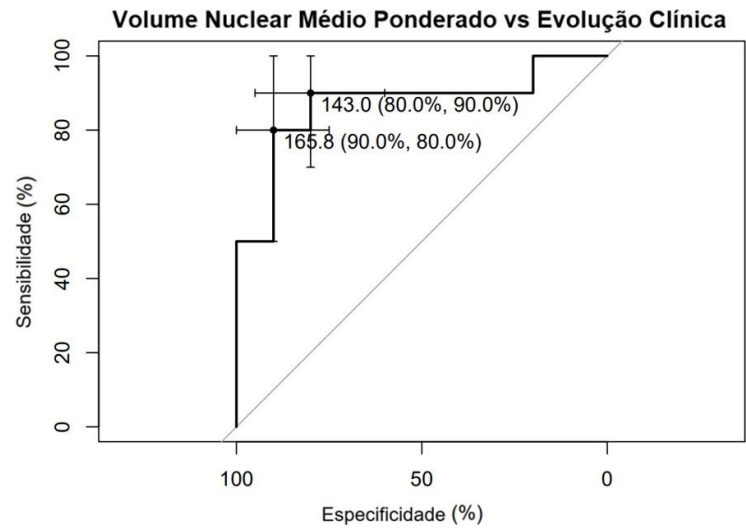


Figura 15 - Curva característica de operação do recetor para o volume nuclear médio ponderado, segundo a evolução clínica de trinta mastocitomas subcutâneos caninos. Valores de $\bar{v}_v \geq 143 \mu\text{m}^3$ estão associados com a mortalidade, com 90% de sensibilidade e 80% de especificidade. Valores de $\bar{v}_v \geq 166 \mu\text{m}^3$ estão associados com a mortalidade, com 80% de sensibilidade e 90% de especificidade.

Tabela 7 - Desempenho dos valores de cut-off em trinta mastocitomas subcutâneos caninos.

<i>Cut-off</i>	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)	Valor preditivo positivo (%)	Valor preditivo negativo (%)
143 μm^3	90	80	69	94
166 μm^3	80	90	80	90

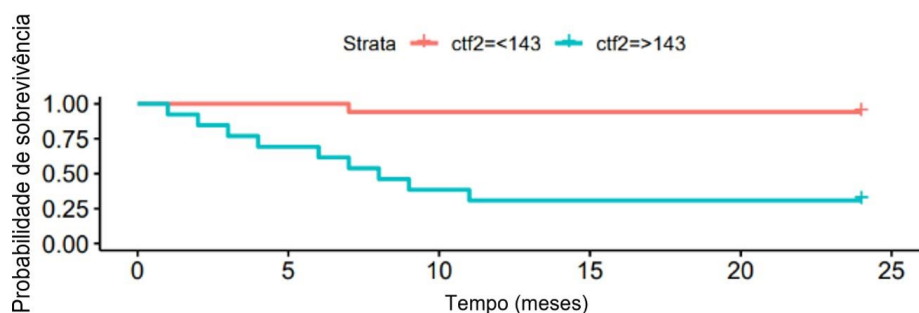


Figura 16 - Curva de sobrevivência para a mortalidade em trinta mastocitomas subcutâneos caninos, classificados segundo o cut-off de 143 μm^3 do volume nuclear médio ponderado. Abreviaturas: ctf2=<143, cut-off igual ou inferior a 143 μm^3 ; ctf2=>143, cut-off igual ou superior a 143 μm^3 .

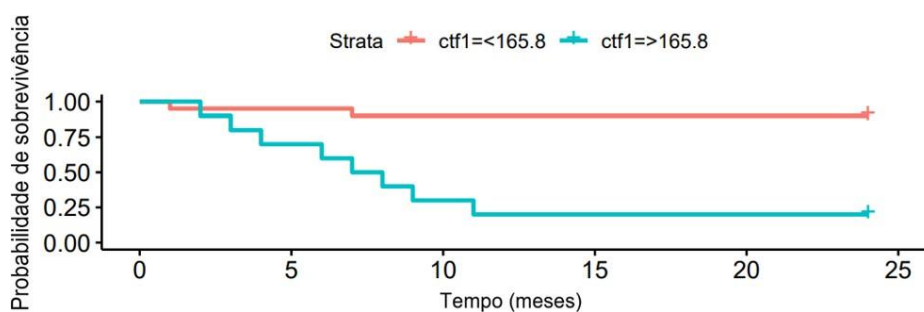


Figura 17 - Curva de sobrevivência para a mortalidade em trinta mastocitomas subcutâneos caninos, classificados segundo o cut-off de 165.8 μm^3 do volume nuclear médio ponderado. Abreviaturas: ctf2=<165.8, cut-off igual ou inferior a 165.8 μm^3 ; ctf2=>165.8, cut-off igual ou superior a 165.8 μm^3 .

3. Discussão

3.1. Evolução clínica

Os grupos OC0 e OC1 representaram 66.6% e 33.3% dos scMCTs, respectivamente. No grupo OC1, oito animais faleceram num período inferior a 10 meses após o diagnóstico. Destes, quatro cães não alcançaram os 6 meses de sobrevivência. Segundo a literatura, os scMCTs são muitas vezes considerados benignos ao serem comparados com os ccMCTs. Contudo, deve ter-se em consideração que os MCTs, independentemente da sua localização na pele, apresentam um comportamento heterogêneo e que a previsão do mesmo se deve basear em fatores com valor prognóstico. A seleção das amostras não foi completamente

aleatória, por isso não se fizeram observações sobre comportamento biológico dos scMCTs comparativamente ao dos ccMCTs.

Em geral, 13% e 23% dos scMCTs apresentaram recidiva local e metastização, respetivamente. A reocorrência tumoral foi apenas observada no grupo OC1, ou seja, foi indicativa de um pior prognóstico e um maior risco de mortalidade, apoiando a literatura (Gill et al., 2020). Contudo, o viés de seleção das amostras não permitiu que estes valores fossem considerados representativos da população.

3.2. Raça

A incidência das raças caninas da amostra foi concordante com a descrita na literatura. Contudo, a assimetria da distribuição dos indivíduos por categoria de raça impediu o estudo estatístico da influência da raça sobre a evolução clínica (tabela 4). A seleção dos scMCTs sofreu viés, por isso a representatividade das raças, e de outras variáveis, deve ser interpretada considerando este aspeto. Villamil et al. (2011) quantificou as raças caninas diagnosticadas com ccMCTs num período de 38 anos. Através de uma população de controlo (superior a 1 milhão de indivíduos), determinou a prevalência e o risco de desenvolvimento desta neoplasia em cada raça. Os resultados mostraram-se parcialmente concordantes com a evidência observada noutros estudos de MCT. A ausência de uma compatibilidade exata pode dever-se à área geográfica e ao uso de amostras pouco representativas da população e/ou compostas por um número reduzido de animais e/ou que não incluem uma população controlo (Villamil et al., 2011; Warland & Dobson, 2013).

3.3. Margens histológicas

A ausente correlação dos valores das margens tumorais entre os grupos OC0 e OC1 (figura 9 e figura 10), demonstrou que esta variável não foi prognóstica nos scMCTs. Michels et al. (2002), Murphy et al. (2004) e Schultheiss, Gardiner, Rao, Olea-Popelka, & Tuohy (2011), suportam esta conclusão e acrescentam que o poder prognóstico desta variável estava associado à recidiva tumoral. No grupo OC1, quatro cães com margens incompletas desenvolveram recidiva tumoral (2 com metastização) e quatro cães com margens histológicas completas desenvolveram metastização regional. Apesar dos riscos de recidiva local e de metastização serem menores com margens cirúrgicas amplas, a visualização histológica de margens “limpas” não invalida a possível ocorrência de disseminação neoplásica prévia à cirurgia.

3.4. Idade

A amplitude do intervalo de idades e os seus valores médios, nos grupos OC0 e OC1, estavam de acordo com a literatura (figura 13). Embora o diagnóstico dos scMCTs não tenha ocorrido numa faixa etária específica, o grupo OC1 representou animais mais velhos. Ou seja, a idade influenciou a sobrevivência e os animais mais velhos estavam associados a um risco superior de morrer. Esta relação foi também observada por Kiupel et al. (2005), Sfiligoi et al. (2005), Shoop et al. (2015), Treggiari et al. (2023) e Villamil et al. (2011). Adicionalmente, nas análises multivariável, a idade foi a única variável que se manteve estatisticamente significativa e não foi afetada pelas restantes. No entanto, é importante realçar que um animal do grupo OC1 tinha 20 anos e que este contribuiu consideravelmente para a influência da idade na morte e para este significado estatístico. Os animais diagnosticados aos 2 e 4 anos de idade, são da raça Shar Pei e RI, respetivamente. Esta particularidade exemplificou e apoiou os estudos sobre a relação entre a raça e a idade.

3.5. Padrão de Crescimento Tumoral

De acordo com Bostock (1973) e Thompson et al. (2011), tumores invasivos, infiltrativos e de rápido crescimento foram associados a um pior prognóstico e menor período de sobrevivência. No presente estudo, a elevada sensibilidade e mortalidade do padrão infiltrativo indicaram uma boa capacidade para identificar a morte (figura 11). Contudo, este parâmetro não foi estatisticamente significativo nas análises univariável e multivariável, devido à sua especificidade (43% dos animais com padrão infiltrativo sobreviveram) (tabela 5). O seu desempenho na análise multivariável foi suportado pela da idade (cães mais velhos apresentaram padrão infiltrativo).

Em geral, a variável “padrão de crescimento” não conseguiu direcionar os animais consoante a sua evolução clínica (valor- $p > 0.05$), ou seja, não teve poder prognóstico em scMCT. Kiupel et al. (2011) e Sabattini, Scarpa, Berlato, & Bettini (2015) mostraram que as classificações ternárias causam elevada variação entre observadores (reduzida reprodutibilidade) e conduzem a conclusões prognósticas ambíguas e pouco úteis. Simultaneamente, a ausência de um esquema de classificação para scMCTs promove o aumento do número de tumores de grau intermédio e a redução do poder prognóstico desta ferramenta (Newman et al., 2007; Northrup et al., 2005; Sabattini et al., 2015). No grupo OC1, um Labrador Retriever (13 anos) apresentou padrão combinado e um período de sobrevivência de 5 meses. A sensibilidade e especificidade do padrão de crescimento combinado (10% e 70%, respetivamente) exemplificam esta mesma ambiguidade. A comparação de pares, entre os padrões infiltrativo e circunscrito ($p > 0.05$), e entre o padrão

combinado e os restantes, mostrou que o potencial deste parâmetro é afetado pela sua categorização ternária. O mesmo se observa para Thompson et al. (2011). A reduzida dimensão da amostra, a maior limitação deste estudo, contribuiu negativamente para estes resultados.

3.6. Número de Mitoses

De acordo com Thompson et al. (2011), a contagem mitótica mostrou ser prognóstica para scMCT, contrariamente ao padrão de crescimento tumoral e à atipia nuclear. No presente estudo, as amostras com contagem mitótica positiva ($MC > 4$) estavam associadas a um pior prognóstico (100% de especificidade). Os scMCTs com $MC=6$, $MC=12$ e $MC=24$, apresentaram um padrão de crescimento infiltrativo e tempos de sobrevivência de cerca de 9 meses, 60 dias e 7 meses, respetivamente. Não foi possível, no entanto, constatar o seu valor prognóstico, devido à sua sub-representação. Estes resultados poderão ter sido a consequência da dimensão da amostra, da representação bidimensional dos cortes histopatológicos, do método de seleção dos campos microscópicos (pouco criterioso e standardizado, e em número reduzido) e da influência da manipulação dos tecidos (Aubreville et al., 2020; Diest et al., 1992; Donovan et al., 2021; Sørensen, Bichel, & Jakobsen, 1992; Thamm et al., 2019). Além destes aspetos, é necessário considerar as repercussões da heterogeneidade intratumoral em conjunto com o método de avaliação das figuras de mitose descrito por Romansik et al. (2007). Não só a representatividade do tumor é comprometida, como a variabilidade entre observadores impede a reprodutibilidade dos resultados (Piraino, Thomas, O'Donovan, & Furney, 2018; Ramón y Cajal et al., 2020). Esta incoerência torna este parâmetro histológico subjetivo e não fiável. Jannink, Risberg, Van Diest, & Baak (1996), observaram uma elevada heterogeneidade da atividade mitótica em diferentes regiões da mesma massa tumoral, em carcinoma mamário. No estudo de Garbe et al. (2016), verificou-se uma elevada variabilidade intra- e interobservador, na avaliação do número de mitoses em melanoma primário, devido principalmente à distribuição aleatória do número de mitoses.

3.7. Células multinucleadas

À semelhança da contagem mitótica, a sub-representação do número de células multinucleadas, justificada pelos motivos anteriores, impossibilitou a determinação do seu potencial prognóstico em scMCT. Além disso, não houve sobreposição entre os valores positivos da contagem mitótica e das células multinucleadas, e entre esta última e o padrão infiltrativo.

3.8. Volume Nuclear Médio Ponderado

A elevada concordância entre as quatro medições do v_v (ICC=0.91), e entre estas e o seu valor do v_v médio final (ICC=0.96), em todas as amostras, permitiu concluir que a estimativa estereológica do v_v em scMCTs apresentou um nível de reprodutibilidade bom a excelente (figura 12). As medições estereológicas do volume nuclear em carcinoma urotelial ($r=0.93$) (Sørensen et al., 1994), melanoma ($r=0.86$) (Sørensen & Ottosen, 1991), carcinoma das células escamosas do cervix ($r=0.85$) (Sørensen, Bichel, & Jakobsen, 1991) e mastocitoma cutâneo canino (r próximo de 1) (Casanova et al., 2021) tem demonstrado elevada reprodutibilidade entre avaliadores e uma fácil e simples execução. Além disso, a associação da estereologia a métodos de classificação histológicos clássicos reduziu a variação entre classificadores em tumores de elevada heterogeneidade, nomeadamente, carcinoma mamário (Santos et al., 2014) e adenocarcinoma prostático (Leze et al., 2014).

A idade apresentou uma relação linear com o v_v (figura 13), permanecendo significativa na análise multivariável, mas o sexo e o padrão de crescimento tumoral não mostraram uma associação com os valores de v_v em ScMCTs, tal como foi observado para a evolução clínica.

A incongruência observada entre critérios de Thompson et al. (2011) espelhou a subjetividade da avaliação qualitativa das características histopatológicas, embora a dimensão da amostra tenha influenciado negativamente o desempenho destes parâmetros. Contudo, estes resultados não rejeitam a capacidade dos tumores manifestarem um perfil histopatológico a partir do seu comportamento biológico. Os tumores do grupo OC1 com padrão infiltrativo tenderam para valores de $\bar{v}$ superiores, fortalecendo a associação deste padrão com a mortalidade. A categorização do padrão de crescimento em não-infiltrativo e infiltrativo poderá remediar a ambiguidade deste parâmetro.

Os scMCTs com células multinucleadas ou contagem mitótica positiva obtiveram valores v_v mais elevados, revelando a possibilidade destes critérios se relacionarem com o $\bar{v}_v$, isoladamente.

A diferença entre os valores de v_v dos grupos OC0 e OC1, mostrou que estas medições tiveram valor prognóstico (figura 14). Ambos os valores de *cut-off* apresentaram poder preditivo sobre a evolução clínica (valor- $p < 0.05$).

No grupo OC0, 90% dos scMCTs apresentaram um $\bar{v}_v < 166 \mu\text{m}^3$. Contudo, 94% dos animais com $\bar{v}_v < 143 \mu\text{m}^3$ sobreviveram (tabela 7). Estes resultados indicaram que, neste estudo de 2 anos, os scMCTs com valores de $\bar{v}_v < 143 \mu\text{m}^3$ estavam associados a um melhor

prognóstico porque a sua probabilidade de sobrevivência é superior (figura 16). Por outro lado, observou-se uma mortalidade de 69% nos animais com $\bar{v}_v > 143$ e de 80% nos animais com $\bar{v}_v > 166 \mu\text{m}^3$ (tabela 7). Ou seja, no período de 2 anos deste estudo, os scMCTs com valores de $\bar{v}_v > 166 \mu\text{m}^3$ estavam associados a um pior prognóstico porque a sua probabilidade de mortalidade é superior (figura 17).

Este estudo apresentou algumas limitações, relacionadas com a natureza dos estudos de coorte retrospectivo. A seleção dos casos pretendeu incluir scMCTs que representassem ambos os grupos da evolução clínica. Contudo, a inclusão dos casos dependeu também da disponibilidade e participação das entidades veterinárias, das quais os animais foram provenientes. Nesta perspetiva, a amostra, embora aleatória, não é completamente representativa da população geral. Além disso, a informação obtida através das entrevistas telefónicas está sujeita a imprecisões e em alguns casos estava incompleta. Finalmente, a maior limitação compreende a dimensão da amostra. O número reduzido de scMCTs não só impactou negativamente a confiança dos resultados da análise estatística, como impossibilitou avaliar a influência de alguns fatores de risco na sobrevivência dos animais e no desempenho do $\bar{v}_v$.

A estereologia mostrou uma nova perspetiva para a avaliação da morfologia celular, através da quantificação do pleomorfismo nuclear. Estes resultados suportam os estudos anteriores, com o objetivo de motivar a aplicação deste método e melhorar a objetividade da análise histológica.

4. Conclusão

O padrão de crescimento tumoral, o número de mitoses e o número de células multinucleadas não se correlacionaram com a evolução clínica e com o v_v dos scMCTs. A estimativa estereológica do v_v foi prognóstica da evolução clínica dos scMCTs. Os tumores com v_v inferior a $143 \mu\text{m}^3$ estavam associados à sobrevivência e v_v superiores a $166 \mu\text{m}^3$ estavam associados à mortalidade, no período de 2 anos após o diagnóstico. Estes resultados indicam que a avaliação quantitativa e objetiva do pleomorfismo nuclear, através da estereologia, representa um fator de prognóstico válido para o diagnóstico de scMCTs. A quantificação do v_v em scMCTs deve ser realizada numa amostra de cães superior de forma a reconfirmar estes resultados.

Bibliografia

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H., & Pillai, S. (2016). *Cellular and Molecular Immunology* (Ninth.). Elsevier, Inc. Retrieved from <https://medium.com/@arifwicaksanaa/pengertian-use-case-a7e576e1b6bf>
- Abrams, B. E., Putterman, A. B., Ruple, A., Wavreille, V., & Selmic, L. E. (2021). Variability in tumor margin reporting for soft tissue sarcoma and cutaneous mast cell tumors in dogs: A systematic review. *Veterinary Surgery*, 50, 259–272.
- Allik, J., Toom, M., Raidvee, A., Averin, K., & Kreegipuu, K. (2013). An almost general theory of mean size perception. *Vision Research*, 83, 25–39.
- Ariizumi, T., Ogose, A., Kawashima, H., Hotta, T., Umezu, H., & Endo, N. (2009). Multinucleation followed by an acytokinetic cell division in myxofibrosarcoma with giant cell proliferation. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 28(1), 2–7.
- Arima, K., Sugimura, Y., Hioki, T., Yamashita, A., & Kawamura, J. (1997). Stereologically estimated. *British Journal of Cancer*, 76(2), 234–237.
- Aru, A., & Nielsen, K. (1989). Stereological Estimates of Nuclear Volume in Primary Lung Cancer. *Pathology Research and Practice*, 185(5), 735–739. Gustav Fischer Verlag · Stuttgart · New York. Retrieved from [http://dx.doi.org/10.1016/S0344-0338\(89\)80229-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0344-0338(89)80229-8)
- Aubreville, M., Bertram, C. A., Marzahl, C., Gurtner, C., Dettwiler, M., Schmidt, A., Bartenschlager, F., et al. (2020). Deep learning algorithms out-perform veterinary pathologists in detecting the mitotically most active tumor region. *Scientific Reports*, 10(1), 1–11. Nature Publishing Group UK. Retrieved from <https://doi.org/10.1038/s41598-020-73246-2>
- Banks, W. J. (2016). *Applied Veterinary Histology 3rd Edition*. (3rd ed.).
- Baroni, A., Buommino, E., De Gregorio, V., Ruocco, E., Ruocco, V., & Wolf, R. (2012). Structure and function of the epidermis related to barrier properties. *Clinics in Dermatology*, 30(3), 257–262. Elsevier B.V. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1016/j.clindermatol.2011.08.007>
- Bellamy, E., & Berlato, D. (2021). Canine cutaneous and subcutaneous mast cell tumours: a review. *Journal of Small Animal Practice*, 63(7), 1–15. Retrieved from [doi:10.1111/jsap.12444](https://doi.org/10.1111/jsap.12444)

- Berlato, D., Bulman-Fleming, J., Clifford, C. A., Garrett, L., Intile, J., Jones, P., Kamstock, D. A., et al. (2021). Value, Limitations, and Recommendations for Grading of Canine Cutaneous Mast Cell Tumors: A Consensus of the Oncology-Pathology Working Group. *Veterinary Pathology*, 58(5), 858–863.
- Bignold, L. P. (2002). The mutator phenotype theory can explain the complex morphology and behaviour of cancers. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 59(6), 950–958.
- Bignold, Leon P. (2003). Pathogenetic mechanisms of nuclear pleomorphism of tumour cells based on the mutator phenotype theory of carcinogenesis. *Histology and Histopathology*, 18(2), 657–664.
- Binder, M., Dolezal, I., Wolff, K., & Pehamberger, H. (1992). Stereologic estimation of volume-weighted mean nuclear volume as a predictor of prognosis in “thin” malignant melanoma. *Journal of Investigative Dermatology*, 99(2), 180–183.
- Bostock, D. E. (1973). The prognosis following surgical removal of mastocytomas in dogs. *Journal of Small Animal Practice*, 14(1), 27–40.
- Boyce, R. W., Dorph-Petersen, K. A., Lyck, L., & Gundersen, H. J. G. (2010). Design-based stereology: introduction to basic concepts and practical approaches for estimation of cell number. *Toxicologic pathology*, 38(7), 1011–1025.
- Brønden, L. B., Nielsen, S. S., Toft, N., & Kristensen, A. T. (2010). Data from the Danish veterinary cancer registry on the occurrence and distribution of neoplasms in dogs in Denmark. *Veterinary Record*, 166(19), 586–590.
- Brú, A., Albertos, S., Subiza, J. L., García-Asenjo, J. L., & Brú, I. (2003). The Universal Dynamics of Tumor Growth. *Biophysical Journal*, 85(5), 2948–2961.
- Bukhari, M. H., Niazi, S., Khan, S. A., Hashmi, I., Perveen, S., Qureshi, S. S., Chaudhry, N. A., et al. (2007). Modified method of AgNOR staining for tissue and interpretation in histopathology. *International Journal of Experimental Pathology*, 88(1), 47–53.
- Cagan, A., Baez-Ortega, A., Brzozowska, N., Abascal, F., Coorens, T. H. H., Sanders, M. A., Lawson, A. R. J., et al. (2022). Somatic mutation rates scale with lifespan across mammals. *Nature*, 604(7906), 517–524. Springer US.
- Calderaro, J., Couchy, G., Imbeaud, S., Amaddeo, G., Letouzé, E., Blanc, J. F., Laurent, C., et al. (2017). Histological subtypes of hepatocellular carcinoma are related to gene

- mutations and molecular tumour classification. *Journal of Hepatology*, 67(4), 727–738. European Association for the Study of the Liver. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2017.05.014>
- Casanova, M., Branco, S., Veiga, I. B., Barros, A., & Faísca, P. (2021). Stereology in Grading and Prognosis of Canine Cutaneous Mast Cell Tumors. *Veterinary Pathology*, 58(3), 483–490.
- Chen, P., Marconato, L., Sabattini, S., & Kiupel, M. (2022). Mutations in Exons 8 and 11 of c-kit Gene in Canine Subcutaneous Mast Cell Tumors and Their Association with Cell Proliferation. *Veterinary Sciences*, 9(9), 1–9.
- Cherzan, N. L., Fryer, K., Burke, B., & Farrelly, J. (2023). Factors affecting prognosis in canine subcutaneous mast cell tumors: 45 cases. *Veterinary Surgery*, 52(4), 531–537.
- Conti, C. J. (2010). Mechanisms of Tumor Progression. *Comprehensive Toxicology* (2nd ed., Vol. 14, pp. 335–347). Retrieved from <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.01417-2>
- Cree, I. A., Tan, P. H., Travis, W. D., Wesseling, P., Yagi, Y., White, V. A., Lokuhetty, D., et al. (2021). Counting mitoses: SI(ze) matters! *Modern Pathology*, 34(9), 1651–1657. Springer US. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/s41379-021-00825-7>
- Davies, D. R., Wyatt, K. M., Jardine, J. E., Robertson, I. D., & Irwin, P. J. (2004). Vinblastine and prednisolone as adjunctive therapy for canine cutaneous mast cell tumors. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 40(2), 124–130.
- Disanza, A., Bisi, S., Frittoli, E., Malinverno, C., Marchesi, S., Palamidessi, A., Rizvi, A., et al. (2019). Is cell migration a selectable trait in the natural evolution of cancer development? *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 374(1779).
- Donovan, T. A., Moore, F. M., Bertram, C. A., Luong, R., Bolfa, P., Klopffleisch, R., Tvedten, H., et al. (2021). Mitotic Figures—Normal, Atypical, and Imposters: A Guide to Identification. *Veterinary Pathology*, 58(2), 243–257.
- Elston, L. B., Sueiro, F. A. R., Cavalcanti, J. N., & Metze, K. (2009). The Importance of the Mitotic Index as a Prognostic Factor for Survival of Canine Cutaneous Mast Cell Tumors: A Validation Study. *Veterinary Pathology*, 46, 362–365.
- Fantuzzi, G. (n.d.). Molecular mechanisms in allergy and clinical immunology, 911–919.

- Fédération Cynologique Internationale. (n.d.). FCI breeds nomenclature: Breeds recognised on a definitive basis. *Fédération cynologique internationale (FCI)*. Retrieved March 6, 2023, from <https://fci.be/en/Nomenclature/>
- Ferrari, R., Boracchi, P., Chiti, L. E., Manfredi, M., Giudice, C., De Zani, D., Spediacci, C., et al. (2021). Assessing the risk of nodal metastases in canine integumentary mast cell tumors: Is sentinel lymph node biopsy always necessary? *Animals*, 11(8).
- Fischer, E. G. (2020). Nuclear Morphology and the Biology of Cancer Cells. *Acta Cytologica*, 64(6), 511–519.
- Fournier, Q., Thierry, F., Longo, M., Malbon, A., Cazzini, P., Bisson, J., Woods, S., et al. (2021). Contrast-enhanced ultrasound for sentinel lymph node mapping in the routine staging of canine mast cell tumours: A feasibility study. *Veterinary and Comparative Oncology*, 19(3), 451–462.
- Freytag, J. O., Queiroz, M. R., Govoni, V. M., Pereira, I. V. A., Pulz, L. H., de Francisco Strefezzi, R., Queiroga, F. L., et al. (2021). Prognostic value of immunohistochemical markers in canine cutaneous mast cell tumours: A systematic review and meta-analysis. *Veterinary and Comparative Oncology*, 19(3), 529–540.
- Friedl, P., & Alexander, S. (2011). Cancer invasion and the microenvironment: Plasticity and reciprocity. *Cell*, 147(5), 992–1009. Elsevier Inc. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.11.016>
- Frigolet, M. E., & Gutiérrez-Aguilar, R. (2020). The colors of adipose tissue, 156, 142–149.
- Garbe, C., Eigentler, T. K., Bauer, J., Blödorn-Schlicht, N., Cerroni, L., Fend, F., Hantschke, M., et al. (2016). Mitotic rate in primary melanoma: interobserver and intraobserver reliability, analyzed using H&E sections and immunohistochemistry. *JDDG - Journal of the German Society of Dermatology*, 14(9), 910–915.
- Garrett, L. (2014). Canine mast cell tumors: diagnosis, treatment, and prognosis. *Veterinary Medicine: Research and Reports*, 49.
- Gibbs, B. F., & Falcone, F. H. (2014). *Basophils and Mast Cells. Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* (Vol. 1192).
- Gill, V., Leibman, N., Monette, S., Craft, D. M., & Bergman, P. J. (2020). Prognostic Indicators

- and Clinical Outcome in Dogs with Subcutaneous Mast Cell Tumors Treated with Surgery Alone: 43 Cases. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 56(4), 215–225. <http://www.jaaha.org/>. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.5326/JAAHA-MS-6960>
- Gross, T. L. (2005). *SKIN DISEASES OF Clinical and Histopathologic Diagnosis*.
- Gundersen, H. J. G. (1986). Stereology of arbitrary particles. *Journal of Microscopy*, 143(1), 3–45.
- Gundersen, H. J. G., Bagger, P., Bendtsen, T. F., Evans, S. M., Korbo, L., Marcussen, N., Moller, A., et al. (1988). The new stereological tools: Disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use. *Apmis*, 96, 857–881.
- Gundersen, H. J. G., & Jensen, E. B. (1983). Particle sizes and their distributions estimated from line- and point- sampled intercepts. Including graphical unfolding. *Journal of Microscopy*, 131(3), 291–310.
- Gundersen, H. J. G., & Jensen, E. B. (1985). Stereological estimation of the volume- weighted mean volume of arbitrary particles observed on random sections. *Journal of Microscopy*, 138(2), 127–142.
- Gundersen, H. J. G., & ØSterby, R. (1981). Optimizing sampling efficiency of stereological studies in biology: or 'Do more less well!'. *Journal of Microscopy*, 121(1), 65–73.
- Hahn, K. A., King, G. K., & Carreras, J. K. (2004). Efficacy of radiation therapy for incompletely resected grade-III mast cell tumors in dogs: 31 Cases (1987-1998). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 224(1), 79–82.
- Haine, D. L., Pittaway, R., Berlato, D., & Demetriou, J. (2022). Incomplete histological margins following planned narrow excision of canine appendicular soft tissue sarcomas and mast cell tumors, using the residual tumor classification scheme. *Veterinary Surgery*, 51(7), 1078–1086.
- Haynes, R. (1984). Quantitative microscopy. *Optical Microscopy of Materials* (pp. 88–93).
- Hergt, F., von Bomhard, W., Kent, M. S., & Hirschberger, J. (2016). Use of a 2-tier histologic grading system for canine cutaneous mast cell tumors on cytology specimens. *Veterinary Clinical Pathology*, 45(3), 477–483.
- Hildebrandt, S. (2012). The anatomist Hans Elias: A Jewish German in exile. *Clinical anatomy*

(New York, N.Y.), 25(3), 284–294.

- Horsley, V., & Pavlath, G. K. (2004). Forming a Multinucleated Cell: Molecules That Regulate Myoblast Fusion. *Cells Tissues Organs*, 176(1–3), 67–78.
- Horta, R. S., Lavallo, G. E., Monteiro, L. N., Souza, M. C. C., Cassali, G. D., & Araújo, R. B. (2018). Assessment of Canine Mast Cell Tumor Mortality Risk Based on Clinical, Histologic, Immunohistochemical, and Molecular Features. *Veterinary Pathology*, 55(2), 212–223.
- Howard, V., & Reed, M. (2004). *Unbiased Stereology. Unbiased Stereology*.
- Hume, C. T., Kiupel, M., Rigatti, L., Shofer, F. S., Skorupski, K. A., & Sorenmo, K. U. (2011). Outcomes of dogs with grade 3 mast cell tumors: 43 cases (1997-2007). *Journal of the American Animal Hospital Association*, 47(1), 37–44.
- Ibrahim, A., Lashen, A., Toss, M., Mihai, R., & Rakha, E. (2022). Assessment of mitotic activity in breast cancer: revisited in the digital pathology era. *Journal of clinical pathology*, 75(6), 365–372.
- Jannink, I., Risberg, B., Van Diest, P. J., & Baak, J. P. A. (1996). Heterogeneity of mitotic activity in breast cancer. *Histopathology*, 29(5), 421–428.
- Jennings, R., & Premanandan, C. (2017). CHAPTER 7: INTEGUMENT. *Veterinary Histology* (Vol. 53, pp. 105–120).
- Junqueira, L. C., & Carneiro, J. (2017). *Histologia Básica*.
- Kiupel, M., Webster, J. D., Bailey, K. L., Best, S., DeLay, J., Detrisac, C. J., Fitzgerald, S. D., et al. (2011). Proposal of a 2-tier histologic grading system for canine cutaneous mast cell tumors to more accurately predict biological behavior. *Veterinary Pathology*, 48(1), 147–155.
- Kiupel, M., Webster, J. D., Kaneene, J. B., Miller, R., & Yuzbasiyan-Gurkan, V. (2004). The use of KIT and tryptase expression patterns as prognostic tools for canine cutaneous mast cell tumors. *Veterinary Pathology*, 41(4), 371–377.
- Kiupel, M., Webster, J. D., Miller, R. A., & Kaneene, J. B. (2005). Impact of tumour depth, tumour location and multiple synchronous masses on the prognosis of canine cutaneous mast cell tumours. *Journal of Veterinary Medicine Series A: Physiology Pathology Clinical*

Medicine, 52(6), 280–286.

- Knudsen, L., Brandenberger, C., & Ochs, M. (2021). Stereology as the 3D tool to quantitate lung architecture. *Histochemistry and Cell Biology*, 155(2), 163–181. Springer Berlin Heidelberg. Retrieved from <https://doi.org/10.1007/s00418-020-01927-0>
- Komi, D., Shafaghat, F., Kovanen, P. T., & Meri, S. (2020). Mast cells and complement system: Ancient interactions between components of innate immunity. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 75(11), 2818–2828.
- Koyuncu, C. F., Lu, C., Bera, K., Zhang, Z., Xu, J., Toro, P., Corredor, G., et al. (2021). Computerized tumor multinucleation index (MuNI) is prognostic in p16 + oropharyngeal carcinoma, 131(8), 1–11.
- Krick, E. L., Billings, A. P., Shofer, F. S., Watanabe, S., & Sorenmo, K. U. (2009). Cytological lymph node evaluation in dogs with mast cell tumours: Association with grade and survival. *Veterinary and Comparative Oncology*, 7(2), 130–138.
- Krick, Erika Lauren, Kiupel, M., Durham, A. C., Thaiwong, T., Brown, D. C., & Sorenmo, K. U. (2017). Investigating associations between proliferation indices, c-kit, and lymph node stage in canine mast cell tumors. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 53(5), 258–264.
- Ladekarl, M. (1998). Objective malignancy grading: A review emphasizing unbiased stereology applied to breast tumors. *APMIS, Supplement*, 106(79), 5–34.
- Lapsley, J., Hayes, G. M., Janvier, V., Newman, A. W., Peters-Kennedy, J., Balkman, C., Sumner, J. P., et al. (2021). Influence of locoregional lymph node aspiration cytology vs sentinel lymph node mapping and biopsy on disease stage assignment in dogs with integumentary mast cell tumors. *Veterinary Surgery*, 50(1), 133–141.
- Larsen, E., Watson, A. M., & Muñoz Gutiérrez, J. F. (2022). Intranasal mast cell tumors: Clinical, immunohistochemical, and molecular features in 20 dogs. *Veterinary Pathology*, 59(6).
- Lecoutre, S., Lambert, M., Drygalski, K., Hautefeuille, M., & Clément, K. (2022). Importance of the Microenvironment and Mechanosensing in Adipose Tissue Biology. *Cells*, 1–28. Retrieved from <https://doi.org/10.3390/cells11152310>
- van Lelyveld, S., Warland, J., Miller, R., Maw, H., Foale, R., Goodfellow, M., & Dobson, J.

- (2015). Comparison between Ki-67 index and mitotic index for predicting outcome in canine mast cell tumours. *Journal of Small Animal Practice*, 56(5), 312–319.
- Lemley, K. V. (2021). An Introduction to Stereology with Applications to the Glomerulus. *Glomerular Diseases*, 1(4), 294–301.
- Lens, S. M. A., & Medema, R. H. (2019). Cytokinesis defects and cancer. *Nature Reviews Cancer*, 19(1), 32–45.
- Letard, S., Yang, Y., Hanssens, K., Palmérini, F., Leventhal, P. S., Guéry, S., Moussy, A., et al. (2008). Gain-of-function mutations in the extracellular domain of KIT are common in canine mast cell tumors. *Molecular Cancer Research*, 6(7), 1137–1145.
- Leze, E., Maciel-Osorio, C. F. E., & Mandarim-de-Lacerda, C. A. (2014). Advantages of evaluating mean nuclear volume as an adjunct parameter in prostate cancer. *PLoS ONE*, 9(7), 1–6.
- Loeb, L. A., Bielas, J. H., & Beckman, R. A. (2008). Cancers exhibit a mutator phenotype: Clinical implications. *Cancer Research*, 68(10), 3551–3557.
- London, C. A., Kisseberth, W. C., Galli, S. J., Geissler, E. N., & Helfand, S. C. (1996). Expression of stem cell factor receptor (c-kit) by the malignant mast cells from spontaneous canine mast cell tumours. *Journal of Comparative Pathology*, 115(4), 399–414.
- London, Cheryl A, & Thamm, D. H. (2020). Mast Cell Tumors. *Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology* (Sixth Edit., Vol. 1, pp. 382–403). Elsevier Inc. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-59496-7.00021-9>
- Ma, Y., Longley, B. J., Wang, X., Blount, J. L., Langley, K., & Caughey, G. H. (1999). Clustering of activating mutations in c-KIT's juxtamembrane coding region in canine mast cell neoplasms. *Journal of Investigative Dermatology*, 112(2), 165–170.
- Madjene, L. C., Pons, M., Danelli, L., Claver, J., Ali, L., Madera-salcedo, I. K., Kassas, A., et al. (2014). Mast cells in renal inflammation and fibrosis: Lessons learnt from animal studies. *Molecular Immunology*, 33, 1–8. Elsevier Ltd. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1016/j.molimm.2014.03.002>
- Maiolino, P., Cataldi, M., Paciello, O., Restucci, B., & De Vico, G. (2005). Nucleomorphometric analysis of canine Cutaneous mast cell tumours. *Journal of Comparative Pathology*,

133(2–3), 209–211.

- Marconato, L., Bettini, G., Giacoboni, C., Romanelli, G., Cesari, A., Zatelli, A., & Zini, E. (2008). Clinicopathological Features and Outcome for Dogs with Mast Cell Tumors and Bone Marrow Involvement. *Response*, 1001–1007.
- Marconato, Laura, Stefanello, D., Solari Basano, F., Faroni, E., Dacasto, M., Giantin, M., Bettini, G., et al. (2023). Subcutaneous mast cell tumours: A prospective multi-institutional clinicopathological and prognostic study of 43 dogs. *Veterinary Record*, 1–10.
- Martins, A. L., Canadas-Sousa, A., Mesquita, J. R., Dias-Pereira, P., Amorim, I., & Gärtner, F. (2022). Retrospective study of canine cutaneous tumors submitted to a diagnostic pathology laboratory in Northern Portugal (2014–2020). *Canine Medicine and Genetics*, 9(1), 1–14. BioMed Central. Retrieved from <https://doi.org/10.1186/s40575-022-00113-w>
- Martins, A. L., Carvalho, F. F., Mesquita, J. R., Gärtner, F., & Amorim, I. (2021). Analysis of risk factors for canine mast cell tumors based on the kiupel and patnaik grading system among dogs with skin tumors. *Open Veterinary Journal*, 11(4), 619–634.
- McNiel, E. A., Prink, A. L., & O'Brien, T. D. (2006). Evaluation of risk and clinical outcome of mast cell tumours in pug dogs. *Veterinary and Comparative Oncology*, 4(1), 2–8.
- Mercan, C., Balkenhol, M., Salgado, R., Sherman, M., Vielh, P., Vreuls, W., Polónia, A., et al. (2022). Deep learning for fully-automated nuclear pleomorphism scoring in breast cancer. *npj Breast Cancer*, 8(1). Springer US.
- Michels, G. M., Knapp, D. W., DeNicola, D. B., Glickman, N., & Bonney, P. (2002). Prognosis following surgical excision of canine cutaneous mast cell tumors with histopathologically tumor-free versus nontumor-free margins: A retrospective study of 31 cases. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 38(5), 458–466.
- Miller, D. M. (1995). The occurrence of mast cell tumors in young Shar-Peis. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 7(3), 360–363.
- Mochizuki, H., Motsinger-Reif, A., Bettini, C., Moroff, S., & Breen, M. (2017). Association of breed and histopathological grade in canine mast cell tumours. *Veterinary and Comparative Oncology*, 15(3), 829–839.
- Modiano, J. F., & Kim, J. H. (2020). The etiology of cancer. *Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology* (6th ed., Vol. 2, pp. 1–35). Retrieved from

<https://doi.org/10.1016/B978-0-323-59496-7.00001-3>

- Molony, P., Werner, R., Martin, C., Callanan, D., Sheahan, P., Heffron, C., & Feeley, L. (2020). Tumour Cell Anaplasia and Multinucleation as Prognosticators in Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma. *Head and Neck Pathology*, 14(3), 606–615. Springer US. Retrieved from <https://doi.org/10.1007/s12105-019-01081-7>
- Monteiro, B., Boston, S., & Monteith, G. (2011). Factors influencing complete tumor excision of mast cell tumors and soft tissue sarcomas: A retrospective study in 100 dogs. *Canadian Veterinary Journal*, 52(11), 1209–1214.
- Moore, A. S., Frimberger, A. E., Taylor, D., & Sullivan, N. (2020). Retrospective outcome evaluation for dogs with surgically excised, solitary Kiupel high-grade, cutaneous mast cell tumours. *Veterinary and Comparative Oncology*, 18(3), 402–408.
- Moraleda, F. P., Martin, B. T., & Drad, G. G. (2023). Alopecias: Practical Tips For The Management Of Biopsies And Main Diagnostic Clues For The General, 1–22.
- Murphy, S., Sparkes, A. H., Smith, K. C., Blunden, A. S., & Brearley, M. J. (2004). Relationships between the histological grade of cutaneous mast cell tumours in dogs, their survival and the efficacy of surgical resection. *Veterinary Record*, 154(24), 743–746.
- Murphy, Sue. (2006). Skin neoplasia in small animals. 3. Common canine tumours. *In Practice*, 28(7), 398–402.
- Nardi, A. B. De, Horta, S., Fonseca-alves, C. E., Paiva, F. N. De, Linhares, M., Firmo, B. F., Augusto, F., et al. (2022). Subcutaneous Mast Cell Tumors, 1–37.
- Navarro, A. G., Villarroya, J., Cereijo, R., Giralt, M., & Villarroya, F. (2021). The endocrine role of brown adipose tissue: An update on actors and actions. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, (0123456789). Springer US. Retrieved from <https://doi.org/10.1007/s11154-021-09640-6>
- Newman, S. J., Mrkonjich, L., Walker, K. K., & Rohrbach, B. W. (2007). Canine Subcutaneous Mast Cell Tumour: Diagnosis and Prognosis. *Journal of Comparative Pathology*, 136(4), 231–239.
- Normand, G., & King, R. W. (2010). Understanding cytokinesis failure. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 675, 27–55.

- Northrup, N. C., Howerth, E. W., Harmon, B. G., Brown, C. A., Carmicheal, K. P., Garcia, A. P., Latimer, K. S., et al. (2005). Variation among pathologists in the histologic grading of canine cutaneous mast cell tumors with uniform use of a single grading reference. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 17(6), 561–564.
- Nova-Camacho, L. M., & Sangoi, A. R. (2023). Clear Cell Renal Cell Carcinoma With Syncytial-Type Multinucleated Giant Tumor Cells: A Clinicopathologic Study of 14 Cases. *International Journal of Surgical Pathology*, (March 2022).
- Noviana, D., Mamba, K., Makimura, S., & Horii, Y. (2004). Distribution, histochemical and enzyme histochemical characterization of mast cells in dogs. *Journal of Molecular Histology*, 35(2), 123–132.
- Nowell, P. C. (1976). The clonal evolution of tumor cell populations. *Science*, 194(4260), 23–28.
- Oliveira, M. T., Campos, M., Lamego, L., Magalhães, D., Menezes, R., Oliveira, R., Patanita, F., et al. (2020). Canine and Feline Cutaneous Mast Cell Tumor: A Comprehensive Review of Treatments and Outcomes. *Topics in Companion Animal Medicine*, 41.
- Ono, S. (1971). Genetic implication of karyological instability of malignant somatic cells. *Physiological reviews*, 51(3), 496–526.
- Ouellette, J. N., Drifka, C. R., Pointer, K. B., Liu, Y., Lieberthal, T. J., Kao, W. J., Kuo, J. S., et al. (2021). Navigating the collagen jungle: The biomedical potential of fiber organization in cancer. *Bioengineering*, 8(2), 1–19.
- Owen, L. N. (1980). TNM Classification of tumours in domestic animals. *World Health Organisation* (pp. 1–52). Retrieved from <http://www.cabdirect.org/abstracts/19812266568.html>
- Pacheco, R. R., Kurt, B. B., Kosemehmetoglu, K., Rothrock, A. T., Lightle, A., & Akgul, M. (2023). Multinucleated tumor cells in clear cell renal cell carcinoma. *American Journal of Clinical Pathology*, (August).
- Patnaik, A. K., Ehler, W. J., & MacEwen, E. G. (1984). Canine Cutaneous Mast Cell Tumor: Morphologic Grading and Survival Time in 83 Dogs. *Veterinary Pathology*, 21(5), 469–474.
- Perrin, C., & Ambrosetti, D. (2022). Pleomorphic Onychomatricoma: A Mimicker of Malignancy.

Acta Dermato-Venereologica, 102, 2–7.

- Perrino, C. M., Grignon, D. J., Williamson, S. R., Idrees, M. T., Eble, J. N., & Cheng, L. (2018). Morphological spectrum of renal cell carcinoma, unclassified: an analysis of 136 cases. *Histopathology*, 72(2), 305–319.
- Peters, J. A. (1969). Canine mastocytoma: Excess risk as related to ancestry. *Journal of the National Cancer Institute*, 42(3), 435–443.
- Pierini, A., Lubas, G., Gori, E., Binanti, D., Millanta, F., & Marchetti, V. (2019). Epidemiology of breed-related mast cell tumour occurrence and prognostic significance of clinical features in a defined population of dogs in West-Central Italy. *Veterinary Sciences*, 6(2), 2–9.
- Piraino, S. W., Thomas, V., O'Donovan, P., & Furney, S. J. (2018). Mutations: Driver versus passenger. *Encyclopedia of Cancer* (Third Edit., Vol. 2, pp. 551–562). Elsevier. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.65045-6>
- Pizzoni, S., Sabattini, S., Stefanello, D., Dentini, A., Ferrari, R., Dacasto, M., Giantin, M., et al. (2018). Features and prognostic impact of distant metastases in 45 dogs with de novo stage IV cutaneous mast cell tumours: A prospective study. *Veterinary and Comparative Oncology*, 16(1), 28–36.
- Preziosi, R., Sarli, G., & Paltrinieri, M. (2007). Multivariate survival analysis of histological parameters and clinical presentation in canine cutaneous mast cell tumours. *Veterinary Research Communications*, 31(3), 287–296.
- Prindle, M. J., Fox, E. J., & Loeb, L. A. (2010). The Mutator Phenotype in Cancer: Molecular Mechanisms and Targeting Strategies. *Current Drug Targets*, 11(10), 1–7. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3624763/pdf/nihms412728.pdf>
- Pundir, P., & Kulka, M. (2010). The role of G protein-coupled receptors in mast cell activation by antimicrobial peptides: Is there a connection. *Immunology and Cell Biology*, 88(6), 632–640.
- Radin, M. J., Sharkey, L. C., & Holycross, B. J. (2009). Adipokines: a review of biological and analytical principles and an update in dogs , cats , and horses. *Veterinary Clinical Pathology*, 2, 136–156.
- Rafalko, J. M., Kruglyak, K. M., McCleary-Wheeler, A. L., Goyal, V., Phelps-Dunn, A., Wong,

- L. K., Warren, C. D., et al. (2023). Age at cancer diagnosis by breed, weight, sex, and cancer type in a cohort of more than 3,000 dogs: Determining the optimal age to initiate cancer screening in canine patients. *PLoS ONE*, 18(2 February), 1–20. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0280795>
- Ramón y Cajal, S., Sesé, M., Capdevila, C., Aasen, T., De Mattos-Arruda, L., Diaz-Cano, S. J., Hernández-Losa, J., et al. (2020). Clinical implications of intratumor heterogeneity: challenges and opportunities. *Journal of Molecular Medicine*, 98(2), 161–177. *Journal of Molecular Medicine*.
- Ribatti, D. (2016). The development of human mast cells. An historical reappraisal. *Experimental Cell Research*, 342(2), 210–215. Elsevier. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1016/j.yexcr.2016.03.013>
- Rissi, D. R., & Oliveira, F. N. (2022). Review of diagnostic histologic features of cutaneous round cell neoplasms in dogs. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 34(5), 769–779. Retrieved from <https://doi.org/10.1177/10406387221100209>
- Robveille, C., & Cullen, J. M. (2022). Hepatocellular carcinomas in captive prosimians. *Veterinary Pathology*, 59(6), 1012–1021.
- Romansik, E. M., Reilly, C. M., Kass, P. H., Moore, P. F., & London, C. A. (2007). Mitotic index is predictive for survival for canine cutaneous mast cell tumors. *Veterinary Pathology*, 44(3), 335–341.
- Sabattini, S., Scarpa, F., Berlato, D., & Bettini, G. (2015). Histologic Grading of Canine Mast Cell Tumor: Is 2 Better Than 3? *Veterinary Pathology*, 52(1), 70–73.
- Santos, M., Correia-Gomes, C., Santos, A., de Matos, A., Rocha, E., Lopes, C., & Pereira, P. D. (2014). Nuclear pleomorphism: Role in grading and prognosis of canine mammary carcinomas. *Veterinary Journal*, 200(3), 426–433. Elsevier Ltd. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2014.03.019>
- Schultheiss, P. C., Gardiner, D. W., Rao, S., Olea-Popelka, F., & Tuohy, J. L. (2011). Association of histologic tumor characteristics and size of surgical margins with clinical outcome after surgical removal of cutaneous mast cell tumors in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 238(11), 1464–1469.
- Sfiligoi, G., Rassnick, K. M., Scarlett, J. M., Northrup, N. C., & Gieger, T. L. (2005). Outcome of dogs with mast cell tumors in the inguinal or perineal region versus other cutaneous

- locations: 124 Cases (1990=2001). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 226(8), 1368–1374.
- Shoop, S. J., Marlow, S., Church, D. B., English, K., McGreevy, P. D., Stell, A. J., Thomson, P. C., et al. (2015). Prevalence and risk factors for mast cell tumours in dogs in England. *Canine Genetics and Epidemiology*, 2(1), 1.
- Simoës, J. P. C., Schoning, P., & Butine, M. (1994). Prognosis of Canine Mast Cell Tumors: A Comparison of Three Methods. *Veterinary Pathology*, 31(6), 637–647.
- Śmiech, A., Łopuszyński, W., Ślaska, B., Bulak, K., & Jasik, A. (2019). Occurrence and distribution of canine cutaneous mast cell tumour characteristics among predisposed breeds. *Journal of Veterinary Research (Poland)*, 63(1), 141–148.
- Śmiech, A., Ślaska, B., Łopuszyński, W., Jasik, A., Bochyńska, D., & Dańbrowski, R. (2018). Epidemiological assessment of the risk of canine mast cell tumours based on the Kiupel two-grade malignancy classification. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 60(1), 1–9.
- Søe, K. (2020). Osteoclast fusion: Physiological regulation of multinucleation through heterogeneity— potential implications for drug sensitivity. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(20), 1–17.
- Solimando, A. G., Desantis, V., & Ribatti, D. (2022). Mast Cells and Interleukins. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(22), 1–14.
- Sorensen, F. B. (1996). Quantitative Analysis of Nuclear Size for Prognosis-Related Malignancy Grading. *Advances in Oncobiology* (Vol. 1, pp. 221–255).
- Sørensen, F. B., Sasaki, M., Fukuzawa, S., Yamabe, H., Olsen, S., & Yoshida, O. (1994). Qualitative and quantitative histopathology in transitional cell carcinomas of the urinary bladder: An international investigation of intra- and interobserver reproducibility. *Laboratory Investigation*, 70(2).
- Sørensen, Flemming Brandt, Bichel, P., & Jakobsen, A. (1991). Stereological estimates of nuclear volume in squamous cell carcinoma of the uterine cervix and its precursors. *Virchows Archiv A Pathological Anatomy and Histopathology*, 418(3), 225–233.
- Sørensen, Flemming Brandt, Bichel, P., & Jakobsen, A. (1992). DNA level and stereologic estimates of nuclear volume in squamous cell carcinomas of the uterine cervix. A comparative study with analysis of prognostic impact. *Cancer*, 69(1), 187–199.

- Sørensen, Flemming Brandt, & Ottosen, P. D. (1991). Stereological Estimation of Nuclear Volume in Benign and Malignant Melanocytic Lesions of the Skin. *The American Journal of Dermatopathology*, 13(2).
- Stefanello, D., Buracco, P., Sabattini, S., Finotello, R., Giudice, C., Grieco, V., Iussich, S., et al. (2015). Comparison of 2- and 3-category histologic grading systems for predicting the presence of metastasis at the time of initial evaluation in dogs with cutaneous mast cell tumors: 386 cases (2009–2014). *AVMA journals*, 246(7), 765–769.
- Stokol, T. (n.d.). Cytologic patterns. *Cornell University College of Veterinary Medicine*. Retrieved October 5, 2023, from <https://eclinpath.com/cytology/cytology-interpretation/>
- Stolarczyk, E. (2017). ScienceDirect Adipose tissue inflammation in obesity: a metabolic or immune response? *Current Opinion in Pharmacology*, 37, 35–40. Elsevier Ltd. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1016/j.coph.2017.08.006>
- Strefezzi, R. D. F., Xavier, J. G., & Catão-Dias, J. L. (2003). Morphometry of canine cutaneous mast cell tumors. *Veterinary Pathology*, 40(3), 268–275.
- Takeuchi, Y., Fujino, Y., Watanabe, M., Takahashi, M., Nakagawa, T., Takeuchi, A., Bonkobara, M., et al. (2013). Validation of the prognostic value of histopathological grading or c-kit mutation in canine cutaneous mast cell tumours: A retrospective cohort study. *Veterinary Journal*, 196(3), 492–498. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2012.11.018>
- Tamlin, V. S., Bottema, C. D. K., & Peaston, A. E. (2020). Comparative aspects of mast cell neoplasia in animals and the role of KIT in prognosis and treatment. *Veterinary Medicine and Science*, 6(1), 3–18.
- Tamlin, V. S., Bottema, C. D. K., Woolford, L., Dobson, E. C., Kessell, A. E., & Peaston, A. E. (2022). Canine mast cell tumours part I: Clinical and survival outcomes. *Veterinary Medicine and Science*, 8(4), 1409–1420.
- Thamm, D. H., Mauldin, E. A., & Vail, D. M. (1999). Prednisone and vinblastine chemotherapy for canine mast cell tumor--41 cases (1992-1997). *Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine*, 13(5), 491–497.
- Thamm, Douglas H., Avery, A. C., Berlato, D., Bulman-Fleming, J., Clifford, C. A., Hershey, A. E., Intile, J. L., et al. (2019). Prognostic and predictive significance of KIT protein expression and c-kit gene mutation in canine cutaneous mast cell tumours: A consensus

- of the Oncology-Pathology Working Group. *Veterinary and Comparative Oncology*, 17(4), 451–455.
- Thompson, J. J., Morrison, J. A., Pearl, D. L., Boston, S. E., Wood, G. A., Foster, R. A., & Coomber, B. L. (2016). Receptor Tyrosine Kinase Expression Profiles in Canine Cutaneous and Subcutaneous Mast Cell Tumors. *Veterinary Pathology*, 53(3), 545–558.
- Thompson, J. J., Pearl, D. L., Yager, J. A., Best, S. J., Coomber, B. L., & Foster, R. A. (2011a). Canine subcutaneous mast cell tumor: Characterization and prognostic indices. *Veterinary Pathology*, 48(1), 156–168. Retrieved from <https://doi.org/10.1177/0300985810387446>
- Thompson, J. J., Yager, J. A., Best, S. J., Pearl, D. L., Coomber, B. L., Torres, R. N., Kiupel, M., et al. (2011b). Canine subcutaneous mast cell tumors: Cellular proliferation and kit expression as prognostic indices. *Veterinary Pathology*, 48(1), 169–181.
- Treggiari, E., Valenti, P., Porcellato, I., Maresca, G., & Romanelli, G. (2023). Retrospective analysis of outcome and prognostic factors of subcutaneous mast cell tumours in dogs undergoing surgery with or without adjuvant treatment. *Veterinary and Comparative Oncology*, 21(3), 437–446.
- Tseng, L.-J., Matsuyama, A., & MacDonald-Dickinson, V. (2023). Histology: The gold standard for diagnosis? Liang-Jun. *The Canadian Veterinary Journal*, 64(4), 389–391.
- Vascellari, M., Giantin, M., Capello, K., Carminato, A., Morello, E. M., Vercelli, A., Granato, A., et al. (2013). Expression of Ki67, BCL-2, and COX-2 in Canine Cutaneous Mast Cell Tumors: Association With Grading and Prognosis. *Veterinary Pathology*, 50(1), 110–121.
- Veras, M. M., Costa, N. S. X., & Mayhew, T. (2014). *Best Practice for Quantifying the Microscopic Structure of Mouse Placenta. The Guide to Investigation of Mouse Pregnancy*. Elsevier. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-394445-0.00046-1>
- Villamil, J. A., Henry, C. J., Bryan, J. N., Ellersieck, M., Schultz, L., Tyler, J. W., & Hahn, A. W. (2011). Identification of the most common cutaneous neoplasms in dogs and evaluation of breed and age distributions for selected neoplasms. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 239(7), 960–965.
- Vozdova, M., Kubickova, S., Fictum, P., Cernohorska, H., Fröhlich, J., & Rubes, J. (2020a). Mutation and methylation status of KIT and TP53 in canine cutaneous and subcutaneous

- mast cell tumours. *Veterinary and Comparative Oncology*, 18(3), 438–444.
- Vozdova, M., Kubickova, S., Pal, K., Fröhlich, J., Fictum, P., & Rubes, J. (2020b). Recurrent gene mutations detected in canine mast cell tumours by next generation sequencing. *Veterinary and Comparative Oncology*, 18(4), 509–518.
- Warland, J., & Dobson, J. (2013). Breed predispositions in canine mast cell tumour: A single centre experience in the United Kingdom. *Veterinary Journal*, 197(2), 496–498. Elsevier Ltd. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2013.02.017>
- Webster, J. D., Yuzbasiyan-Gurkan, V., Miller, R. A., Kaneene, J. B., & Kiupel, M. (2007). Cellular proliferation in canine cutaneous mast cell tumors: Associations with c-KIT and its role in prognostication. *Veterinary Pathology*, 44(3), 298–308.
- Welle, M. M., Bley, C. R., Howard, J., & Rüfenacht, S. (2008). Canine mast cell tumours: A review of the pathogenesis, clinical features, pathology and treatment. *Veterinary Dermatology*, 19(6), 321–339.
- White, C. R., Hohenhaus, A. E., Kelsey, J., & Procter-Gray, E. (2011). Cutaneous MCTs: Associations with spay/neuter status, breed, body size, and phylogenetic cluster. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 47(3), 210–216.
- Willmann, M., Yuzbasiyan-Gurkan, V., Marconato, L., Dacasto, M., Hadzijasufovic, E., Hermine, O., Sadovnik, I., et al. (2021). Proposed Diagnostic Criteria and Classification of Canine Mast Cell Neoplasms: A Consensus Proposal. *Frontiers in Veterinary Science*, 8(December), 1–10.
- Winther, T. L., Arnli, M. B., Salvesen, Ø., & Torp, S. H. (2016). Phosphohistone-H3 proliferation index is superior to mitotic index and MIB-1 expression as a predictor of recurrence in human meningiomas. *American Journal of Clinical Pathology*, 146(4), 510–520.
- Woska, J. R., & Gillespie, M. E. (2012). SNARE complex-mediated degranulation in mast cells. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 16(4), 649–656.
- Yang, C., Zhang, J., Ding, M., Xu, K., Li, L., Mao, L., & Zheng, J. (2018). Ki67 targeted strategies for cancer therapy. *Clinical and Translational Oncology*, 20(5), 570–575.
- Young, B., O'Dowd, G., & Woodford, P. (2013). *Wheater's Functional Histology: A Text and Colour Atlas*. (ELSEVIER HEALTH SCIENCES, Ed.) (6th ed.). Churchill Livingstone.

Zhang, L., Dong, X., Tian, X., Lee, M., Ablaeva, J., Firsanov, D., Lee, S. G., et al. (2021). Maintenance of genome sequence integrity in long- And short-lived rodent species. *Science Advances*, 7(44).

Apêndices

Apêndice A1: 2023: ESVP / ECVP / ESVCP / ECVCP Joint Congress, Lisboa, Portugal



Oral Abstracts Veterinary Pathology Friday 1 September 2023

10.45-12.15 | SESSION 7: TUMOUR PATHOLOGY

- 10.45-10.58 Free-circulating and extracellular vesicle-associated microRNAs in healthy and T cell lymphoma bearing dogs** V. Moccia
10.58-11.11 Stereological Estimation of Mean Nuclear Volume as Prognostic Factor in Canine Subcutaneous Mast Cell Tumors J. Catarino
11.11-11.24 Comparison of cytological and histological classification systems for the detection of nodal metastases of canine mast cell tumours A. Renzi
11.24-11.37 Proposal for a new histological grading system for canine oral melanocytic tumors F. Chocteau
11.37-11.50 RAC1 pathway in canine oral melanoma progression and prognosis A. Lo Giudice
11.50-12.03 Correlation between malignant histological features of canine digital Squamous cell carcinoma and genetic KIT Ligand copy number variation A. Cerezo Echevarría
12.03-12.16 EXPREssion of The inhibitor-of-apoptosis Survivin is associated with poor prognosis in canine invasive mammary carcinoma M. Cuvelier

Stereological Estimation of Mean Nuclear Volume as Prognostic Factor in Canine Subcutaneous Mast Cell Tumors

J. Catarino^{*,†}, A. Macara^{*}, F. Coelho^{*}, A. Barros[‡] and P. Faísca^{*,‡}

^{*}Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Lusófona - Centro Universitário de Lisboa, Lisboa, PT, [†]Comprehensive Health Research Centre (CHRC), Universidade de Évora, Évora, PT and [‡]Instituto Gulbenkian de Ciência, Oeiras, PT

Introduction

Grading schemes for canine subcutaneous mast cell tumours (scMCT) are not clearly defined. Thompson et al. (2011) indicated infiltrative pattern, mitotic count, and presence of multinucleated cells as linked to decreased survival time. However, the applied qualitative and semiquantitative parameters are prone to interobserver variability and bias. This study investigated the prognostic value of volume-weighted mean nuclear volume (MNV), a stereological estimation that provides information about the nuclear size and its variability.

Materials and Methods

Thirty csMCTs were selected, based on the condition that these dogs were treated with surgery alone and 2 years of follow-up data, as well as age, sex, breed, and surgical margins, were available. MNV was estimated using the point-intercept method with the newCAST stereological software (Visiopharm). Postsurgical resolution of disease was given an outcome value of 0 (OC0), an outcome value of 1 (OC1) included cases that died or were euthanized as a result of local recurrence or development of metastases.

Results

MNV values were statistically different between OC0 and OC1 groups in both univariable (Linear regression) and multivariable (Wilcoxon) analysis with higher values in dogs with poorer outcomes ($P < 0.001$). Multivariable logistic regression showed that MNV had good potential to predict negative outcomes, almost statistically significant ($p = 0.051$). An optimal cut-off value of $MNV > 143 \mu m^3$ was able to identify csMCT with poor prognosis (OC1 cases) with 80% specificity and 90% sensitivity ($p = 0.020$, McFadden's $R^2 = 0.57$).

Conclusions

This study suggests that the estimation of MNV can objectively detect csMCTs with poorer outcomes.

Anexos

Anexo A1: Sistemas de estadiamento clínico para mastocitomas cutâneos caninos.

Tabela A1 - Proposta de sistema de estadiamento clínico de mastocitomas cutâneos caninos desenvolvido por Owen et al., 1980 (Willmann et al. 2021).

Clinical Staging	Criteria
Stage I	One tumor confined to dermis without regional lymph node involvement
Stage II	One tumor confined to dermis, with regional lymph node involvement
Stage III	Multiple dermal tumors or large infiltrating tumor with or without regional lymph node involvement
Stage IV	Any tumor with distant metastasis or recurrence with metastasis

Tabela A2 - Proposta de sistema de estadiamento clínico de mastocitomas cutâneos caninos desenvolvido por Horta et al., 2018 (Willmann et al. 2021).

Clinical Staging	Criteria
Stage I	Single tumor, without regional lymph node involvement
Stage II	Multiple tumors (≥ 3), without regional lymph node involvement
Stage III	Single tumor, with regional lymph node involvement
Stage IV	Large and infiltrative tumors, without delineation, or multiple tumors (≥ 3), with regional lymph node involvement
Stage V	Any tumor with distant metastasis, including bone marrow invasion and the presence of mast cells in the peripheral blood